

## Aislamiento de genes homeóticos de *Stevia rebaudiana*

Duré Rubén, Peralta Inocencia, Souza Ramón, Zuñiga José  
 rdario.dure@gmail.com, inoperalta@gmail.com, souza@cicy.mx, zuniga@cicy.mx  
 CEMIT – DGICT – UNA. San Lorenzo. PARAGUAY  
 Programa de vinculación de científicos y tecnólogos – Convocatoria 2013

### RESUMEN

Durante la estancia en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), se realizaron ensayos conducentes al aislamiento de genes relacionados a la embriogénesis; *serk1*, *wox4*, *lec1* y *bbm*. Este trabajo ha permitido aislar, clonar y secuenciar un fragmento del gen *serk1*, con lo que permitió el diseño de cebadores específicos y el aislamiento completo mediante la tecnología RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)

### INTRODUCCIÓN

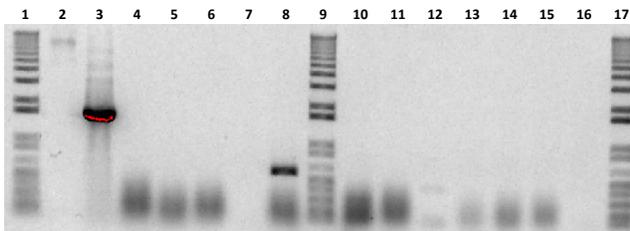
La *Stevia rebaudiana* es conocida por la potencia endulzante de sus metabolitos. Su mejoramiento genético mediante técnicas recombinantes aún está muy poco explorado por varias razones. Una de ellas es la baja eficiencia en la embriogénesis somática y tasa de proliferación de células embriogénicas. Conocer los genes implicados en la embriogénesis es de suma importancia de manera a entender y diseñar estrategias para el avance en esta área. Con esto en mente, se realizaron ensayos conducentes al aislamiento de genes relacionados a la embriogénesis. Para ello fue necesaria la extracción de ARN totales de alta pureza. El mayor avance hacia el aislamiento de la secuencia completa del gen fue con la de *serk1*. La secuencia amplificada fue enviada a secuenciación para confirmar que efectivamente se trata del gen *serk1*. A partir del resultado de secuenciación, se diseñaron cebadores específicos para éste gen. Posteriormente se realizaron ensayos para el aislamiento del gen completo.

### MATERIALES Y MÉTODOS

La variedad criolla fue utilizada como material vegetal. Se extrajeron los ARN totales mediante el método modificado de TRIzol de tejidos jóvenes o inmaduros, tales como raíces, hojas inmaduras y ápices. Se evaluaron varias secuencias de cebadores específicos y degenerados para los genes en cuestión, diseñados previamente para especies de café y chile habanero, utilizando la técnica de *OneStep TR-PCR* (fig 1). Con el *Kit SMART cDNA Library Construction* y el uso de una enzima *Phire Plant PCR* se permitió el aislamiento de poblaciones de ADN complementario de doble cadena (dcADNc). Posteriormente se evaluaron los cebadores para *serk1* (fig 2). Del producto de PCR obtenido en una de las combinaciones de cebadores fueron insertadas en un vector pJET2.1 (fig 3) y clonados en células competentes de *E. coli*. Se evaluaron las ligaciones mediante PCR a partir de las colonias desarrolladas en medio selectivo (fig 4). Los plásmidos fueron extraídos de las colonias seleccionadas mediante el *Kit QIAprep Spin Miniprep* (fig 5) y posterior a la confirmación (fig 6) fueron enviados a secuenciación.

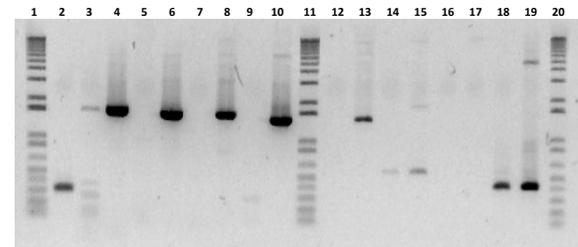
### RESULTADOS

Fig. 1. RT-PCR con SuperScript. One-Step RT-PCR con cebadores degenerados.



1: 1Kb; 2: pAISerk / ceb esp serk1. 3: pAISerk / ceb deg serk1. 4: Stevia / ceb esp serk1. 5: Stevia / ceb deg serk1. 6: Stevia / ceb actina. 7: Stevia / ceb MAPK. 8: Cafeto / ceb esp serk1. 9: 1Kb. 10: Cafeto / ceb deg serk1. 11: Cafeto / ceb esp actina. 12: Cafeto / ceb MAPK. 13: Chile hab / ceb esp serk1. 14: Chile hab / ceb deg serk1. 15: Chile hab / ceb actina. 16: Chile hab / ceb MAPK. 17: 1 Kb

Fig 2. Productos de PCR de dcADNc-SMART de raíz con cebadores degenerados y específicos de *Serk1*



1: 1Kb 2: Stevia (18S) 3: Stevia (*serk1* D1 y R2) 4: pBSAISerk1 (*serk1* D1 y R2) 5: Stevia (*serk1* D2 y R2) 6: pBSAISerk1 (*serk1* D2 y R2) 7: Stevia (*serk1* D2 y Seco R) 8: pBSAISerk1 (*serk1* D2 y Seco R) 9: Stevia (*serk1* D3 y R2) 10: pBSAISerk1 (*serk1* D3 y R2) 11: 1Kb. 12: Stevia (*serk1* D3 y Seco R) 13: pBSAISerk1 (*serk1* D3 y Seco R) 14: Stevia (*Serk1* cafe Dir 1 – Rev) 15: pBSAISerk1 (*Serk1* cafe Dir 1 – Rev) 16: Stevia (*Serk1* chile Dir 1 – Rev) 17: pBSAISerk1 (*Serk1* chile Dir 1 – Rev) 18: Stevia (MAPK PIG y Juglar) 19: pGEMMapk (MAPK PIG y Juglar) 20: 1 Kb

Fig 3. Elementos genéticos del vector de clonación pJET1.2.

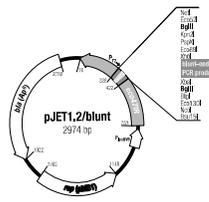
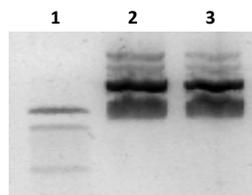
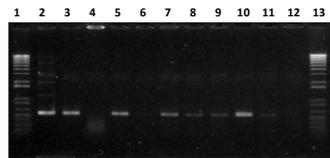


Fig. 5. Extracción de plásmidos por Kit QIAprep Spin Miniprep



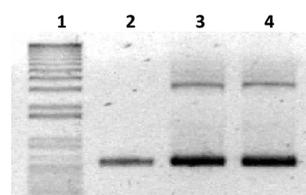
1: 100 pb 2: Ligación 1. 3: Ligación 2

Fig 4. Evaluación de los insertos, por PCR a partir de colonias desarrolladas en el medio sólido selectivo.



1: 1 Kb 2: Control positivo (pBSAISerk1). 3: Lig 1 (150 uL) colonia 1. 4: Lig 1 (150uL) colonia 2. 5: Lig 1 (150 uL) colonia 3. 6: Lig 1 (250 uL) colonia 1. 7: Lig 1 (250 uL) colonia 2. 8: Lig 1 (250 uL) colonia 3. 9: Lig 2 (150 uL) colonia 1. 10: Lig 2 (150 uL) colonia 2. 11: Lig 2 (150 uL) colonia 3. 12: Lig 2 (150 uL) colonia 4. 13: 1 Kb

Fig. 6. Amplificación por PCR-Phire de un fragmento del gen SERK-1 /pJET1.2



1: 1 Kb 2: dcADNc Stevia. 3: Plásmido lig 1. 4: Plásmido lig 2.

### CONCLUSIONES

Este trabajo ha permitido aislar, clonar y secuenciar un fragmento del gen *serk1*, con lo que permitió el diseño de cebadores específicos y el aislamiento completo del gen mediante la tecnología RACE (*rapid amplification of cDNA ends*). Una vez aislado el gen completo, se pretende realizar ensayos de sobreexpresión de este gen en células de *Stevia*.

### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por financiar por el financiamiento de la estancia  
 Al CICY por abrir las puertas y permitir el desarrollo de la estancia  
 A José Juan Zuñiga por aceptarme en su laboratorio

### REFERENCIAS

Hecht V et al. The Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* 2001;127:803-816.  
 Salaj et al. AISERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol Biochem*. 2008 Jul;46(7):709-14.

“Este proyecto fue financiado por el CONACYT a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación e Investigación – FEEI del FONACIDE”