

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“CARACTERIZACIÓN DEL GEN PUTATIVO RESPONSABLE DE
LA ACTIVIDAD EXO-HIDROLASA EN ÓRGANOS
RESERVANTES DE YACÓN *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. &
Endl.) H. Robinson”**

Presentada por:

Mariella Hiromi Uchima Flores

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima- Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“CARACTERIZACIÓN DEL GEN PUTATIVO RESPONSABLE DE
LA ACTIVIDAD EXO-HIDROLASA EN ÓRGANOS
RESERVANTES DE YACÓN *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. &
Endl.) H. Robinson”**

Presentada por:

Mariella Hiromi Uchima Flores

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

.....
Mg.Sc. Rosa Espejo Joya
PRESIDENTE

.....
Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO

.....
Mg.Sc. Roberto Mansilla Samaniego
MIEMBRO

.....
M.Sc. Patricia Moreno Díaz de Saco
ASESORA

.....
Blga. Rosa Cabrera Pintado
CO-ASESORA

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Elaine, por todos sus esfuerzos, dedicación y amor incondicional.

A mi asesora, Prof. Patricia Angélica Moreno por su esfuerzo, tiempo, dedicación, apoyo y enseñanza durante toda la investigación.

Al Mg. Róger Christian Torres por su guía, motivación, continuas enseñanzas y sobre todo por su amistad brindada.

A mi co-asesora, Rosa María Cabrera, por su asesoría y la oportunidad brindada al hacerme parte de esta investigación.

Al proyecto PNIA 092_PI: “Variación del contenido de fructooligosacáridos (FOS) en las accesiones promisorias de yacón: Caracterización, clonamiento y análisis funcional de un fragmento de ADN complementario de la hidrolasa responsable de su degradación”

A mis compañeros del Área de Biología Molecular, perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN	3
2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA... ..	4
2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA... ..	5
2.4. NÚMERO CROMOSÓMICO... ..	7
2.5. SISTEMA REPRODUCTIVO	9
2.6. PROPIEDADES MEDICINALES ATRIBUIDAS	10
2.7. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	13
2.8. FRUCTOOLIGOSACÁRICOS (FOS).....	14
2.9. CONTENIDO DE FOS EN RAÍCES TUBEROSAS DE YACÓN	15
2.10. METABOLISMO DE FRUCTOOLIGOSACÁRICOS	16
2.11. VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE FOS.	17
2.12. DEGRADACIÓN DE FRUCTANOS... ..	18
2.13. ESTUDIOS PREVIOS PARA LA OBTENCIÓN DE FEHs... ..	19
2.14. TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA LA OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS PARCIALES DEL GEN FEHs.	20
2.14.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
2.14.2. PCR inversa... ..	20
2.14.3. Nested PCR.....	21
2.14.4. Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE)... ..	21
2.15. FAMILIA GLUCOSIL HIDROLASA... ..	22
2.16. CRISTALIZACIÓN ENZIMÁTICA... ..	24
III. MATERIALES Y METODOLOGÍA	25
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	25
3.2. METODOLOGÍA.....	25

3.2.1.	EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	25
3.2.2.	OBTENCIÓN DE AMPLICONES	26
3.2.2.1.	Diseño de Primers... ..	26
3.2.2.2.	Obtención de secuencias de la región codificante.	26
3.2.2.3.	Purificación de productos PCR	27
3.2.2.4.	Ligación de insertos utilizando el vector pGEMT-easy.....	28
3.2.2.5.	Clonación y Selección de colonias	28
3.2.2.6.	Purificación de Plásmidos... ..	28
3.2.2.7.	Comprobación de la inserción y preparación para el envío a secuenciar... ..	29
3.2.2.8.	Edición de secuencias y construcción del árbol filogenético... ..	29
3.2.3.	OBTENCIÓN DE EXTREMOS CORRESPONDIENTE A LAS REGIONES NO CODIFICANTES DEL GEN FEH.	31
3.2.3.1.	RACE 5'	31
3.2.3.2.	RACE 3'	32
3.2.3.3.	IPCR	33
3.2.3.4.	Semi-Nested 5'	34
3.2.3.5.	Semi-Nested 3'	35
3.2.4.	MODELAMIENTO POR HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL	36
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
4.1	EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	37
4.2	OBTENCIÓN DE AMPLICONES.	40
4.2.1	Obtención de amplicones correspondiente a la secuencia codificante	41
4.2.2	Purificación de Productos de PCR	42
4.2.3	Selección de colonias	43
4.2.4	Comprobación de la inserto... ..	44
4.3	OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO CORRESPONDIENTE A LA REGIÓN 3' DEL ARNm.	44

4.4	SECUENCIA ENSAMBLADA Y ÁRBOL FILOGENÉTICO.....	45
4.5	MODELADO ESTRUCTURAL POR HOMOLOGÍA.....	49
4.5.1.	Dominios y estructura general.....	49
4.5.2.	Sitio activo tentativo	52
4.5.3.	Sitio de unión tentativo	58
V.	CONCLUSIONES	62
VI.	RECOMENDACIONES	63
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
VIII.	ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Smallanthus sonchifolius</i>	4
Tabla 2. Resultados de cuantificación de ARN (ng/uL ⁻¹) total... ..	38
Tabla 3. Lista de Primers que amplificaron una región de la secuencia codificante correspondiente al gen FEH en yacón	41
Tabla 4. Lista de Primers utilizados en las técnicas RACE 5', RACE 3'e IPCR	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Órganos de yacón... ..	6
Figura 2. Evolución hipotética de yacón.....	8
Figura 3. Metabolismo de fructooligosacáridos (FOS)	17
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa.....	38
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa.....	42
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa.....	42
Figura 7. Purificación de productos PCR	43
Figura 8. Selección de colonias.....	44
Figura 9. Comprobación de la inserción mediante digestión enzimática	45
Figura 10. Obtención del fragmento correspondiente a la región 3' del ARN.	46
Figura 11. Secuencia de nucleótidos correspondiente a la región codificante y no codificante (en negrita) del extremo 3' del ARNm de la FEH de yacón.....	47
Figura 12. Secuencia de aminoácidos correspondiente al gen FEH en yacón.....	47
Figura 13. Construcción del árbol filogenético entre la secuencia FEH de yacón y sus homólogos 1-FEH	48
Figura 14. Porcentaje de grado de identidad de la secuencia de aminoácidos entre FEH de yacón y 1-FEH de especies relacionadas.....	49
Figura 15. Comparación de estructuras entre la 1-FEH IIa en <i>C. intybus</i> y la 1-FEH de <i>S. sonchifolius</i>	50
Figura 16. (e) Modelado por homología estructural de la 1-FEH de <i>S.</i> <i>sonchifolius</i> obtenida por el programa SWISS MODEL a través del modelamiento por predicción de estructura 3D	52
Figura 17. Modelado por homología de la 1-FEH de <i>S. sonchifolius</i>	57
Figura 18. Modelado por homología de la 1-FEH de <i>S. sonchifolius</i>	58
Figura 19. Descripción general de la probable estructura tridimensional de <i>C. intybus</i>	

(1-FEH IIa)... 60

Figura 20. Modelado de la estructura cristalina de la 1-FEH de yacón, visualizando
los probables sitios de N-glucosilación... 62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Extracción de ARN Total con TRIzol... ..	80
Anexo 2. Protocolo de Extracción de ARN Total empleando LiCl 0,1M.....	82
Anexo 3. Protocolo de extracción de RNA total usando el kit RNeasy Mini Kit, Qiagen.....	84
Anexo 4. Protocolo de extracción de RNA total utilizando el protocolo CTAB.....	85
Anexo 5. Marcador 1kb Plus Invitrogen.....	86
Anexo 6. Vector de clonación pGEMT-easy.....	87

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo la caracterización del gen responsable de la actividad fructano-exohidrolasas a partir de las raíces reservantes de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) obtenidas de la estación experimental “Baños del Inca” en Cajamarca, perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). La estandarización de un protocolo de extracción de RNA total a partir de las raíces reservantes de yacón se realizó utilizando el protocolo CTAB, las modificaciones del protocolo se basaron en el aumento de antioxidantes. El diseño de primers permitió la obtención de secuencias codificantes traslapadas del gen FEH mediante la técnica RT-PCR, así como para obtención del extremo 3' del ARNm. Para esta región se utilizó técnicas variantes de PCR como: RACE, IPCR y semi-Nested, siendo esta última esencial para la obtención del extremo no codificante 3'. El ensamblaje de los fragmentos permitió determinar cerca del 80 por ciento de la secuencia y la construcción del árbol filogenético estableció que la secuencia en estudio corresponde a la 1-fructano exohidrolasa (1-FEH) en yacón, presentando un alto grado de identidad respecto a las 1-FEHs de: *C. intybus* (88.5 por ciento), *H. tuberosus* (88.2 por ciento), *V. herbácea* (86.5 por ciento) y *A. lappa* (85 por ciento). La propuesta de la estructura de la enzima por homología, realizada mediante los programas: *Swiss Model* y *PyMOL* mostró similitud estructural respecto a la estructura base de las glicósido hidrolasa 32, así también la presencia de dos de los tres residuos claves pertenecientes a la triada catalítica y la ausencia de sitios de N-glicosilación cerca a la hendidura.

Palabras claves: CTAB, RT- PCR, semi-Nested, 1-FEH.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to characterize the gene responsible for the fructan-exohydrolases activity from the reservant roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) obtained from the "Baños del Inca" experimental station in Cajamarca, belonging to the National Institute of Agrarian Innovation (INIA). The standardization of a total RNA extraction protocol from yacon reservant roots was carried out using the CTAB protocol, the modifications of the protocol were based on the increase of antioxidants. The design of primers allowed obtaining of overlapping coding sequences of the FEH gene by the RT-PCR technique, as well as for obtaining the 3'-end of the mRNA. For this region, PCR techniques were used, such as: RACE, IPCR and semi-Nested, the latter being essential for obtaining the 3'-non-coding end. The assembly of the fragments allowed to determine about 80 percent of the sequence and the construction of the phylogenetic tree established that the sequence under study corresponds to 1-fructan exohydrolase (1-FEH) in yacon, presenting a high degree of identity with respect to the 1-FEHs of: *C. intybus* (88.5 percent), *H. tuberosus* (88.2 percent), *V. herbacea* (86.5 percent) and *A. lappa* (85 percent). The proposal of the structure of the enzyme by homology, carried out through the programs: *Swiss Model* and *PyMOL* showed structural similarity with respect to the base structure of glycoside hydrolases 32, as well as the presence of two of the three key residues belonging to the catalytic triad. and the absence of N-glycosylation sites near the cleft.

Keywords: CTAB, RT-PCR, semi-Nested, 1-FEH.

I. INTRODUCCIÓN

Smilax sonchifolia (Poepp. & Endl.) H. Robinson, comúnmente denominado yacón es una planta apreciada por los efectos benéficos para la salud que brindan sus órganos reservantes. A pesar de que el yacón es una raíz originaria de los andes y ha sido consumida desde la época preincaica no tiene la relevancia de otros cultivos andinos como la papa o el camote. Es en los últimos 20 años que se comienzan a conocer en el Perú sus efectos prebióticos para la salud y otras propiedades atribuidas (estimulador de la absorción de calcio, prevención del cáncer de colon y tratamiento contra la diabetes tipo dos).

La raíz de yacón contiene entre 40 a 70 por ciento de fructooligosacáridos (FOS) en base al peso seco, que corresponden al azúcar no hidrolizable por las enzimas digestivas humanas, alcanzando la última porción del intestino grueso sin sufrir alguna modificación química, ya en el colon los FOS son completamente fermentados por probióticos (Pedreschi *et al.* 2003) contribuyendo a mejorar la función gastrointestinal y otros efectos (aumentar el peristaltismo, efecto osmótico y reducción del tiempo de tránsito intestinal) que pueden contribuir a prevenir y controlar el estreñimiento (Chen *et al.* 2000).

Los diferentes estudios han demostrado que luego de la cosecha las raíces empiezan un rápido proceso de cambio en la composición química de sus azúcares, pues los FOS son hidrolizados en azúcares simples por la acción de una enzima llamada fructanoexohidrolasa (FEH), que los convierte en fructosa, sacarosa y glucosa. Después de una semana en almacenamiento a temperatura ambiente, alrededor del 30 a 40 por ciento de los FOS se habrán transformado en azúcares simples (Graefe *et al.* 2004). Es importante comprender el metabolismo de estos azúcares, así como conocer el contenido de FOS en

las raíces tuberosas de diferentes accesiones de yacón, con el fin de lograr progresivamente mayores cantidades de FOS por plantaciones, disminuyendo la degradación de FOS en el tiempo de almacenaje y poder abastecer la demanda nacional de pequeños agricultores, así como incentivar el comercio internacional con un alimento funcional de calidad.

Este trabajo pretende contribuir al desarrollo de nuevas investigaciones e innovaciones que permitan el incremento en la calidad, productividad de esta raíz tuberosa y a la selección de variedades que contengan mayor recuento de fructanos.

El objetivo principal de la presente investigación fue: Caracterizar el gen responsable de la actividad fructano exohidrolasa en las raíces reservantes de yacón, y como objetivos específicos se plantearon: (i) Estandarización de un protocolo de extracción de RNA total a partir de raíces reservantes de yacón. (ii) Obtención de amplicones y ensamblaje de la secuencia correspondiente al gen con actividad exohidrolasa. (iii) Análisis filogenético del gen en estudio. (iv) Propuesta de estructura de la FEH por homología.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

El yacón es una planta domesticada en los Andes, la presencia de este cultivo sugiere que abordó las montañas húmedas de Perú y Bolivia, y se habría expandido hacia el norte y sur a lo largo de los declives húmedos andinos, valles interandinos secos y la costa peruana. *Seminario et al.* (2003), León (1964) y Cárdenas (1969) basados en sus propias observaciones y en exploradores antiguos como Bukasov, indican que el yacón se encuentra en estado cultivado y silvestre desde Venezuela y Colombia, hasta el norte de Argentina (Jujuy & Salta), sin embargo; en los últimos años no ha sido reportado su cultivo en estos dos países, mientras en Bolivia, Ecuador y Perú se han hecho más prominentes su cultivo y variabilidad.

Zardini (1991) señala que el cultivo de yacón es escaso en Argentina precisamente en las provincias de Jujuy como Salta, encontrándose al borde de la extinción. En Bolivia se cultiva en los departamentos de Tarija, Chuquisaca, Cochabamba y La Paz; sin embargo, no hay estudios recientes del área cultivada en estas provincias salvo en el departamento de La Paz, dónde probablemente haya la mayor área cultivada y la mayor diversidad de germoplasma (Grau & Rea, 1997).

En Ecuador se ha recolectado germoplasma en las provincias de Carchi, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja (Tapia *et al.*, 1996). *Seminario et al.* (2003) señalan que en el Perú su cultivo se distribuye en el área alto

en 18 departamentos (Ancash, Amazonas, Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Huancavelica, Junín, Lima, Lambayeque, La Libertad, San Martín, Piura, Puno y Pasco). Según Grau y Rea (1997) el sureste de Perú posee la diversidad más grande de germoplasma, en los valles alrededor de Cusco al este de Puno. Otra región de diversidad y cultivo generalizado se encuentra en el norte de Perú, particularmente la provincia de Cajamarca y el área cercana a la frontera ecuatoriana.

Yacón se cultiva en muchas regiones alrededor de los Andes y en la mayoría de los casos solo unas cuantas plantas son destinadas al consumo familiar y raramente comercializada a nivel local. Hace más de 40 años el yacón dejó de ser un cultivo importante en las provincias donde más se comercializaba en la época de verano, siendo desplazado por el auge de la uva en las comunidades de Socchodón y Chapolan (Cajamarca). En la comunidad de Hualqui (Cajamarca) el cultivo, comercialización y trueques son prácticas muy antiguas y vigentes en la actualidad. Otras comunidades de Cajamarca también se pueden mencionar como Asunción, Namora, Matara y San Marcos, así como en La Libertad (Otuzco) y Piura (Ayabaca) donde es frecuente la venta local de esta tuberosa y su producción para el autoconsumo y las ventas en pequeños mercados locales. A nivel general se ha aumentado el consumo de yacón en todo el país.

2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

De acuerdo al Internacional Plant Names Index (I.P.N) y Bolivia Checklist (2009), la clasificación taxonómica del yacón se representa en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Smallanthus sonchifolius*.

TAXONOMÍA	
REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Asterales
FAMILIA	Asteraceae
SUBFAMILIA	Asteroideae
TRIBU	Millerieae
GÉNERO	<i>Smallanthus</i>
ESPECIE	<i>S. sonchifolius</i> (Poepp. & Endl.) H. Robinson

FUENTE: Plant Names Index

2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Smallanthus sonchifolius (yacón) es una planta perenne, perteneciente a la Familia Asteraceae, denominada también Compositae. Inicialmente clasificada en el Género *Polymnia* por Wells (1965), posteriormente fue reclasificada por Robinson (1972) en el género *Smallanthus*, antes propuesto por Mackenzie (1933), el cual se caracteriza por un patrón de estrías presentes en el fruto (Seminario *et al.*, 2003).

La raíz reservante puede variar en forma y tamaño, diversos factores como la variedad, el tipo de suelo, la localidad, entre otros., pueden influenciar. Su peso promedio comprende entre los 300 a 600 gramos. Bajo un sistema de producción poco tecnificado, una planta produce entre dos a cuatro kilogramos de raíces reservantes, aunque con un adecuado manejo agronómico puede llegar cerca a los seis kilogramos (Amaya, 2002).

La corona es un órgano subterráneo sobre el cual se desarrollan abundantes yemas vegetativas. Se forma por el engrosamiento de la parte del tallo que se encuentra unida a las raíces. Sus tejidos almacenan sustancias de reservas en forma de carbohidratos simples

y fructooligosacáridos, los cuales posiblemente sirven de alimento a las yemas cuando estas van a brotar (Seminario *et al.*, 2003).

Presenta hojas grandes, pubescentes en el haz y el envés, poseen forma ovalo-hastadas y auriculadas en la parte basal y media, óvalo-lanceoladas en la parte superior y se distribuyen de forma opuesta y alterna a lo largo del tallo. La parte superior de la hoja es triangular y hastada, aproximadamente mide 33cm de largo por 22cm de ancho, con borde dentado, parte inferior con raquis alado y auricolados en la base. Se producen entre 13 a 16 pares de hojas grandes hasta el momento de floración, al término de ésta sólo se producen hojas pequeñas. (Zardini, 1991).

Seminario *et al.* (2003) mencionan que la rama floral es terminal de ramificación dicásica, compuesta de inflorescencias llamadas capítulos, cada rama floral puede presentar entre 20 a 40 capítulos y cada capítulo está conformado por flores femeninas y masculinas.

Las flores femeninas (zigomorfas) se ubican en el verticilo externo, cuya parte más vistosa y coloreada de amarillo es la lígula, abren antes que las flores masculinas posiblemente para evitar la autopolinización y por lo general se marchitan antes que las últimas flores masculinas. Estas últimas son tubulares y más pequeñas, se ubican en los verticilos internos del receptáculo.

El involucreo es acampanado y hemisférico, con brácteas involucrales de 5 a 6 en una sola serie envolviendo al receptáculo. Uniendo al capítulo está el pedúnculo que mide unos 35 a 37 cm. cada capítulo presenta entre 14 a 16 flores femeninas y entre 80 a 90 flores masculinas. La representación de los órganos de yacón (raíces reservantes, hojas, corona e inflorescencia) se visualizan en la Figura 1.

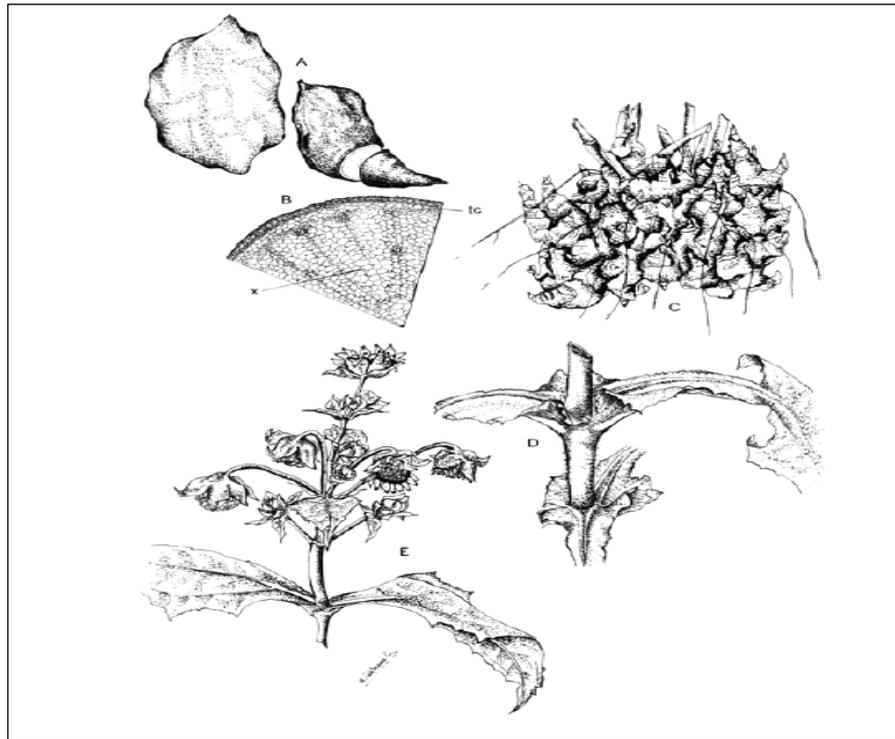


Figura 1. Órganos del yacón. (A) raíces reservantes. (B) detalle histológico de la raíz reservante en corte transversal: x, tejido xilemático; tc, tejidos corticales. (C) cepa o corona. (D) rama de la inflorescencia. (E) disposición de las hojas en el tallo.

FUENTE: Seminario *et al.* (2003).

2.4. NÚMERO CROMOSÓMICO

Se han realizado diversos estudios en relación al número cromosómico en yacón y cada vez más detallados. El primer reporte de conteo cromosómico ($2n=60$) fue publicado por Heiser (1963), trabajando con material ecuatoriano. Un año después se reportó ($2n=32$) usando material obtenido en Perú (León, 1964) y luego de dos años Talledo y Escobar (1996) reportaron al yacón como un tetraploide ($2n=60$) trabajando con material peruano. Sin embargo, según Grau y Slains (1996) señalaron la posibilidad de un estado alotetraploide que surge con la hibridación de *S. macroscyphus* o *S. riparius* como uno de los padres putativos. Soto (2012), Salgado Moreno (1996) e Ishiki *et al.* (1997) realizaron estudios más detallados trabajando con 14 clones provenientes de Ecuador (uno), Perú (ocho), Bolivia (cuatro) y argentina (uno) los cuales mostraron que todos menos uno tenía

un número cromosómico de $2n=58$, este número también fue observado por Frías *et al.* (1997) en un material proveniente del noreste de Argentina. El clon restante tenía un valor de $2n=87$.

Los estudios de Ishiki *et al.* (1997) fueron consistentes con la teoría de la alopoliploidia del yacón (Figura 2.), sugiriendo que el cariotipo del yacón está compuesto de dos genomas, además proponen un octoploide ($6A+2B$) como estructura dominante en la mayoría de clones de yacón $2n=58$, mientras que para explicar los clones $2n=87$ se propone un dodecaploide ($9A+3B$). El yacón como cultivo clonal puede exhibir una considerable diversidad en el número cromosómico. Además, otro aspecto a ser considerado es la presencia de cromosomas B reportado en otras taxas de *Smallanthus*, lo cual podría ser un factor muy importante que afecte los resultados (Ishiki *et al.*, 1997 citado por Soto, 2012). Todas las premisas mencionadas indican una perspectiva aún borrosa, debido a los diferentes resultados en cuanto al número cromosómico de yacón. Fernández *et al.* (2013) mencionan que el grado de ploidía puede afectar el contenido de FOS y su distribución según el grado de polimerización.

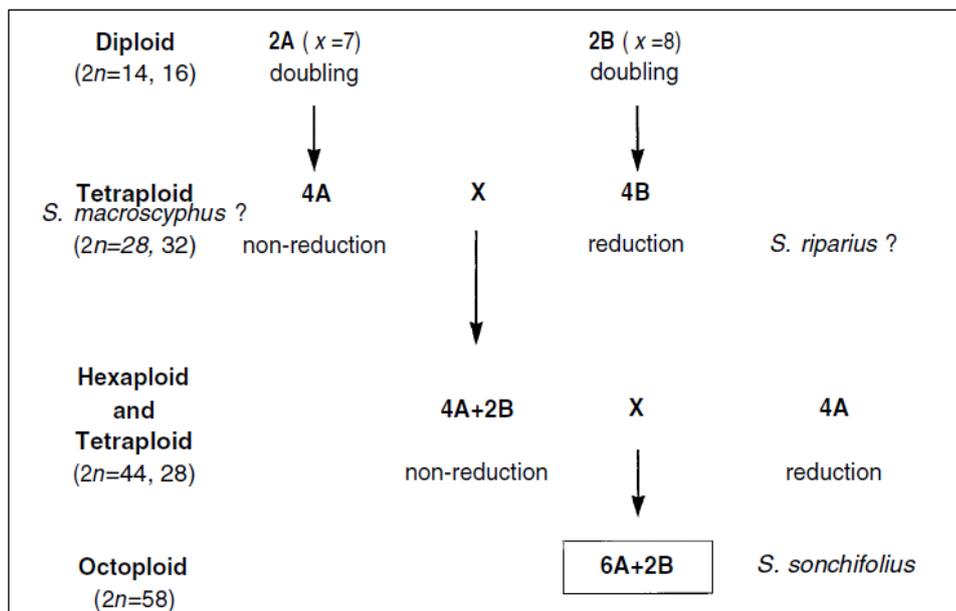


Figura 2. Evolución hipotética de yacón. FUENTE: Ishiki *et al.* 1997, modificado por A. Grau.

2.5. SISTEMA REPRODUCTIVO

Grau & Rea (1997) citado por Seminario *et al.* (2003) indican que el yacón es una planta de polinización cruzada. Se sabe que el yacón posee la característica de protoginia, la apertura y receptividad de las flores femeninas se da antes que las flores masculinas liberen el polen, siendo un indicador de polinización cruzada y que necesita de agentes polinizadores. Sin embargo, los argumentos más contundentes para sostener este enunciado son: la presencia de acúleos (espinas) en la superficie, la viscosidad del grano de polen, la viscosidad de las flores femeninas y la secreción de sustancias azucaradas; especialmente en las flores tubulares que hacen que los capítulos sean visitados por varias especies de insectos (Seminario *et al.*, 2003). Mansilla *et al.* (2010) mencionan que el prolongado inicio de la floración y la asincrónica formación de los capítulos en la planta son argumentos adicionales de una polinización cruzada.

La literatura respecto al nivel de reproducción sexual en yacón aún tiene un panorama borroso. Según Grau & Rea (1997) citado por Mansilla *et al.* (2010) la escasa reproducción sexual es un rasgo característico de esta especie cuyo origen no está claro, y se le atribuye a factores como: problemas en la meiosis y la inviabilidad de las semillas. Además, estos autores mencionan que se observó alta esterilidad de los granos de polen en diferentes trabajos de investigación realizados tanto en Argentina como en clones ecuatorianos mediante técnicas de coloración diferencial, lo que explicaría su escasa reproducción sexual.

Fisher y Wells (1962), Wells (1971) observaron granos de polen aberrantes en muchas especies de *Smallanthus* generados probablemente por los casos de meiosis irregular. Sin embargo, según Frías *et al.* (1997b) la meiosis parece ser normal en yacón a pesar de su alto nivel de ploidía y posiblemente su origen híbrido. Por otro lado, Seminario *et al.* (2003) citado por Mansilla *et al.* (2010) sugieren que la reducida reproducción sexual no es debido a la esterilidad de los granos de polen, ya que Soto (1997) desarrolló un material élite de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) mediante técnicas de mejoramiento por tinción con aceto carmín y encontró una alta viabilidad del polen (Soto, 2012). Los resultados de

las investigaciones de Meza (1995), Sugiura *et al.* (2007) y Mansilla *et al.* (2010) sugieren que el yacón presenta una escasa o nula producción de semillas sexuales y viables. Por el contrario, los resultados reportados por Chicata (1998) señalan una alta viabilidad (29.1 por ciento) en las semillas colectadas de 67 accesiones que crecieron en Cusco, de las cuales la viabilidad representa un 64,9 por ciento del total de semillas llenas. Apoyando los resultados obtenidos por Chicata, Manrique *et al.* (2014) mencionan que la germinación y viabilidad de las semillas llenas es relativamente alta (encima de 38 por ciento), al trabajar con seis accesiones de yacón cultivadas en el distrito de Ambo (departamento de Huánuco) y sugiriendo que la producción de semillas es influenciada por varios factores, entre los cuales podrían destacar el ambiente (localidad, temperatura, altitud, etc.), la fecha de siembra de los parentales, la fecha de las polinizaciones y la fecha de cosecha de los frutos.

Cavers *et al.* (2000) y Gutterman (2000) mencionan que la altitud y las condiciones de suelo y clima (temperatura y humedad) son factores que influyen en la calidad y cantidad de semillas producidas en diferentes especies de plantas, además la pérdida de la viabilidad en las semillas está en función de la temperatura y condiciones de almacenamiento, entre otros factores según Bernal-Lugo *et al.* (2000).

En cuanto a la propagación del yacón, es comúnmente vegetativa a través de los rizomas; esta forma de propagación permite mantener la estabilidad genética de la planta debido al alto nivel de ploidía que tiene el yacón, pues la condición octoploide y dodecaploide constituye un factor limitante para los cruzamientos en el campo (Svobodová *et al.*, 2013). Debido a los altos niveles de propagación vegetativa y la selección a largo plazo para obtener las características deseadas, la divergencia genética entre las variedades de yacón es muy baja.

2.6. PROPIEDADES MEDICINALES ATRIBUIDAS

Las raíces reservantes del yacón son consideradas un recurso promisorio, ya que contienen cantidades significativas de fructooligosacáridos (FOS). La evidencia científica disponible

sustenta el reconocimiento de los FOS como fibra dietética y como prebióticos; al estimular selectivamente la proliferación de un grupo de bacterias benéficas en el tracto digestivo mejorando así el balance intestinal. Seminario *et al.* (2003) refieren que evita la proliferación de bacterias putrefactivas y nocivas del colon al disminuir el pH, debido a la fermentación del polímero que produce ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta (butirato, propionato y principalmente acetato). Pedreschi (2003) comprobó la capacidad de aquellas bacterias probióticas para fermentar los FOS, obteniendo como resultado la degradación de 1-kestosa por dos cepas de lactobacilos (*L. plantarum* NRRL B-4496 y *L. acidophilus* NRRL B-1910).

Los FOS cumplen con todos los criterios de clasificación como prebióticos, siendo fermentados selectivamente por uno o un número limitado de bacterias potencialmente beneficiosas en el colon (Gibson *et al.*, 1995). Los beneficios reportados de las bacterias probióticas incluyen inmunopotenciación, competencia con bacterias putrefactivas y patógenas (bacteroides, *Escherichia coli* y cocos anaeróbicos), producción de ácidos grasos volátiles que proporcionan energía metabólica para el huésped, acidificación del intestino e inhibición del crecimiento de patógenos (Sghir *et al.*, 1998; Gmeiner *et al.*, 2000).

Estudios realizados con animales de laboratorio (roedores) muestran una fuerte evidencia que los FOS reducen el nivel de lípidos en la sangre (Delsenne *et al.*, 1993; Delsenne *et al.*, 1995; Fiordaliso *et al.*, 1995; Kok *et al.*, 1996; Delzenne y Kok, 1999; Andersson *et al.*, 2001; Grau y rea, 1997 y Foy, 2005). Así también Collantes (2009) estudió el efecto de yacón en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos plasmáticos en pacientes dislipidémicos, llegando a la conclusión que el consumo diario reduce significativamente los niveles promedio de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), colesterol total y triglicéridos sin modificar los niveles de HDL colesterol.

Genta *et al.* (2009) investigaron los efectos del jarabe de yacón sobre la obesidad y la resistencia a la insulina en mujeres pre-menopáusicas obesas con resistencia a la insulina, obteniendo resultados beneficiosos para la salud como la pérdida de peso corporal, además de la disminución en los niveles de insulina sérica en ayunas. El consumo del jarabe de yacón aumentó la frecuencia de defecación y la sensación de saciedad. El efecto hipolipidémico de las raíces de yacón también fue estudiado por Habib (2011) trabajando

con ratas diabéticas dotándolas de un suplemento dietético a partir de harina de yacón conteniendo el nivel deseado de FOS, durante el periodo del estudio las ratas no variaron significativamente su peso corporal, interesantemente hubo una disminución significativa en el triglicérol plasmático en ayunas y una mayor cantidad de células pancreáticas positivas a la insulina. Por otro lado, otros estudios dirigidos a obtener los mismos resultados en el hombre (Davidson *et al.*, 1998; Brighenti *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1996; Ellegard *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 1997; Alles *et al.*, 1999) no han demostrado con certeza el efecto significativo en la reducción de lípidos.

Yamashita *et al.* (1984) & Russo *et al.* (2015) han reportado el efecto positivo de los FOS en las personas diabéticas de tipo dos mejorando significativamente los parámetros sanguíneos respecto al nivel de colesterol e índice glicémico. Sin embargo, estos beneficios han sido cuestionados por Roberfroid (1993) y otros investigadores (Alles *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2000) quienes mencionan que el consumo de FOS no afecta el nivel de glucosa ni el nivel de lípidos en estos pacientes. Mayta *et al.* (2001) reportaron que el consumo de raíces frescas de yacón tiene un efecto hipoglicemiante en sujetos clínicamente sanos y según Aybar *et al.* (2001) el extracto de agua de yacón produce un aumento en la concentración de insulina en plasma, resultados obtenidos a través de sus experimentos en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina. Dada la controversia, no es preciso recomendar su uso en pacientes hipoglicémicos para mejorar sus condiciones de salud, ya que hacen falta aún muchos estudios que corroboren este beneficio.

Sousa *et al.* (2015) reportaron la actividad antioxidante en la harina de yacón estéril, siendo los compuestos fenólicos (ácidos clorogénico, ferúlico, cafeico y sus derivados) responsables de esta acción (Muñoz, 2007). Forville *et al.* (2014) también identificaron una fuente de compuestos fenólicos y compuestos flavonoides con propiedades antioxidantes en los extractos de flores de yacón. Los ácidos cafeico, clorogénico y ferúlico fueron los primeros en ser determinados por HPLC en un extracto de acetato de etilo de hojas de yacón, correlacionando el contenido de fenoles con la capacidad antioxidante atribuida a los extractos de raíz y hojas (Valentova y Ulrichova, 2003; Jirovsky *et al.*, 2003)

La capacidad antioxidante también es mencionada por Russo *et al.* (2015) quienes utilizaron extractos de hojas secas de *Smallanthus sonchifolius* maceradas en solventes de polaridad creciente (n-hexano, Cloroformo & metanol).

2.7. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Entre el 83 a 90 por ciento del peso fresco de las raíces de yacón es agua, a diferencia de otras raíces comestibles. El yacón no almacena material de reserva en forma de almidón, sino acumula entre el 50 al 70 por ciento de sus carbohidratos en forma de fructooligosacáridos (FOS) y el resto en forma de sacarosa, fructosa y glucosa (Ohyama *et al.*, 1990; Asami *et al.*, 1991; Nieto, 1991; Collazos *et al.*, 1993; Hermann *et al.*, 1999). Las proporciones relativas de oligofruktanos y los monosacáridos fluctúan significativamente durante el ciclo de crecimiento y después de la cosecha (Asami *et al.*, 1991; Fukai *et al.*, 1995), lo que lleva a un aparente resultado contradictorio según lo reportado por Ohyama *et al.* (1990) que indican que los oligofruktanos representan solo el 20 por ciento, en vez del 67 por ciento informado por Asami *et al.* (1991). Es importante mencionar que el punto de divergencia de tales resultados podría partir del tiempo en el uso del material a procesar. Ohyama *et al.*, (1990) usaron material después de más de tres meses de almacenamiento en frío, mientras que el equipo de Asami utilizó las raíces inmediatamente después de la cosecha. También se reportaron trazas de almidón e inulina (Grau & Rea, 1997).

Takasugi y Masuda (1996); Yan *et al.* (1999); Takenaka *et al.* (2003) mencionan que las raíces reservantes acumulan además cantidades importantes de potasio, compuestos fenólicos (Simonovska *et al.*, 2003) como ácido clorogénico, ácido ferúlico y ácido cafeico y varias fitoalexinas con actividad fungicida presentes en hojas y raíces. Takenaka *et al.* (2003) identificaron cinco derivados del ácido cafeico en raíces de yacón; dos de estos comprendían el ácido clorogénico (ácido 3- cafeoilquínico e ácido 3,5-dicafeoilquínico) y el resto son representados por ésteres del ácido cafeico e altrárico: ácido 2,4 o 3,5-dicafeoilaltrárico; ácido 2,5dicafeoilaltrárico; ácido 2, 3, 5 o 2, 4, 5-tricafeoilaltrárico. Valentová & Ulrichová (2003) identificaron, dos compuestos fenólicos citados, quercetina

y otros dos flavonoides. En comparación con otras raíces o tubérculos, el yacón posee una elevada cantidad de compuestos fenólicos cerca de 200mg/ 100g⁻¹ de materia fresca.

El contenido de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales es bastante bajo. Según Manrique & Párraga (2005) el mineral más abundante es el potasio que existe en cantidades significativas y representa en medida 230mg/100g⁻¹ de materia fresca o entre uno a dos por ciento del peso seco. En menores cantidades son encontrados el calcio, fósforo, magnesio, sodio, hierro, zinc, manganeso y cobre. Algunas vitaminas encontradas representan elementos trazas en la composición, excepto el ácido ascórbico. Entre ellas: retinol, caroteno, tiamina, riboflavina y niacina. Otro compuesto significativo es el triptófano, existente en cantidades medias, $14,6 \pm 7,1 \mu\text{g/g}^{-1}$.

2.8. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

Los fructooligosacáridos (FOS), también conocidos como oligofructanos u oligofructosa, pertenecen a una clase particular de azúcares conocidos con el nombre de fructanos. La estructura fundamental de los fructanos es un esqueleto de unidades de fructosa unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos β (2→1) y/o β (2→6). Es frecuente encontrar adicionalmente una molécula de D-glucosa terminal unida a una fructosa por un enlace α (2→1) (Niness, 1999). Aunque existen varios tipos de fructanos en la naturaleza bajo el punto de vista nutricional y comercial se reconoce a los FOS e inulina como los más importantes, ambos aportan tan solo la cuarta parte del valor calórico de los carbohidratos comunes, son reconocidos como un tipo de fibra dietética y se emplean como insumos para la elaboración de alimentos nutricionales o nutraceuticos (Niness, 1999; Roberfroid, 1999; Roberfroid, 2000).

La inulina se encuentra en muchas plantas como la cebolla, ajo y plátano. En mayores cantidades en topinambur (*Helianthus tuberosus*), achicoria (*Cichorium intybus*) y dalia (*Dahlia* sp.); los FOS se encuentran también en estas plantas, pero en cantidades pequeñas.

En yacón en cambio no existe inulina y el azúcar predominante son los FOS y probablemente sea la planta con el mayor contenido (Seminario *et al.*, 2003).

2.9. CONTENIDO DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS EN LAS RAÍCES TUBEROSAS DE YACÓN

La mayoría de la biomasa de raíces tuberosas está constituida por agua (más del 70 por ciento del peso fresco). Los sacáridos, especialmente los oligofruktanos forman el 70-80 por ciento de su peso en seco (Lachman, 2004). Las raíces de yacón contienen entre 10 a 14 % de materia seca, de la cual el 90 por ciento corresponde a carbohidratos (Manrique & Párraga, 2005). La mayoría de carbohidratos que son almacenados en plantas tuberosas se encuentran en forma de almidón, sin embargo, en *Smallanthus sonchifolius* son almacenados en forma de fructooligosacáridos (FOS) cuya diferencia respecto a la inulina reside en el número de glucosa en la cadena. En la inulina este número varía entre 2 a 60, en cuanto a los FOS los números varían entre 2 a 10. Esto significa que pueden ser considerados como un subgrupo de la inulina, motivo por el cual algunos autores utilizan el término FOS de tipo inulina (Seminario & Valderrama, 2003).

Lachman (2004) cultivó cuatro ecotipos de yacón provenientes de Bolivia, Ecuador, Alemania y Nueva Zelanda obteniendo resultados diferentes en los niveles de FOS y fructosa libre entre los tubérculos y el rizoma, mientras que los niveles de sacarosa y glucosa no presentaron diferencias significativas. En tanto a la influencia de las condiciones climáticas, el nivel de FOS disminuyó en un 48.7 por ciento durante un período de almacenamiento de 140 días a 10 °C, aumentó el contenido de monosacáridos (fructosa en un 9.97 por ciento, glucosa en un 31.4 por ciento) y el contenido de sacarosa en 12.9 por ciento. Si bien el contenido de azúcar puede variar por diversas condiciones ambientales, se puede considerar la siguiente composición en base seca: 40 a 70 por ciento de FOS, 5 a 15 por ciento de sacarosa, 5 a 15 por ciento de fructosa y menos de un cinco por ciento de glucosa (Manrique & Párraga, 2005).

2.10. METABOLISMO DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

Es importante comprender cómo la composición química de los FOS varía en los diversos estados de desarrollo de las raíces. Se puede considerar que la concentración de FOS en las raíces aumenta a medida que la planta madura y posiblemente alcance su máximo valor en el estadio senescente o un poco antes. Después de la cosecha ocurrirá lo contrario, es decir la concentración de FOS disminuirá progresivamente, mientras que los azúcares simples (glucosa, fructosa y sacarosa) se incrementarán. Los procesos de síntesis y degradación de FOS se encuentran bajo control enzimático (Fukai *et al.*, 1997).

En los primeros días de desarrollo de las raíces la concentración de azúcares simples es muy alta y la de los FOS es muy baja, luego intervienen dos enzimas que son las responsables de la síntesis de los FOS (Figura 3). La primera enzima es la sacarosa:sacarosa fructosiltransferasa (SST), la cual cataliza la unión de dos moléculas de sacarosa uniendo el residuo fructosil de una de ellas al residuo fructosil de la otra molécula generándose una glucosa y un oligofructósido o trisacárido 1-kestosa, el fructooligosacárido más sencillo que existe. Este trisacárido sirve de intermediario para la síntesis de los FOS de mayor grado de polimerización (DP); los mismos que pueden ser polimerizados por una segunda enzima fructano fructosiltransferasa (FFT) que transfiere de modo irreversible un fructosil al fructano con el grado de polimerización mayor o igual a tres moléculas de 1-kestosa. De esta manera se llegan a formar todos los tipos de FOS que existen en las raíces de yacón.

Cuando las plantas han terminado el estado de senescencia comienzan a emerger los nuevos brotes y los FOS comienzan también su conversión en azúcares simples. Rutherford (1981) demostró que el metabolismo de los fructooligosacáridos se encuentra relacionado con las etapas de dormancia y brotación en los bulbos de cebollas. Este proceso es activado por la enzima fructano hidrolasa (FEH) representado en la Figura 3., la cual actúa liberando progresivamente las moléculas de fructosa que se localizan en posición terminal dentro de la cadena de los fructooligosacáridos, este mecanismo enzimático posiblemente es encendido dentro de la planta con la finalidad de emplear los fructanos como fuente de energía para el rebrote (Fukai *et al.*, 1997). También podría

explicar la razón por la cual el contenido de FOS disminuye en las raíces después de que éstas han sido cosechadas y aumentan los fructanos de bajo grado de polimerización, disacáridos y monosacáridos.

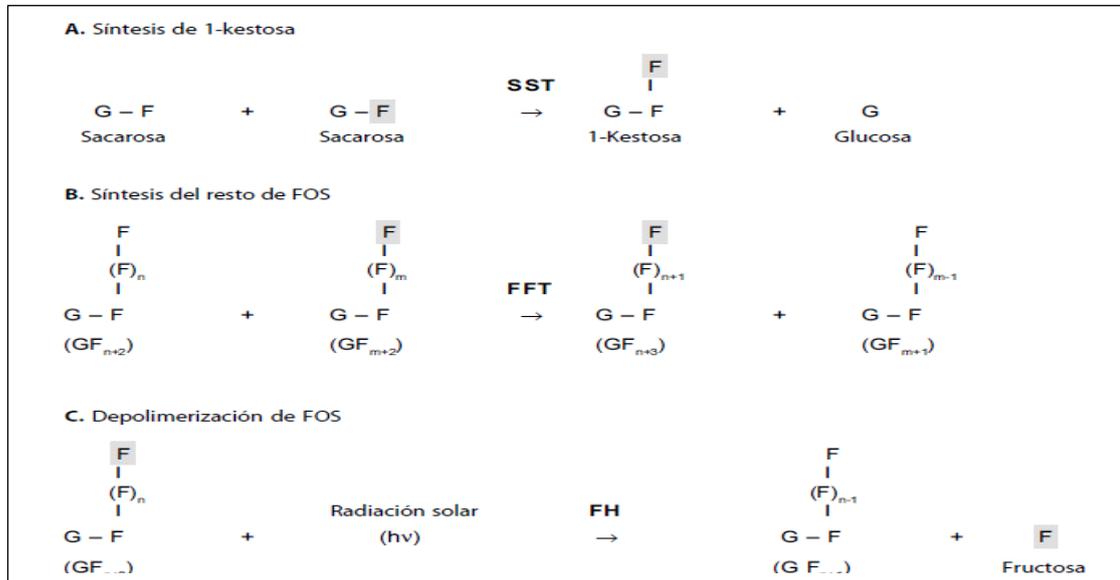


Figura 3. Metabolismo de fructooligosacáridos (FOS). (A) Síntesis de 1-kestosa: la enzima sacarosa:sacarosa fructosil transferasa (SST) cataliza la unión de dos moléculas de sacarosa para producir una molécula de 1-kestosa más una molécula de glucosa. (B) síntesis de FOS con más de dos unidades de fructosa. La enzima fructano: fructano fructosil transferasa (FFT) cataliza la unión de dos moléculas de 1-kestosa o la unión de otros dos FOS preexistentes, resultando la síntesis de un oligofructano más grande. (C) Los FOS sintetizados comienzan a degradarse por acción de la enzima fructano hidrolasa (FH) que libera selectivamente la molécula de fructosa que se encuentra en posición terminal y va dejando las moléculas de fructosa y glucosa libre, las que luego será aprovechadas como fuente de energía. FUENTE: Seminario *et al.*, 2003.

2.11. VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE FOS

Aparentemente la conversión de FOS en azúcares simples tiene lugar inmediatamente después de la cosecha. Los trabajos de Graefe *et al.* (2002) indican que la velocidad de conversión es especialmente rápida en los primeros días de poscosecha.

Asami *et al.* (1991) reportaron que el contenido de FOS en raíces almacenadas a una temperatura de 5°C fue significativamente mayor al de las raíces a 25°C. Estos resultados sugieren que la velocidad de conversión puede ser más lenta cuando las raíces son

almacenadas a temperatura de refrigeración. Sin embargo, aun cuando las raíces se almacenen a 5°C existe una tasa importante de conversión de FOS en azúcares simples que no puede ser controlada.

El soleado es una costumbre tradicional que consiste en exponer las raíces al sol con la finalidad de que se vuelvan más dulces para el consumo. Graefe *et al.* (2002) determinaron que la concentración de FOS en las raíces soleadas es la misma e incluso ligeramente mayor que en las raíces frescas, ello se debe a que la proporción de FOS que se convierte en azúcares simples es compensada por la deshidratación de las raíces, es decir que una persona consumiría la misma cantidad de FOS por gramo en raíces soleadas o frescas.

2.12. DEGRADACIÓN DE FRUCTANOS

La despolimerización de fructanos es llevada por la fructano exo-hidrolasa (FEH), enzima responsable de la hidrólisis de estos polímeros, por ruptura de los enlaces β (2 \rightarrow 1) produciendo fructosa libre y polisacáridos de cadena corta (Suzuki & Chatterton, 1996). La defoliación y baja temperatura son condiciones potenciadoras de esta actividad 1-FEH (Asega, 2008). La actividad de la FEH se detecta especialmente en fase de brote y principalmente en la región proximal de los órganos (Portes y Carvalho, 2006). Esta actividad parece presentar una serie de estrategias adaptativas para superar las tensiones de temperatura, nutrición y agua (Mantovani y Martins, 1988). Varios autores indicaron un aumento significativo de la actividad FEH al inducir a la brotación por defoliación en plantas como *V. herbacea* (Asega y Carvalho, 2004; Portes y Carvalho, 2006), *Polymnia sonchifolia* (Fukai *et al.*, 1997), *Cichorium intybus* (De Roover *et al.*, 1999) y *Viguiera discolor* (Degasperi *et al.*, 2003). y/o condiciones de frío en *V. herbacea* (Portes *et al.*, 2008).

La clonación en diferentes especies de plantas que acumulan éstos polímeros ha permitido el estudio y validación de su rol en el metabolismo de fructanos endógenos (suministro de energía, osmorregulación, tolerancia al estrés) (Bieleski, 1993; Vergauwen *et al.*, 2000 &

Van den Ende *et al.*, 1996). La presencia de FEH en plantas que no almacenan fructanos conllevó a la búsqueda de otros roles desempeñados por la enzima, de ahí que Van den Ende *et al.* (2005) y De Coninck *et al.* (2005) le han atribuido distintas actividades (mecanismo de defensa y señalización).

2.13. ESTUDIOS PREVIOS PARA LA OBTENCIÓN DE FEHs.

Asega *et al.* (2008) mencionan la importancia de la clonación de las FEHs de diversas especies para comprender la función en el metabolismo de fructanos en plantas, sometiendo a defoliación (Van den Ende *et al.*, 2001), a recorte (Van den Ende *et al.*, 2003a), y señalización (Van den Ende *et al.*, 2005; De Coninck *et al.*, 2005). Ellos trabajaron en la clonación, caracterización y análisis funcional de un cDNA de 1-FEH de *V. herbácea* siendo uno de sus primeros pasos la verificación de abundancia de la transcripción de FEH en los rizóforos a través del análisis de transferencia Northern blot y una sonda del cDNA de FEH de *C. intybus*. Para la obtención completa de la secuencia del cDNA 1-FEH en *V. herbácea* fue necesario técnicas de PCR y PCR inversa, luego expresado en *Pichia pastoris*.

Michiels *et al.* (2004) trabajaron en el análisis de expresión del gen de una 1-FEH de *C. intybus* utilizando hibridación de transferencia Northern y una sonda marcada para el RNAr 18S de *C. Intybus*, además se realizó la amplificación genómica mediante técnicas de PCR y clonación con el vector pGEMT-easy. Estos métodos para la clonación y secuenciamiento de FEHs también han sido descritos por diversos autores como: Tamura *et al.* (2011) en el estudio de la 6-FEH1 en *Pheum pratense* inducido transcripcionalmente por defoliación, Van den Ende *et al.* (2005) en el estudio de clonación, caracterización y análisis funcional de 6-kestosa exohidrolasas (6-KEHs) del trigo (*Triticum aestivum*), entre otros.

2.14. TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA LA OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS PARCIALES DEL GEN FEHs

2.14.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica muy común hoy en día e indispensable en los laboratorios de investigación y clínico. Saiki *et al.* (1988) señalan su uso en trabajos que incluyen la clonación de ADN, secuenciación, clonación y manipulación de genes, construcción de filogenias basadas en ADN o análisis funcional de genes, diagnóstico y monitoreo de enfermedades hereditarias y amplificación de ADN. Ninfa *et al.* (2004) lo refieren en análisis de huellas digitales genéticas para el perfil de ADN y en detección de patógenos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. La técnica consiste en crear múltiples copias a partir de una plantilla de replicación haciendo uso de la enzima ADN polimerasa y cebadores que contienen secuencias complementarias a la región diana permitiendo así una amplificación selectiva.

2.14.2. PCR inversa (IPCR)

La PCR puede simplificar y mejorar la clonación de ADN, sin embargo, es difícil aislar copias de ADNc completas a partir de ARNm ya que la base de información de la secuencia es muy limitada y la secuencia desconocida que flanquea al tramo de ADN de secuencia conocida no puede ser amplificado por el método convencional de PCR (Cheng y Janes, 2002). El método de la IPCR permite resolver este problema, ya que la clonación del ADN va desde un tramo de secuencia conocida hasta el flanco de la región desconocida con ayuda de cebadores específico del gen. (Huang *et al.*, 1990 y Delort *et al.*, 1989). Esta técnica es rápida, eficiente y permite conocer las regiones flanqueantes de un gen en un solo protocolo, solamente conociendo una región intermedia del gen y consta de cinco pasos: transcripción inversa, síntesis de ADNc de segunda cadena, circularización de ADNc de doble cadena, corte y linealización del círculo de ADN y la amplificación del fragmento de ADN inverso. Es necesario el diseño de un juego de primers específicos en

sentido inverso para obtener la secuencia de los extremos. Éstos al estar finalmente ubicados entre ambos cebadores ya sea por el uso de enzimas de restricción o por tratamiento de desnaturalización con NaOH (Cusi *et al.*, 1992 y Lau *et al.*, 1993), se pueden amplificar fácilmente como una PCR convencional.

2.14.3. Nested PCR

La reacción en cadena de la polimerasa anidada o Nested PCR, es una modificación de la PCR destinada a reducir contaminaciones. Esta PCR no tradicional requiere dos juegos de cebadores; el primer juego reconoce a las regiones más extremas del ADNc de interés y el segundo juego reconoce una secuencia que se encuentra entre los más externos y abarca específicamente la región de interés ubicada dentro del primer producto dado. El segundo conjunto de cebadores sólo debe amplificar el producto de la primera ronda de amplificación y no un producto inespecífico. Esto permite ejecutar un mayor número de ciclos y minimizar productos indeseados. La técnica es útil para muestras con baja expresión de ARNm y, si bien la PCR convencional requiere cebadores complementarios a los extremos de la secuencia diana del ADN y aumenta exponencialmente los productos de amplificación, genera también productos inesperados debido a la inespecificidad de unión de los primers a las regiones del ADN (Cheng y Janes, 2002).

2.14.4. Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE)

Existen varias técnicas moleculares para hallar las regiones no codificantes de un gen como es el sistema RACE. Los obstáculos para obtener estos extremos radican en la naturaleza de sus secuencias, ya que siendo regiones flanqueantes del gen disponen de secuencias que no se traducen a proteínas. Las regiones de genes no traducidas (UTR), incluidos los extremos 5' y 3' y los intrones son las principales regiones involucradas en la regulación de la expresión (Barrett *et al.*, 2012). Contienen por lo general sitios de unión a proteínas, promotores o potenciadores de la traducción. La región 5' es sumamente

importante para la estabilidad de la molécula de ARNm y la modificación de la eficacia en el proceso de traducción (Meyer y Wahle, 2004).

La amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) denominada también como PCR anclada (Loh *et al.*, 1989) o PCR unilateral (Ohara *et al.*, 1989) utiliza en el caso del RACE 5' un cebador que reconoce una parte de la región intermedia conocida en el proceso de la transcripción inversa, generando un producto del ADNc monocatenario que lleva la región flanqueante del extremo 5' de interés, a este cebador se le denomina cebador específico de gen (GSP 1) luego se utiliza la enzima desoxinucleotidil transferasa (TdT) cuya función es agregar nucleótidos idénticos conocido como "cola homopolimérica" al extremo 3' del ADNc. Por último, se lleva a cabo una reacción de PCR usando una mezcla de tres cebadores: un cebador específico del gen (GSP2) y una combinación del cebador complementario de anclaje que contiene una región homopolimérica y un cebador adaptador. La técnica permite la amplificación de secuencias desconocidas entre el GSP2 y el extremo 5' del ARNm (<https://www.thermofisher.com/pe/en/home/references/protocols/nucleic-acid-amplification-and-expression-profiling/cdna-protocol/5-race-system-for-rapid-amplification-of-cdna-ends.html>).

Por otro lado, el RACE 3' aprovecha la cola poli A natural que posee el extremo 3' de todos los RNAm de origen eucariota a través del uso de un cebador oligo dT que se utiliza en la transcripción inversa y genera el DNAc monocatenario, además agrega una secuencia adaptadora al extremo 5' de cada DNAc. La PCR se utiliza para amplificar el ADNc 3' de una región conocida usando un GSP y un cebador antisentido complementario a la secuencia adaptadora, esto permite la captura de secuencias de ARNm 3' desconocidas que se encuentran entre el exón y el poli (A) (Frohman y Martin, 1989)

2.15. FAMILIA GLUCOSIL HIDROLASA

Las glicosido hidrolasas son un amplio grupo de enzimas responsables de hidrolizar el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y un resto no carbohidrato. Se ha demostrado que las glicosido hidrolasas (GH) desempeñan papeles únicos en diversos procesos biológicos como: biosíntesis de glicanos, metabolismo de la

pared celular, defensa de plantas, señalización y la movilización de reservas de almacenamiento (Lammes *et al.*, 2009).

Las glicosil hidrolasas de la familia 32 comprenden dos dominios distintos. El dominio N-terminal, que forma una hélice beta de cinco palas, y el dominio C-terminal, que forma una estructura beta tipo sándwich (Alberto *et al.*, 2004) y comprenden invertasas de tipo ácido (pared celular y tipo vacuolar en plantas), exo-inulinasas bacteriano, levanasas, plantas exohidrolasas de fructanos (FEH), y enzimas biosintéticas de fructano (FBE) en plantas mientras, la familia de GH68 incluyen levansucrasas bacterianas, inulosucrasas y algunas β fructofuranosidasas.

Las invertasas dividen la sacarosa en glucosa y fructosa por escisión del enlace α 1- β 2-glucosídico. En plantas las invertasas se encuentran separadas en dos familias GH: ácido invertasas (invertasa de pared celular e invertasa vacuolar), asignadas a GH32 mientras que las invertasas alcalinas / neutras a GH100, ya que las secuencias de aminoácidos deducidas de las enzimas GH100 no comparten similitud con las secuencias de ácido invertasas. El pliegue estructural y mecanismo catalítico exacto de los miembros de GH100 aún no se ha dilucidado. Las enzimas ácido invertasas hidrolizan preferentemente sacarosa (con un Km bajo) pero también pueden degradar otros pequeños sustratos donantes con una cadena principal de sacarosa tal como 1-kestosa, rafinosa y estaquiosa. Fructanos más largos como la inulina y levan son sustratos pobres pero la actividad residual puede ser detectada (De Coninck *et al.*, 2005; Verhaest *et al.*, 2007). Las invertasas neutras / alcalinas no tienen las características típicas de invertasas ácidas de plantas y la sacarosa parece ser su único sustrato (Sturm *et al.*, 1999; citado por Lammes *et al.*, 2008).

A diferencia de exo-inulinasas microbianas y levanasas, todas las FEH de plantas caracterizadas hasta la fecha no pueden degradar la sacarosa, además este sustrato puede actuar como un inhibidor de muchas isoformas de FEHs (De Roover *et al.*, 1999; Van Riet *et al.*, 2008), mientras que ningún efecto inhibitorio de sacarosa se puede observar para otras isoformas FEH (Claessens *et al.*, 1990; Van Riet *et al.*, 2006). Se postuló que la

sacarosa regula directamente la actividad de algunos FEH (De Roover *et al.*, 1999). Además, es probable que las FEH de plantas evolucionaron a partir de las invertasas de pared celular mientras que las FBE de invertasas vacuolares (Van den Ende *et al.*, 2002) y la síntesis de fructanos se origine en vacuolas de sacarosa por acción de dos o más FBE diferentes de acuerdo a su aceptor preferencial y sustrato donador.

Las fructosiltransferasas bacterianas (FTF) catalizan dos diferentes reacciones, dependiendo de la naturaleza del aceptor dando como resultado la transglicosilación cuando se usa una cadena de fructano como aceptor o en hidrólisis cuando el agua se usa como aceptor (Ozimek *et al.*, 2006). En contraste con las plantas, las especies bacterianas usan una sola enzima para la biosíntesis de fructano. La mayoría de las bacterias producen fructanos de tipo levano mediante levansucrasas. Estas enzimas producen levanos de alto DP solubles (20 kDa a varios MDa) y son las fructasiltransferasas bacterianas (FTFs) más estudiadas. Levansucrasa es capaz de catalizar la hidrólisis de sacarosa y la polimerización de levano. La sacarosa puede ser utilizada como un único sustrato y actuar como donante y aceptor de fructosilo. La levansucrasa de *Bacillus subtilis* hidroliza sacarosa en glucosa y fructosa en concentraciones inferiores de sacarosa (< 250 mM), mientras que la producción de levano ocurre a concentraciones más altas de sacarosa (> 250 mM) (Chambert *et al.*, 1974; Meng y Fütterer, 2003; citado por Lammes *et al.*, 2008).

2.16. CRISTALIZACIÓN ENZIMÁTICA

La cristalización de proteínas es el proceso de formación de un cristal de proteína, se usa predominantemente con fines científicos o industriales, a través de técnicas como: cristalografía de rayos X y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de proteínas. Al igual que muchos otros tipos de moléculas, las proteínas pueden inducirse a formar cristales cuando la solución en la que se disuelven se sobresatura. En estas condiciones, las moléculas de proteínas individuales pueden empacarse en una matriz repetitiva, mantenidas juntas por interacciones no covalentes (Rhodes, 2006). Estos cristales pueden usarse luego en biología estructural para estudiar la estructura molecular de la proteína o para diversos fines industriales o biotecnológicos.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. MATERIAL VEGETAL

Las accesiones (PER018283, PER018279) de yacón fueron obtenidas de la estación experimental agraria “Baños del Inca” –Cajamarca, perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). El estado fenológico indicó plantas de tamaño adulto con la presencia de raíces tuberosas entre tres a cuatro por planta. La cosecha de raíces reservantes para la extracción de ARN total se realizó en los meses de enero – marzo de 2016, dónde la temperatura osciló entre 26°C a 30°C (La Molina-Lima. Perú), previamente las plantas fueron inducidas a la expresión de la enzima mediante defoliación y su procesamiento para el inicio a la extracción incluyó lavado, corte e inmersión de las raíces reservantes en una solución de ácido ascórbico 0.1 M para evitar su oxidación.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

La extracción de ARN total se realizó mediante los protocolos (CTAB, Buffer de lisis LiCl 0.1M, TRIzol & RNeasy Mini Kit-Qiagen; Anexos: 1, 2, 3& 4), siguiendo las pautas y recomendaciones descritas por sus respectivos autores (Lodhi *et al.* 1994, Verwoerd *et al.* 1989, Chomczynski *et al.* 1987, Qiagen. Germany). Se cuantificó el producto de la extracción mediante el espectrofotómetro EpochTM y se visualizó la integridad del ARN por electroforesis. Los resultados obtenidos a través de las cuantificaciones permitieron

distinguir entre los protocolos de extracción utilizados y discriminar aquellos menos favorables para las características putativas de las raíces reservantes de yacón.

3.2.2. OBTENCIÓN DE AMPLICONES

Se diseñaron cebadores específicos a partir del alineamiento de fructanos exohidrolasas de plantas emparentadas con *Smallanthus sonchifolius*, los cuales fueron utilizados en la técnica de RT-PCR para la obtención de secuencias parciales del gen FEH, además se empleó un Kit comercial (Qiagen) para su purificación. Las secuencias ya purificadas se clonaron utilizando como vector pGEMT-easy y se enviaron a secuenciar.

3.2.2.1. Diseño de primers

La estrategia que se utilizó fue la obtención de fragmentos traslapados. Su facilidad de clonación en el plásmido y la amplificación de productos PCR de mediano tamaño fueron ventajas para su selección. Los cebadores se diseñaron a partir de alineamientos de secuencias de fructanos hidrolasas relacionadas con la FEH de yacón, siendo éstas: FEHs de *T. aestivum*, denominadas w1 (AJ 516025), w2 (AJ 508387) y w3 (AJ 564996), *C. intybus*, denominadas ciI (AJ 242538), ciIIa (AJ 295033) y ciIIb (AJ 295034), *H. vulgare* (hvul) (AJ 605333), *B. vulgaris* (bvul) (AJ 508534), 1-FEH de *H. tuberosus* (AJW31156), *V. herbácea* (CAJ77148) y *A. lappa* (BAL73222). El programa (MEGA 7) permitió la edición y alineamiento de las mismas y se complementó con la información de porcentajes de formación de hairpins y dímeros proporcionados por el programa PrimerSelect.

3.2.2.2. Obtención de secuencias de la región codificante

Se empleó la técnica de la técnica de RT-PCR, partiendo de la síntesis del ADNc utilizando: 1 µg de ARN total, dNTPs (0.2 mM), en un volumen de 12 µl. Las condiciones

de la desnaturalización fueron de 65°C por el periodo de 5 minutos e inmediatamente a 0°C por 15 minutos, a continuación se agregó 4µl del buffer de la enzima RT, 1µl de transcriptasa reversa (RTasa) de Invitrogen (M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µL)) y se llevó a un volumen final de 20 µl. Las condiciones de la transcripción reversa fueron de 42°C por 50 minutos y luego a una temperatura de 70°C por 10 minutos. El ADNc generado se abordó como nuevo molde en la técnica de PCR utilizándose 1 µl, así como también 1 µl de los cebadores forward y reverse (10pmol), 1 µl dNTPs (10mM), 1 µl de MgCl₂ (25Mm) 0.2 µl Taq ADN polimerasa Kappa y 2 µl de buffer Taq pol, se llevó a un volumen final de 20 µl. Las condiciones de PCR fueron de 94°C por 5 minutos de la etapa de desnaturalización, 40 ciclos de (94°C por 30 segundos, 45°C por 45 segundos y 72° C por 1 minuto), y una temperatura final de extensión de 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1por ciento y posteriormente teñidos con bromuro de etidio.

3.2.2.3. Purificación de productos de PCR

Obtenidos los fragmentos acorde a los esperados, fue preciso purificarlos para su uso en el proceso de clonación. Se utilizó el kit comercial “QIAquick PCR Purification Kit” de la Compañía Qiagen, que contiene tres diferentes buffers y un número determinado de columnas de sílica; el primer buffer utilizado fue el “Binding Buffer” que provee al ADN un pH y concentración de sal adecuado para que el ácido nucleico se absorba y se adhiera a la membrana de sílica que contiene la columna de QIAquick. El siguiente fue el “washing buffer” (PE) utilizado para limpiar aquellas impurezas no deseadas como: sales, enzimas, agarosa, tintes, bromuro de etidio, aceites y detergentes que, si bien no se adhieren a la membrana de sílica, sí fluyen a través de la columna. El etanol contenido en el buffer PE remueve con eficiencia estas impurezas. Por último, se aplicó el “elution buffer” que se utiliza para desprender el ADN de la membrana de sílica, ya que este buffer contiene condiciones básicas y bajas concentraciones de sales.

3.2.2.4. Ligación de los insertos utilizando el vector pGEM-T Easy (Promega)

Con el objetivo de lograr la amplificación de los insertos, se utilizó el sistema pGEM-T Easy (Promega) como vector de clonamiento y se transformó en *E. coli* DH5 α aprovechando la condición de los salientes T en el sitio de inserción que contiene este plásmido. Para la ligación se utilizó 1 μ l del vector, 5 μ l del inserto o producto de PCR purificado, 1 μ l del buffer de ligación 10X, 0.5 μ l de la enzima T 4 DNA Ligase (5U/ μ l), se llevó a un volumen final de 10 μ l e incubó a 22°C por 1 hora.

3.2.2.5. Clonación y Selección de colonias

Se han reportado varios métodos en la literatura para introducir vectores en células competentes. Estos métodos incluyen tratamientos químicos, electroporación, uso de pistola balística, polietilenglicol, ultrasonido, microondas e hidrogel. Para facilidad del estudio se escogió la transformación por choque térmico, que es una técnica básica en la biología molecular para insertar un plásmido o producto de ligación en células competentes sometidas a variantes de temperaturas. El método consistió en una breve incubación de la reacción de ligación a 0°C agregando una mezcla de bacterias químicamente competentes, seguido de una incubación a 42°C por 45 segundos y luego se dispuso nuevamente a una temperatura de 0°C, posteriormente se adicionó medio LB y se incubó a 37°C durante 30 min con agitación. Para corroborar la eficacia de transformación se plaqueó en un medio selectivo LB con ampicilina y X-gal (Froger, A. *et al.*, 2007). La elección de bacterias positivas a la inserción del DNA recombinante tuvo en consideración el número de bacterias por placas, la coloración, tamaño y forma de las colonias. Seleccionadas las colonias, se procedió a incubarlas en medio líquido LB más ampicilina.

3.2.2.6. Purificación de Plásmidos

Llegado al crecimiento óptimo, se sedimentó las células por centrifugación para la eliminación del medio de crecimiento. El sedimento se resuspendió en una solución (I) que

contenía Tris, EDTA, Glucosa y RNasa, su uso evita que las DNasas dañen el plásmido y también ayuda a desestabilizar la pared celular bacteriana, luego se adicionó el buffer de lisis (II), conteniendo hidróxido de sodio (NaOH) y el detergente Dodecyl lauril sulfato de sodio (SDS) que ayuda a solubilizar la membrana y por último el NaOH que ayuda a romper la pared celular y desnaturalizar el ADN; más adelante en el proceso se adicionó el acetato de potasio (solución III) disminuyendo la alcalinidad de la mezcla y en estas condiciones se restablece el enlace de hidrógeno entre las bases del ADN monocatenario. Por último se lavó y concentró el ADN plasmídico para su inmediato uso, ya que en la solución se encuentran sales, EDTA, RNasas, restos de proteína y restos celulares.

3.2.2.7. Comprobación de la inserción y preparación para su envío a secuenciar

La confirmación de la presencia de los insertos en el vector de clonación se efectuó a través de la digestión enzimática utilizando la enzima EcoRI que corta al vector (pGEM T-easy) en dos sitios dentro del sitio de clonación múltiple. El corte con esta enzima liberó al inserto, lo que permitió la visualización de los fragmentos. Una vez digeridos los plásmidos mediante la enzima de restricción, se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento y antes del envío a secuenciar se midió la concentración en ng/uL de cada preparación mediante el uso del espectrofotómetro Epoch TM. Se enviaron las preparaciones a la empresa MacroGen (California, USA) utilizando los cebadores que corresponden a las secuencias de los promotores T7 y Sp6.

3.2.2.8. Edición de secuencias y construcción del árbol filogenético

Recibida las secuencias, se comprobó si éstas correspondían a un fragmento del gen de interés FEH en yacón, luego se editaron utilizando el software Seqman y Editseq (DNA Star, Lasergen 11), se alinearon y acoplaron los fragmentos de las secuencias correspondientes al gen FEH para obtener la secuencia esperada en su mayor porcentaje. Posteriormente al ensamblaje se analizaron por comparación de secuencias mediante la búsqueda de secuencias homólogas de nucleótidos y aminoácidos en la base de datos EMBL Nucleotide Sequence Database (European Molecular Biology Laboratory),

utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990). La secuencia de nucleótidos fue traducida, utilizando el programa Transeq, accesible en la página web del EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/>. El alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, se realizó utilizando el programa MEGA 7, considerando los parámetros predefinidos en el programa. Para el análisis de nucleótidos, así como de aminoácidos se consideró el método de la p-distancia, incluyendo las sustituciones d: transiciones (cambio de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina) + transversiones (cambio de una purina por una pirimidina o viceversa) y tasas uniformes (Tamura *et al.*, 2007).

La construcción del árbol filogenético basada en el análisis de las secuencias de nucleótidos se realizó empleando el programa MEGA 7. La elección del modelo de evolución molecular (Hasegawa-Kishino-Yano model) y la determinación del valor del parámetro Gama, se hizo utilizando el programa MODELTEST integrado en el MEGA 7 (Hasegawa *et al.*, 1985). Se empleó el modelo estadístico de máxima probabilidad ML, empleando como modelo de sustitución WAG (Whelan *et al.*, 2001).

La validación del árbol filogenético se efectuó mediante el Método de remuestreo – Bootstrap (Felsenstein, 1981) con 2000 repeticiones (El método está basado en técnicas de remuestreo, de tal forma que a partir de las secuencias originales se generan pseudoréplicas). Posteriormente se calcula cuántas réplicas agrupan los clusters y esos valores serán los de confianza del nodo del clúster. Los nodos con valores de confianza bajos (menores al 50 por ciento) se colapsan indicando que la filogenia de dicha rama no está clara.

3.2.3. OBTENCIÓN DE EXTREMOS CORRESPONDIENTE A LAS REGIONES NO COFICICANTES DEL GEN FEH

Con el avance en la obtención de la secuencia del gen de la FEH de yacón, la siguiente etapa fue encontrar los extremos del gen, para ello se recurrió a la utilización de técnicas moleculares como: RACE, IPCR y PCR Nested.

Para la obtención de los extremos no codificantes del ARNm se diseñó una nueva batería de primers siguiendo las pautas anteriormente mencionadas, además de la utilización de los kits comerciales RACE 5' Versión 2.0 y RACE 3' (Invitrogen).

3.2.3.1. RACE 5'

Se inició con la de extracción del ARN total a partir de raíces reservantes de yacón, mediante el uso del protocolo CTAB (Lodhi *et al.*, 1994 PMBR 12: 6-13) modificado por R. Torres A., seguidamente se generó la ADNc con ayuda del kit RACE 5' versión 2.0 (Invitrogen) según el protocolo descrito por el fabricante. La técnica utilizó 5 µg de ARN total, GSP1 [9B2R2 (20pmol.)], 1 µl DTT, 1 µl dNTP y se completó hasta el volumen de 20 µl con agua libre de nucleasas (NFW) e incubó a 65 °C por 5 minutos y se llevó a 0°C. A la mezcla se adicionó 6 µl de Buffer RT 5X, 1 µl de la enzima RTasa y se completó hasta un volumen de 30 µl con NFW e incubó a 42° C por 50 minutos y finalmente se inactivó la enzima por 10 minutos a 70°C.

En el siguiente paso se eliminó el ARNm del híbrido ARN: ADN. Se agregó a la preparación anterior 1 µl de ARNasa H e incubó por 30 minutos a 37° C, luego se inactivó la enzima incubándose por 10 minutos a 70 °C. Para la purificación se enrasaron los productos de la transcripción inversa a 300 µl con NFW y se purificó con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) y cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1). En la precipitación se utilizó acetato de amonio 10M y etanol absoluto, se lavó el pellet con alcohol al 70 % y se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente resuspender en 52 µl de NFW. El siguiente paso consistió en la adición de la cola

homopolimérica, para ello se utilizó 30 µl de ADNc (producto purificado de la RT), 9 µl del buffer 5X, 2 µl de dCTP 2mM, 1 µl TdT y 3 µl NFW, se incubó a 37 °C por 15 minutos e inactivó la enzima a 70 °C por 10 minutos. El buffer de la enzima TdT contiene Co, como cofactor el cual inhibe reacciones downstream, por ello fue necesario purificar el ADNc C-Tailed con una extracción Fenol: cloroformo, alternativamente se puede usar buffer PCR ½ X, que contiene Mg, con lo cual; no se hace necesario la purificación pudiéndose hacer directamente la PCR.

Para el mix de PCR se utilizó 10µl del molde purificado anteriormente mencionado; 1µl del primer forward (dG primer adapt), 1µl del primer reverse (9B IPCRRPstI) y 1 µl del primer adapt; 0,3 µl de Taq ADN pol (5U/ µl), 5 µl del buffer 10X, 4 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dNTPs (10mM) y se llevó a un volumen final de 50 µl. Las condiciones de PCR fueron: 94°C por 8 minutos, 50°C por 60 segundos, 65°C por 15 minutos; seguido de una segunda ronda de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de (94°C por 40 segundos, 50°C por 60 segundos, 68°C de 2 minutos) y 72°C por 10 minutos. Finalmente, los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1 por ciento y posteriormente teñidos con bromuro de etidio.

3.2.3.2. RACE 3´

Para RACE 3´ se partió de la extracción de RNA total, a partir de las raíces de yacón por el método de CTAB (Lodhi *et al.*, 1994 PMBR 12: 6-13) modificado por R. Torres A., y seguidamente; la generación de ADNc obtenido con ayuda del kit RACE 3´ (Invitrogen) utilizado según las indicaciones del protocolo descrito por el fabricante. El procedimiento fue similar al RACE 5´, cuya diferencia se basó en la generación del ADNc con el dT primer adaptador, apoyándose en la presencia de la cola poli A natural en el extremo 3´ del ARNm. Se utilizó 5 µg del ARN total, GSP1 [dT primer Adapt (20pmol)], 1 µl DTT, 1 µl dNTP y se completó hasta un volumen de 20 µl con NFW e incubó a 65°C por 5 minutos y se llevó a 0°C, luego se adicionó a la mezcla 6 µl de Buffer RT 5X, 1 µl de la enzima RTasa y se completó hasta un volumen de 30 µl con NFW e incubó a 42°C por 50 minutos

e inactivó la enzima por 10 minutos a 70°C. Por último fue necesario la purificación del ADNc con fenol: cloroformo.

El producto de la purificación se usó como molde para la PCR. El mix de PCR y sus condiciones no se diferenciaron significativamente del RACE 5', la variación consistió en los primers, siendo el primer forward (9B5F1) y primer Adapt, como primer Reverse (dT primer Adapt). Finalmente, la visualización de productos amplificados se realizó por electroforesis en gel al 1 por ciento de agarosa.

3.2.3.3. IPCR

El primer paso para la técnica de IPCR fue la extracción de ARN total a partir de las raíces de yacón por el método de CTAB (Lodhi *et al.*, 1994 PMBR 12: 6-13), modificado por R. Torres., seguidamente se generó el ADNc, utilizando 5 µg ARN total, 1 µl del primer reverse dT(18) (20pmol.), 1 µl DTT, 1 µl dNTP (10mM), se completó hasta un volumen de 20 µl con agua libre de nucleasas (NFW) e incubó a 65° C por 5 minutos, luego se llevó a 0°C. A la mezcla se adicionó 6 µl de Buffer RT 5X, 1 µl de la enzima RTasa y se completó hasta el volumen final de 30 µl con NFW dejando incubar a 42°C por 50 minutos y finalmente se inactivó la enzima a 70° C por 10 minutos. Al término de la RT, se procedió a eliminar el ARN del híbrido ARN: ADN y se purificó con Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (25: 24: 1), resuspendiéndose finalmente en 52 µl de agua libre de nucleasas.

El siguiente paso fue la generación de ADNds utilizando el producto purificado de la RT. Se utilizó 30 µl de ADNc, 10 µl del buffer 10X, 1 µl de enzima E. coli ADN pol I, 2 µl de dNTP (10mM), 2.5 µl de hexámeros aleatorizados y se llevó a un volumen final de 100 µl con NFW e incubó a 15° C por 90 minutos, luego se inactivó la enzima a una temperatura de 70°C por 10 minutos. Al término de ésta, se agregó 1 µl de T4 ADN Polimerasa e incubó a 11° C por 10 minutos y se adicionó 6 µl de EDTA (0.5M) para

detener la reacción. Se purificó el ADNds a través del protocolo fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) y se resuspendió en 52 µl de agua libre de nucleasas.

Para la ligación del ADNds se utilizó la enzima T4 ADN Ligasa que restituye el enlace fosfodiéster entre los dos extremos del ADN. La siguiente reacción utilizó 0.1 µg de ADNds, 10 µl buffer 10X, 5 µl de T4 ADN ligasa (1U/ µL), se completó hasta el volumen de 100 µl de NFW e incubó a 22 °C por 10 min, la inactivación de la enzima fue a 70°C por 10 min. Luego se procedió a purificar el ADNds circular utilizando el protocolo fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) para su uso en la PCR.

Para la técnica, se preparó una dilución 1/10 de la muestra, y se usó 10 µl como molde, 0.4 µl de enzima Taq ADN pol (5U/ µl), 5 µl de buffer 10X, 6 µl MgCl₂ (25mM), 0.1µl dNTPs (10mM), 1 µl Primer forward (9BIPCRF SacI), 1µl Primer reverse (9BIPCRR PstI), y se completó hasta 50µl con NFW. Las condiciones de IPCR fueron: 94°C por 8 minutos, 50°C por 60 segundos, 65°C por 25 minutos y una segunda ronda comprendida por 35 ciclos de (94°C por 40 segundos, 50°C por 60 segundos, 68°C por 2 min) y 72°C por 10 min. La visualización de productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento.

3.2.3.4. Semi -Nested PCR 5'

El proceso se inició con la extracción de ARN total a partir de raíces reservantes de yacón por el método de CTAB (Lodhi *et al.*, 1994 PMBR 12: 6-13) modificado por R. Torres A., seguidamente se generó el ADNc utilizando: 5 µg ARN total, 1 µl del primer dT, 1 µl primer 9B2R2 (20pmol.), 1 µl DTT, 1 µl dNTP y se completó hasta un volumen de 20 µl con agua libre de nucleasas (NFW), se incubó a 65° C por 5 minutos y luego a -20°C por 5min, a la mezcla se adicionó 6 µl de Buffer RT 5X, 1 µl de la enzima RTasa y se completó hasta el volumen final de 30 µl con NFW, se incubó a 42° C por 50 minutos e inactivó la enzima por 10 minutos a 70° C. Al término de la RT se procedió a eliminar el ARNm del híbrido ARN: ADN y su purificación con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1).

El siguiente paso fue la adición de una cola homopolimérica “Cola C”. Para su adición se partió de 12,5 µl de ADNc purificado, 5 µl del buffer Tailed 5X, 2,5 µl de dCTP (2mM) y se completó con NFW hasta un volumen final de 25 µl. La reacción se llevó a una temperatura de 94°C por 3 minutos e inmediatamente a -20°C por 5 minutos. Se adicionó 1 µl de TdT incubando la mezcla a 37°C por 10 minutos e inactivando a 65°C por 10 minutos. Finalmente se purificaron las muestras con fenol: cloroformo, debido a la naturaleza del buffer de la enzima TdT y se diluyó 1:5.

Para el mix de PCR se utilizó: 0.3 µl Taq ADN polimerase (5U/ µl), 5 µl Buffer 10X, 3 µl MgCl₂ (25mM), 1µl dNTPs (10mM), 1µl Primer dG Adapt (10pmol), 1.25 µl de Primer R1 (9BIPCR, 10pmol), 1.25 µl de Primer R2 (9B4R1, 10pmol), 2 µl muestra y se completó hasta 50µl con NFW. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, 40°C por 5 minutos, 72°C por 20 minutos y 35 ciclos de (94°C por 40 segundos, 51°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto 45 segundos) y 72°C por 10 minutos. Al término de la PCR, los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1 por ciento y posteriormente teñidos con bromuro de etidio.

3.2.3.5. Semi - Nested PCR 3´

El proceso se inició con la extracción de ARN total a partir de raíces reservantes de yacón por el método de CTAB (Lodhi et al., 1994 PMBR 12: 6-13) modificado por R. Torres. Seguidamente se generó el ADNc utilizando el primer dT (Adapt). La reacción de RT, la generación del ADNc y su purificación fueron similares al proceso descrito para Semi Nested 5´.

Para el mix de PCR se utilizó: 0.3 µl Taq ADN polimerase (5U/ µl), 5 µl Buffer 10X, 3 µl MgCl₂ (25mM), 1µl dNTPs (10mM), 1µl Primer Adapt(10pmol), 1.25 µl de Primer F1 (9BqTPCR, 10pmol), 1.25 µl de Primer F2 (9B5F1, 10pmol), 2 µl muestra y se completó hasta el volumen de 50µl con NFW. Las condiciones para la PCR fueron: 1 ciclo 94°C por 6 minutos, 50°C por 1 minuto, 65°C por 15 minutos y 35 ciclos de (94°C por 40 segundos,

50°C por 1 minuto, 68°C por 1 minuto 30 segundos) y 72°C por 7 minutos. Al término de la PCR, los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1 por ciento y posteriormente teñidos con bromuro de etidio.

3.2.4. MODELAMIENTO POR HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL

Para obtener un modelo por homología estructural de la FEH en yacón se empleó dos programas moleculares: *Swiss Model* y *PyMOL*. El primero de estos programas permitió la construcción de una plantilla tomando como referencia estructuras cristalinas que se encuentran disponibles en la base de datos. *Swiss Model* alineó la secuencia de aminoácido de interés con otras de alta identidad tomando como referente a la estructura cristalizada de la 1-FEH de *C. intybus*. Se obtuvo como resultado un probable modelo estructural por homología de la molécula en estudio y para su mejor análisis se complementó con el programa *PyMOL* que permite hacer mejores acercamientos, seleccionar y señalar en la estructura una porción de secuencia de interés y visualizar orientaciones de aminoácidos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Los resultados de los protocolos utilizados en la extracción de ARN total se visualizan en la Tabla 2 y la integridad del ARN en la Figura 4.

Tabla 2. Resultados de cuantificación de ARN ($\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$) total. 1,2 & 3 (repeticiones).

Accesión	PER018283			PER018279		
	1	2	3	1	2	3
LiCl 0.1M	52.5	51	75.75	104.4	34.95	102
CTAB	112.35	193.8	106.35	139.95	55.2	136.8
TRIzol (Invitrogen)	120.15	36	51	0.315	72.45	105.9
RNeasy Mini Kit-Qiagen	153.45	129	100.5	70.2	104.1	289.95

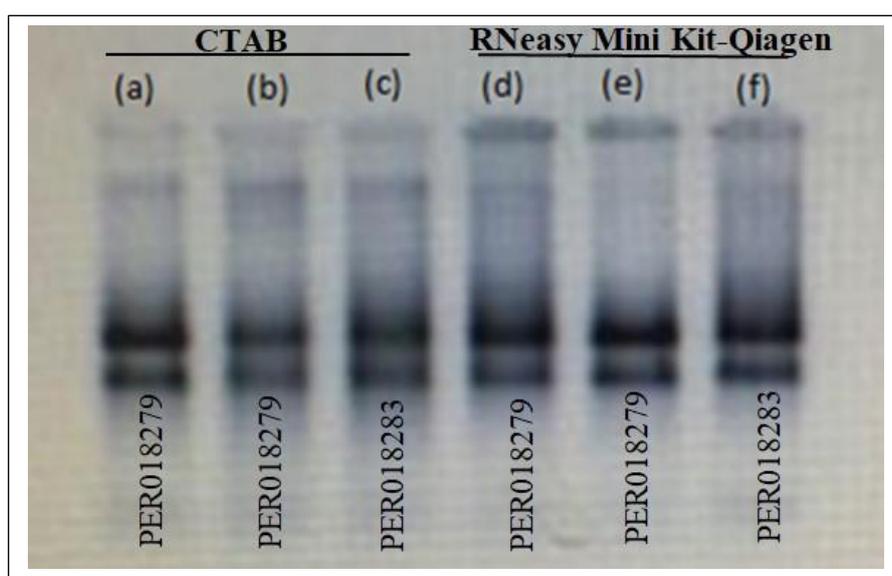


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa. Los productos de extracción se visualizaron en gel de agarosa al 1 %, en solución amortiguadora TBE 1X, cuya condición de electroforesis fue de 120 V

por 60 min a temperatura ambiente (T°. A) y posteriormente teñidos mediante bromuro de etidio. Los ARN total visualizados en el gel correspondiente al proceso de extracción mediante los protocolos CTAB [(a), (b), (c)] y RNeasy Mini Kit-Qiagen [(d), (e), (f)]. Accesoión: PER018279 [(a), (b), (d), (e)], PER018283 [(c), (f)].

El mayor rendimiento de ARN total se obtuvo con los protocolos RNeasy Mini Kit-Qiagen y CTAB en comparación a TRIzol y LiCl 0.1M. Es probable que las diferencias en la composición de los reactivos dieran lugar a los diferentes resultados, medidos a través del rendimiento e integridad del ácido nucleico. El kit comercial Mini Kit-Qiagen dispone de dos diferentes buffers de lisis (RLC y RLT), cuya diferencia se encuentra en su agente caotrópico (clorhidrato de guanidina y tiocianato de guanidina; respectivamente), su elección dependerá de la naturaleza del material a trabajar. Las indicaciones del fabricante hacen referencia a la posible solidificación de la muestra con altas concentraciones de metabolitos secundarios al ser trabajados con el buffer de lisis RLT.

Dada la naturaleza mucilaginoso de la muestra y la alta cantidad de compuestos fenólicos se optó por utilizar el buffer RLC. El uso del Mini Kit-Qiagen facilitó en gran medida la obtención de ARN de buena calidad y en cantidad suficiente, y disminuyó considerablemente el tiempo de extracción, propiedades que hacen de éste protocolo idóneo para los trabajos de extracción. Sin embargo, su uso se encuentra limitado por el número de membranas de sílice que contiene cada Kit y para el fin de optimización de un protocolo de extracción que se adecue a la muestra, se requiere de numerosos ensayos. Por otro lado, la extracción mediante CTAB admite cuantiosas extracciones y los resultados no difieren significativamente de los obtenidos por Mini Kit-Qiagen. Por lo que, se eligió éste protocolo para su optimización. De acuerdo con Demeke *et al.* (2009), la técnica de extracción CTAB produce mayor cantidad de ácidos nucleicos y en mayor pureza respecto a otros protocolos (Mini Kit DNeasy Plant y la extracción de Wizard) sin embargo, necesita de pequeñas modificaciones según Tiwari *et al.* (2012), quienes obtuvieron mejores resultados agregando más concentraciones de NaCl, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y mercaptoetanol, ellos también aumentaron el tiempo y la temperatura del baño de agua para una extracción efectiva.

Los resultados obtenidos con el protocolo TRIzol no fueron los esperados, es posible que se deba a factores iniciales como el tiempo de ruptura de la membrana celular, ya que no se pudo evitar la oxidación del tejido o a la coprecipitación de ácidos nucleicos por el uso del agente caotrópico en muestras con alto contenido de metabolitos secundarios como el yacón. La precipitación también pudo ser un factor del bajo rendimiento de extracción, TRIzol (Invitrogen) utiliza isopropanol, que es eficiente para la precipitación de ARN, siempre y cuando se use la temperatura y tiempo adecuados para prevenir la precipitación de otras sustancias como proteínas y carbohidratos. En el protocolo basado en CTAB se utiliza LiCl el cual permite hacer una precipitación diferencial del RNA, su gran utilidad se ha atribuido a que este reactivo no es eficiente para precipitar sustancias como ADN, proteínas y carbohidratos, permitiendo una precipitación eficiente del RNA (Barlow *et al.*, 1993). A pesar de esto, Chan *et al.* (2004) así como Rubio-Piña y Zapata-Pérez (2011) han reportado que en algunas ocasiones las altas concentraciones de LiCl pueden contribuir con un incremento en las cantidades de impurezas (polifenoles y carbohidratos), afectando la concentración y calidad del ARN.

La acción de los polifenoles no se pudo evitar, teniendo en cuenta los antioxidantes utilizados como: β -mercaptoetanol y ácido ascórbico. Durante las extracciones se visualizó un leve pardeamiento en las muestras post-ruptura mecánica sin distinción de los protocolos utilizados.

Los protocolos de extracción que utilizaron el Mini Kit-Qiagen y el buffer CTAB dieron los mejores resultados en cuanto a calidad y cantidad del ácido nucleico refieren, además de concentraciones de ARN más uniformes. Se optó por trabajar con el protocolo CTAB ya que permitió numerosos ensayos de extracción, resulta más económico y representa una excelente opción cuando se necesita hacer la evaluación de un alto número de muestras. Cabe resaltar que los resultados obtenidos en este trabajo pudieron haber sido influenciados por el material inicial, tiempo de post-cosecha, tiempo de almacenaje, estadio de la planta y topología de la muestra.

4.2. OBTENCIÓN DE AMPLICONES

Los juegos de primers diseñados manualmente utilizando el programa MEGA 7, se utilizaron en la obtención de amplicones de la región codificante (Tabla 3) y en la región 5' y 3' del ARNm (Tabla 4).

Tabla 3. Lista de Primers que amplificaron una región de la secuencia codificante correspondiente al gen FEH en yacón.

Nombre	Secuencia
9B1F1	GGGARAAYYTTYTTGCCRCA
9B1R1	GYTTCATMCTCCAAGCACTCAT
9B1R2	GGTCCRAARCTCTCRATRATYAGTG
9B2F1	GGCGGCGATCGGGACAACAAC
9B2R1	CCCTCKAYMGGCCAYTGRATYARCTG
9B2R2	CCGRAAHGWCTGAAGVCCVGCCCA
Foward-1(F-1)	AACTGGATGAAYGAYCCWAAYGGWCCAATG
Reverse-1(R-1)	GSGWARAARTCWGGRCAYTCCCA

Tabla 4. Lista de Primers utilizados en las técnicas RACE 5', RACE 3' e IPCR.

Técnica	Primer	secuencia
RACE 5'	9B2R2	5' CCGRAAHGWCTGAAGVCCVGCCCA 3'
	9B-IPCRPstI	5' GGGCCTGCAGATGTCTGCTTCTTGGGTCGGGTA 3'
	Primer Adaptador	5' GACTCGAGTCGACATCG 3'
	dT primer adaptador	5' GACTCGAGTCGACATCGA(T ₁₇) 3'
RACE 3'	9B5F1	5' GGCGTGTTGGCTATGGCGTCT 3'
	Primer adaptador	5' GACTCGAGTCGACATCG 3'
	Primer adaptador dT	5' GACTCGAGTCGACATCGA (T ₁₇) 3'
IPCR	9B-IPCRF	5'CCATCCTCCC GGGAAACATT3'
	9B-IPCRFmIuI	5'GGCCACGCGTCCATCCTCCC GGGAAACATT3'
	9B-IPCR	5'TACCCGACCCAAGAAGCAGACAT3'
	9B-IPCRPstI	5'GGGGCTCGAGATGTCTGCTTCTTGGGTCGGGTA3'

4.2.1. Obtención de fragmentos correspondiente a la secuencia codificante

El primer amplicón obtenido se visualiza en la Figura 5, utilizado como base para el diseño de los siguientes primers, necesarios para la obtención de los demás fragmentos traslapados del gen FEH (Figura 6).

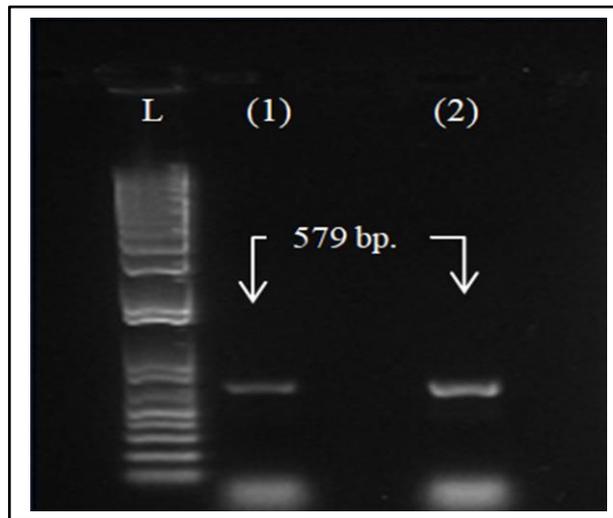


Figura 5. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1 por ciento y posteriormente teñidos con bromuro de etidio. La amplificación de los productos de PCR utilizó el juego de primers F-1 y R-1 para ambos carriles (1) y (2). Y las accesiones: PER018279 y PER018283 para los carriles (1) y (2) respectivamente

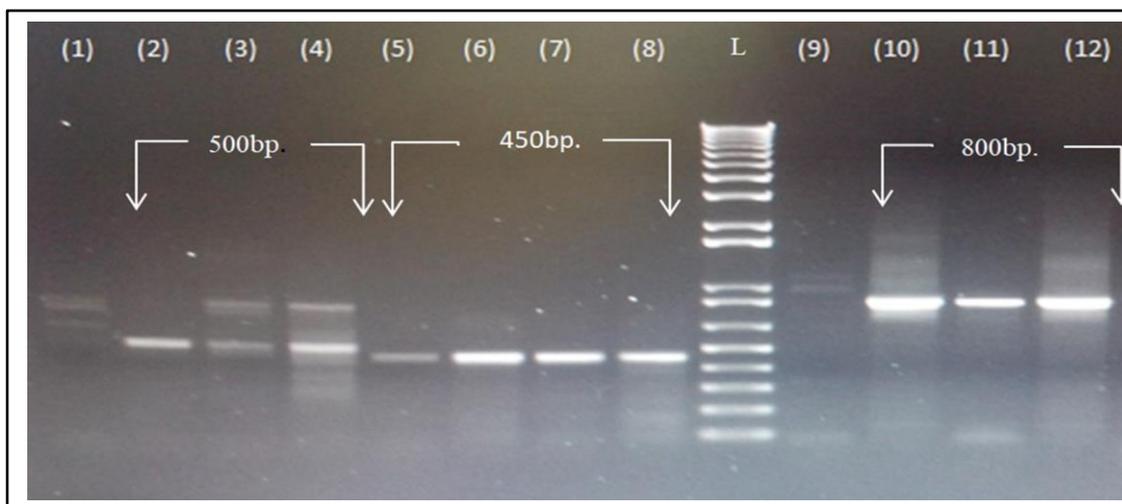


Figura 6. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1 por ciento y posteriormente teñidos con bromuro de etidio. La amplificación de productos de PCR se obtuvo a través de los juegos de primers:(9B2F1 & 9B2R1) correspondiente a los carriles [(1), (2), (3), (4)], (9B2F1 & 9B2R2) correspondiente a los carriles [(5), (6), (7), (8)], (9B1F1&9B1R1) correspondiente a los carriles [(9), (10), (11), (12)].

4.2.3. Selección de colonias

Se observó el crecimiento de colonias transformadas de color blanco y azul (Figura 8); esta coloración permitió discriminar a las colonias recombinantes incapaces de producir la enzima β -galactosidasa debido a que la región que la sintetiza se parte para dar paso a la secuencia recombinante.

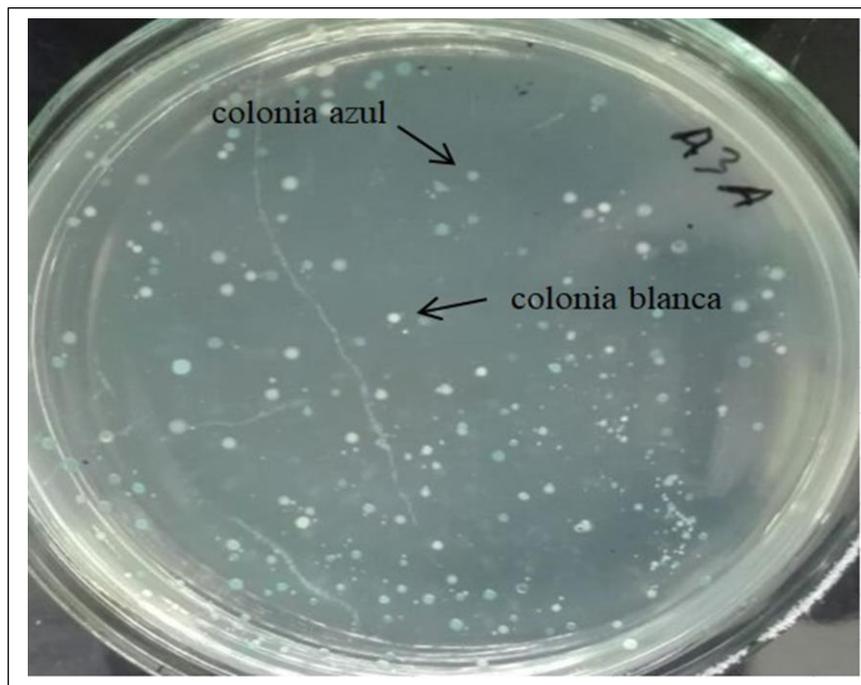


Figura 8. Colonias positivas y negativas para la inserción de ADN recombinante en colonias inducidas al estado de competencia.

Brown (2006) ha reportado que cualquiera que sea el método de selección, la eficiencia respecto al número de colonias recombinantes es relativamente baja, los rangos se encuentran entre 10^5 - 10^7 transformantes / μg de ADN y probablemente se deba a la constitución genética de la cepa huésped a transformar, la elección del método y /o las condiciones fisiológicas del huésped. Sin embargo, para nuestro caso, la alta eficiencia de transformación no fue crítica. Aplicaciones tales como la construcción de bibliotecas genómicas y de ADNc si requiere de ello (Singh *et al.*, 2010).

4.2.4. Comprobación del inserto

Los productos de digestiones se visualizan en la Figura 9. La enzima EcoRI corta el plásmido en dos sitios (Anexo 6), permitiendo la liberación del inserto.

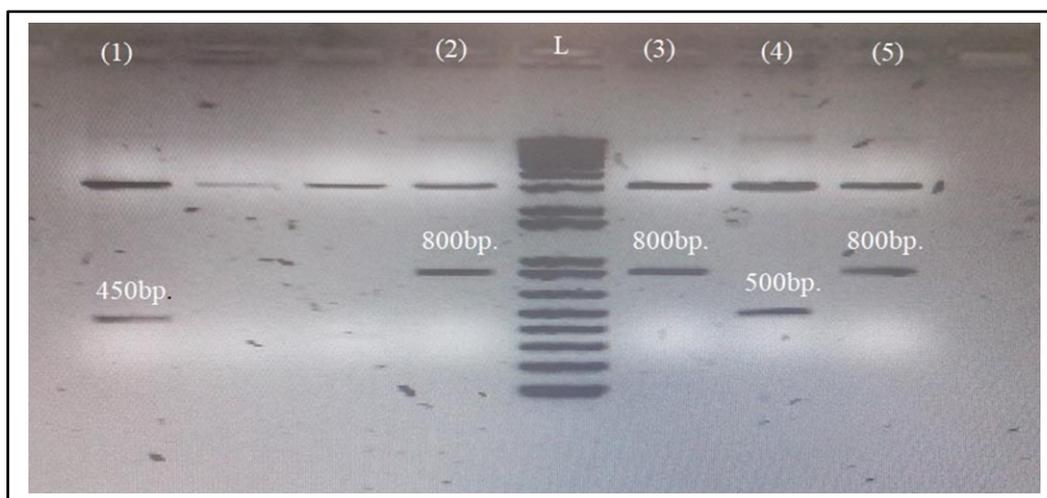


Figura 9. Los productos de Digestión del ADN recombinante mediante la enzima EcoRI se visualizaron en gel de agarosa al 1 por ciento y posteriormente fueron teñidos con bromuro de etidio. Los carriles: (2), (3), (5) corresponden al fragmento de tamaño 800bp, (1) corresponde al fragmento de tamaño 450bp., (4) corresponde al fragmento de tamaño de 500bp.

4.3. OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO CORRESPONDIENTE A LA REGIÓN 3' DEL ARNm

No se obtuvieron los resultados esperados con el sistema RACE al no visualizar fragmento alguno al término del procedimiento. Se presume que este resultado se debió a la baja concentración del ARNm del gen FEH, ya que no es un gen estructural y su expresión pudo haber sido baja, influenciada por las altas temperaturas (26-30°C) del tiempo de colecta y extracción.

No se obtuvieron resultados utilizando la técnica IPCR, si bien ésta técnica permite trabajar con cantidades de concentración relativamente bajas de ADN inicial, es probable que los numerosos procesos de purificación llevaran a la pérdida del material inicial en

algún paso. Por el contrario, el empleo del método semi_Nested o PCR anclada permitió obtener un producto amplificado para el extremo 3' (Figura 10), donde inicialmente no se visualizaron resultados. El tamaño del fragmento (292pb) fue consistente con su homólogo en *Cichorium intybus* FEH I – IIa (305 bp.).

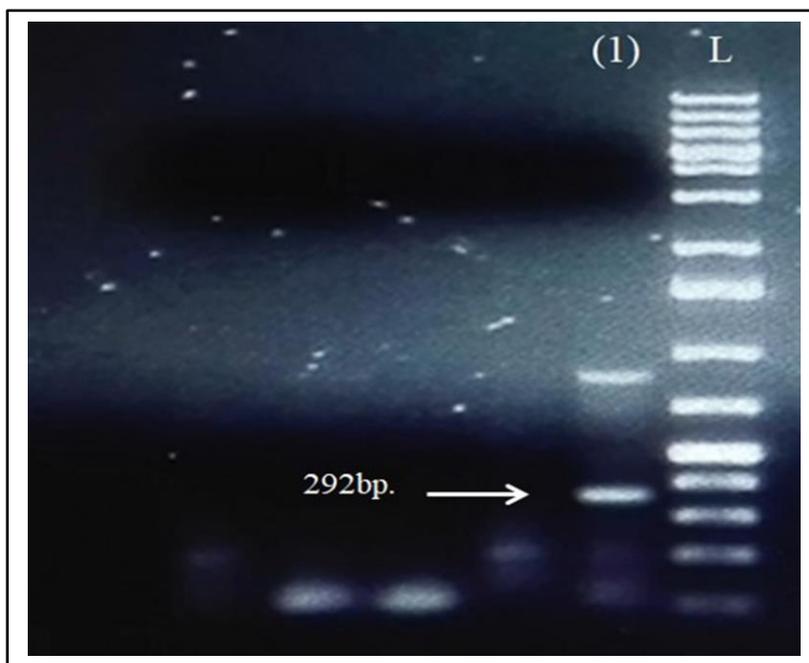


Figura 10. Los productos de PCR-Semi Nested se visualizaron en gel de agarosa al 1 por ciento y fueron posteriormente teñidos con bromuro de etidio. El carril (1) corresponde al fragmento de tamaño 292bp de la región no codificante del ARNm de la FEH en yacón.

Posteriormente el fragmento fue purificado y transformado en células quimio competentes de *E.coli* DH5 α , para su secuenciamiento. Hasta fines del presente estudio se sigue trabajando en la optimización de la metodología para hallar el extremo 5' y poder completar la totalidad del gen.

4.4. SECUENCIA ENSAMBLADA Y ÁRBOL FILOGENÉTICO

La secuencia de nucleótidos de la FEH (Figura 11) se ensambló manualmente, mientras que el programa Transeq permitió su traducción (Figura 12).

>Yacon_9B

```
TTATACCAAGGAGTGTATCATTCTTCTACCAATACAATCCATACGCCGCAACTTTCGGAACCATCGTGT
GGGGCCACGCCGTATCATACGACCTGGTCAACTGGATCCATCTCGACCCGGCAATTTACCCGACCCAAG
AAGCAGACATCAACAGCTGCTGGTCCGGATCCGCCACCATCCTCCCGGGAAACATTCGGGCCATGCTCT
ACACCGGCAGCGACTCAAACCTCCCGCCAAGTCCAAGACCTCGCCTGGCCCAAAAACCTCTCCGACCCCT
TCCTCCGGGAATGGGTCAAATACGCCGAAACCCGATCATAACCCACCCGGCGGGCGTCAAAGACGACT
GCTTCGCGACCCCAGCACCCGCTGGCTCGGCCCCGACGGCGTGTGGCGGATCGTTCGTCGGCGGGGATC
GGGACAACAACGGCATGGCGTTTTTATACCAGAGCACCGATTTTGTAAACTGGACACGGTACGAACAGC
CGCTTGCCTGGCGGATGCCACCGGAACCTGGGAGTGCCCGGAATTTTTTCTGTGCCGTTGAACAGTAC
GAACGGGTTGGATACATCGGCGTATAGCGGGAATGTGATGCATGTGATGAAAGCAGGATTTGAAAGGC
ATGATTGGTACACAATCGGGACGTATAGTCCGTGATCGTGAGAAATTTTTGCCGCAAAATGGGTTGAAATT
AAGCGGAAGCACGTTGGATTTGCGGTACGATTATGGGCAATTTTATGCATCGAAAATCGTTTTATGATGAT
TCGAAGAACAGAAGGGTTTTGTGGGCGTGGGTTCCGGAAACTGATTCTCAAGAAGATGATATTGAAAAG
GGTTGGGCTGGGCTTACGTCATTTCTAGGGCAATCTGGATTGATGGAAGTGGGAAAGCAGCTGATCCAA
TGGCCGGTGGAGGAGATAGAGTCACTACGTGGAAATGAAGTTAAGCTTCAAACAAGAAGCTTACATCT
GGTACCCTTGTGAAATTCAGGGCGTTACTGCTTCTCAGGCGGATGTTACAATTTTCGTTCAAATTTGGAGG
ATTTGAAAGAGGCTGAGGTTTTGGATACGAGTTCTTCGGTTGATCCGCAAGTGCTTTGTACCGAAAAGGG
GTGCATCTAGCAAGGGTGCCTTTGGCCCTTTTGGCGTGTGGCTATGGCGTCTAAAGACTTGAAGGAAC
AAACCGCAATCTTCTTTAGGGTTTTCCAAAACCAAAAATGGACGATACTCTGTGCTCATGTGTAGCGATCT
TAGCAGGTCTACCGTTAGAAGTAACATCGACACAACAAGTTTTGGCGCGTTTTGTTGATATAGATCCTCGG
TACAATGAGATCTCACTGAGAACTTGATAGACCCTCTATTATTGAGAGTTTCGGAGCAGGGGGAAAG
ACATGCACCACAAGTCTGATTTATCCTAAATTTCTTACCTACGAAGATGCTCATCTTTTCGCATTTAACA
ATGGGACTCAAAGTGTCAAAATTTCTCAAAATGAGTGCTTGGAGTATGAAAAATGCAGAATTTGTAATTG
ATCAGATCGTAAAAAGTGC GGCTTAAAATGCTAGATGATCTGGATGTTTAAAATAGATAAAGATTAC
TCTTGTTAAAAGGTAAAGTTTACTCTTGTAAAAGGTAAAAGTAGAAGAAACATGGGAGACCCGAA
GAGTTGGTTAGGTAGCTCTTTTGTAAAGGTCATTCTTTGTTGCTTTATTCTGTACAAAATTTTGGG
GATTGTGGCCATTTTTTAGGCATTTTAAAGTTATTAAGATGTAATATTTTCGTGCAAAGCACATGAT
GCCATTGTACCAATTATTGTTTCATTAATATACTATCAATATTTGAGTAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAA
```

Figura 11. Secuencia de nucleótidos correspondiente a la región codificante y no codificante (en negra) del extremo 3' del ARNm de la FEH de yacón (*Smallanthus sonchifolius*).

```
LYQGVYHFFYQYNPYAATFGTIVWGHAVSYDLVNIHLDPALPYPTQADINSCWSGSATILPGNIPAMLYT
GSDSNSRQVQDLAWPKNLSDFLREWVKYAGNPIITPPAGVKDDCFRDPSTAWLGPDGVWRIVVGGDRDN
NGMAFLYQSTDFVNWTRYEQPLASADATGTWECPEFFVPLNSTNGLDTSAYSNGVMHVMKAGFEGHD
WYTIGTYS PDRENFLPQNGLKLSGSTLDLRYDYGQFYASKSFYDDSKNRRVLWAWVPETDSQEDDIEKGW
AGLQSFPRAIWIDGSGKQLIQWPVEEIESLRGNEVKLQNKKLTSGTVVEIQGVTASQADV TISFKLEDLKEA
EVLDTSSSVDPQVLCTER GASSKGAFGPFVGLAMASKDLKEQTAIFFRVFQNGRYSVLMCSDLRSRSTVR
SNIDTTSFGAFVDIDPRYNEISLRNLIDHSIIESFGAGGKCTTSLIYPKFLTYEDAHLFAFNNGTQSVKISQMS
AWSMKNAEFVIDQIVKSAA*
```

Figura 12. Secuencia de aminoácidos correspondiente al gen FEH en yacón (*Smallanthus sonchifolius*).

La secuencia de la FEH de yacón reveló un alto grado de identidad respecto a las 1-FEHs de especies emparentadas (Figura 13), siendo estos valores: *C. intybus* (88.5 por ciento), *H. tuberosus* (88.2 por ciento), *V. herbácea* (86.5 por ciento) y *A. lappa* (85.0 por ciento). El

árbol consenso bootstrap obtenido a partir de 2000 réplicas visualizado en la Figura 14, indicó un 89 por ciento de credibilidad del nodo entre las secuencias FEH de *S. sonchifolius* y la 1-FEH de *H. tuberosus*.

	AIP90174.1 fructan_1-exohydrolase_IIb_Cichorium_intybus	9B_YACÓN									
	CAC37922.1 fructan_1-exohydrolase_IIa_Cichorium_intybus										
	AJW31156.1 fructan_1-exohydrolase_Helianthus_tuberosus										
	pdb1ST8IA_Chain_A_Fructan_1-exohydrolase_IIa										
	CAJ77148.1 putative fructan_1-exohydrolase_partial_Yernonia_herbacea										
	BAL73222.1 fructan_1-exohydrolase_Arctium_lappa										
	KVH87436.1 Concanavalin_A-like_lectin/glucanase_superfamily_Cynara_scolymus										
	CAD49079.1 fructan_1-exohydrolase_Campanula_rapunculoides										
	CAD48199.1 fructan_1-exohydrolase_Triticum_aestivum										
	CAD48404.1 fructan_6-exohydrolase_Beta_vulgaris										
	CAA26513.1 levansucrase_Bacillus_subtilis										
AIP90174.1 fructan_1-exohydrolase_IIb_Cichorium_intybus											
9B_YACÓN	88.48										
CAC37922.1 fructan_1-exohydrolase_IIa_Cichorium_intybus	96.32	88.5									
AJW31156.1 fructan_1-exohydrolase_Helianthus_tuberosus	84.8	88.2	84.6								
pdb1ST8IA_Chain_A_Fructan_1-exohydrolase_IIa	96.32	88.5	100	84.6							
CAJ77148.1 putative fructan_1-exohydrolase_partial_Yernonia_herbacea	86.52	86.5	87.5	83.1	87.5						
BAL73222.1 fructan_1-exohydrolase_Arctium_lappa	85.05	85	84.8	80.4	84.8	82.6					
KVH87436.1 Concanavalin_A-like_lectin/glucanase_superfamily_Cynara_scolymus	84.8	85.3	84.6	80.9	84.6	83.3	93.9				
CAD49079.1 fructan_1-exohydrolase_Campanula_rapunculoides	66.91	65.9	67.2	65.2	67.2	64.2	65.7	65.686			
CAD48199.1 fructan_1-exohydrolase_Triticum_aestivum	49.51	50.2	49.5	50.2	49.5	48	48	48.529	51.7		
CAD48404.1 fructan_6-exohydrolase_Beta_vulgaris	52.21	51	52	51.7	52	50.2	51.5	51.471	54.9	46.8	
CAA26513.1 levansucrase_Bacillus_subtilis	17.4	17.2	16.9	14.7	16.9	16.2	15.9	15.686	15.9	14.5	14

Figura 13. Porcentajes del Grado de Identidad entre la secuencia de aminoácidos de la FEH en estudio y 1-FEH de especies relacionadas.

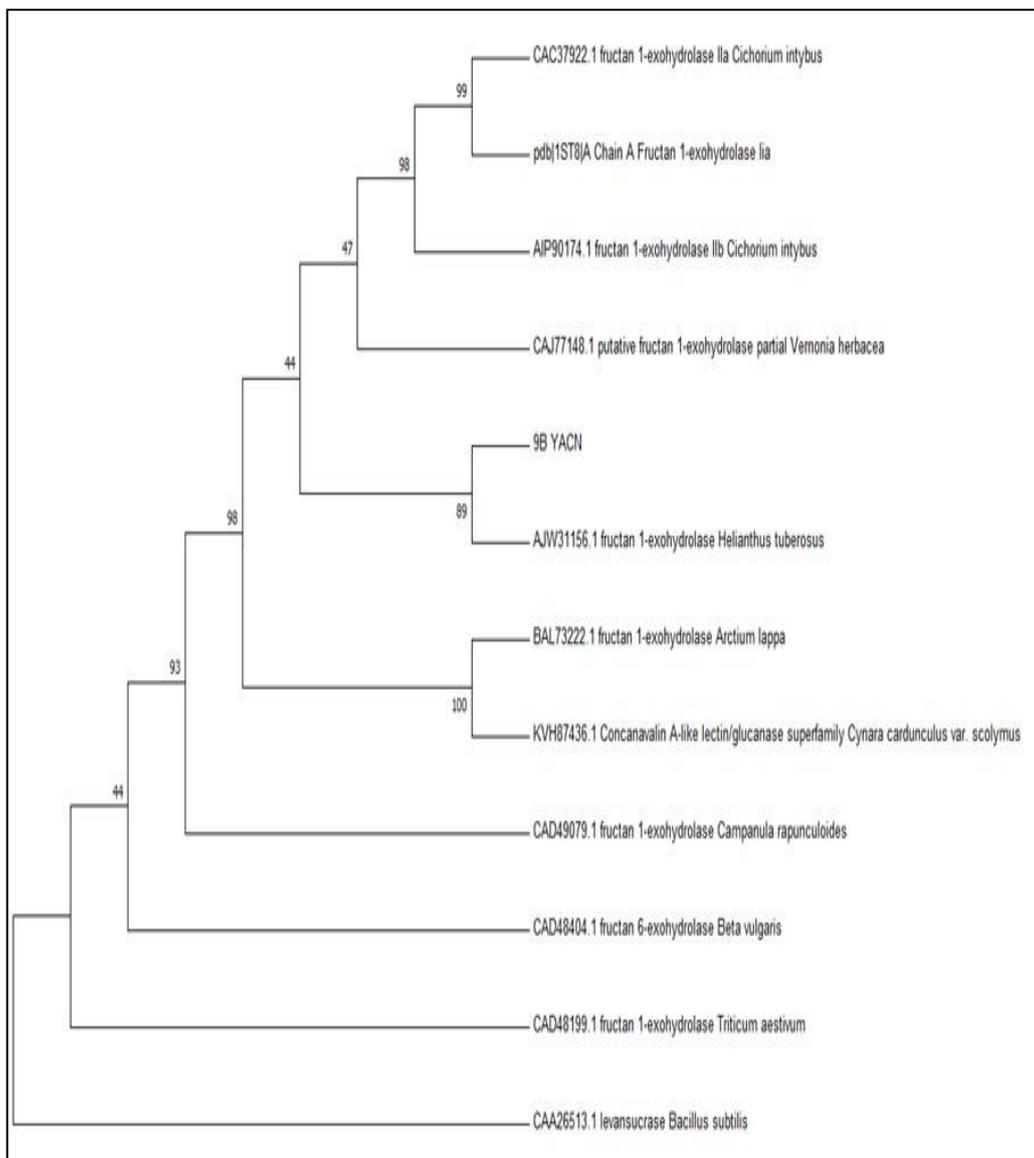


Figura 14. Construcción de árbol filogenético entre la secuencia FEH de *S. sonchifolius* y sus homólogos 1-FEH de *C.intybus*, *V.herbacea*, *A.lappa*, *H. tuberosus* y *C. rapunculoides*

4.5. MODELADO ESTRUCTURAL POR HOMOLOGÍA

4.5.1. Dominios y estructura en general

La estructura proteica de la 1-FEH obtenida en yacón fue consistente con la plantilla estructural encontrada en la base de datos correspondiente a la familia GH32. Consiste en un dominio N-terminal formado por una β -hélice quíntuple, cada una de las cuales consta de cuatro cadenas bilaterales antiparalelas con la topología clásica “W” alrededor del eje central; el dominio C-terminal se encuentra conformado por dos hojas beta de seis cadenas antiparalelas que forman un pliegue tipo “sándwich” cuya función exacta aún no está clara y dos alfa hélices (Figura 15).

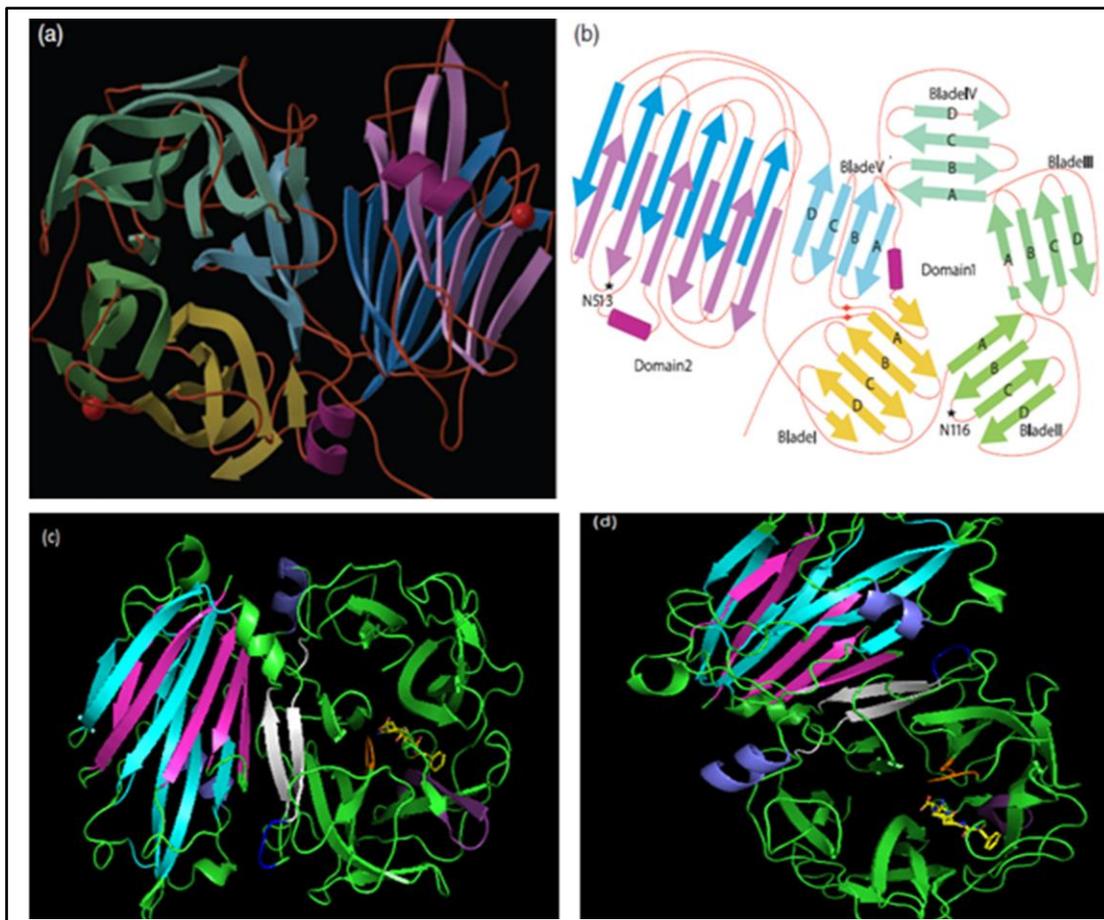


Figura 15. Comparación de estructuras entre la 1-FEH IIa en *C. intybus* y 1-FEH de *S. sonchifolius*, (b) composición de las estructuras en cada dominio y las estructuras de alfa hélice representadas como dos cilindros (Verhaest *et al.*, 2005). (c, d) Modelado por homología de la 1-FEH en *S. sonchifolius*. FUENTE: *Swiss Model* y *PyMOL*.

La superposición de estructuras cristalinas con el modelo estructural de *S. sonchifolius* nos permitió obtener un panorama general de la secuencia de residuos claves para la actividad enzimática, tal como los aminoácidos ubicados en el sitio activo o sitio de unión del sustrato, así como los residuos fundamentales para determinar la estabilidad enzimática, estabilidad de unión o especificidad del sustrato de la 1-FEH en yacón. El sitio de unión al sustrato es muy probable que se encuentre en la hendidura que forma el sitio de unión entre los dos dominios, esta hendidura según Le Roy *et al.* (2007) desempeña un papel en el reconocimiento de sustratos tipo fructano cuyo grado de polimerización (DP) es mayor.

Por otro lado, para la localización del sitio activo en la 1-FEH de yacón se realizó la superposición de estructuras con miembros de la familia GH32 y GH68 donde se observó que los sitios activos se encontraban en el dominio beta propulsor, conformado por aminoácidos altamente conservados dentro de la familia GH32. Estos aminoácidos en la 1-FEH IIa de *C. intybus* corresponden a Asp22, Asp147 y Glu201 'miembros' de las regiones altamente conservadas denominadas como triada catalítica: NDPNG, FRDP y WECPD, que por homología en *S. sonchifolius* corresponderían a Asp119 y Glu 173 miembros de las regiones FRDP y WECPE respectivamente (Figura 16), tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos obtenida hasta el final del presente trabajo.

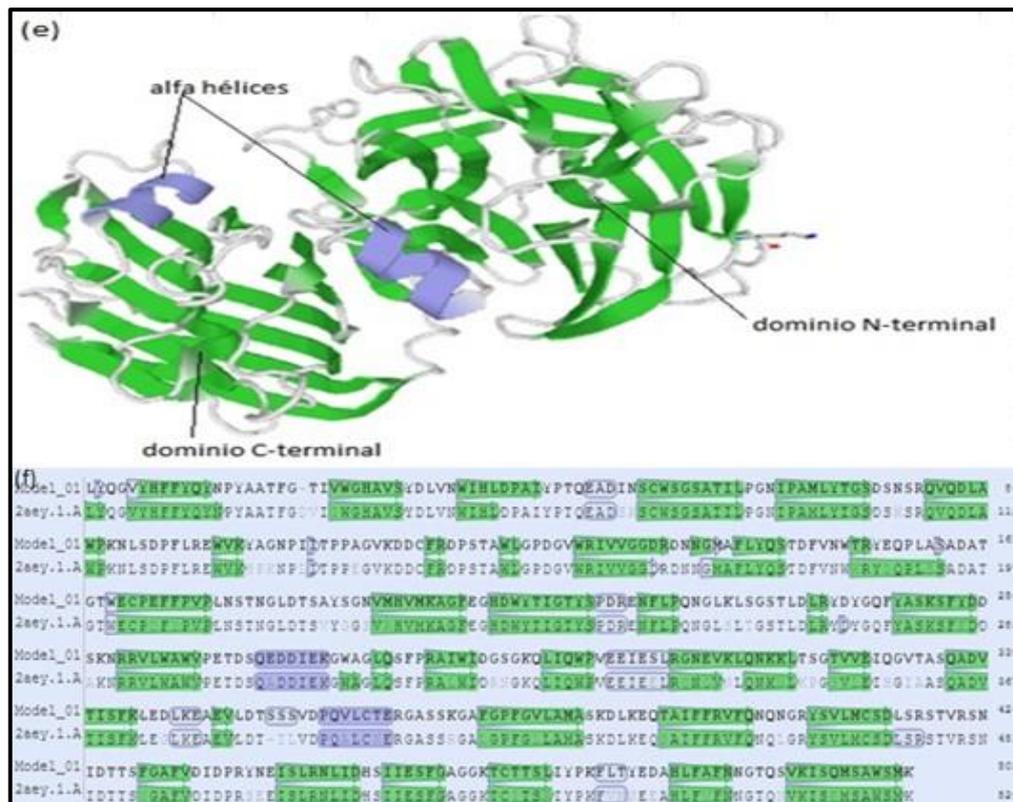


Figura 16. (e) Modelado por homología estructural de la 1-FEH de *S. sonchifolius* obtenida por el programa SWISS MODEL a través del modelamiento por predicción de estructura 3D (f). Alineamiento de secuencia de aminoácidos de la 1-FEH de *S. sonchifolius* (Model_01) respecto a la 1-FEH IIa de *C. intybus* (2aeey.1.A). FUENTE: Swiss Model.

La probable estructura de 1-FEH en *S. sonchifolius* es muy similar a la estructura que encontramos en 1-FEH IIa de *C. intybus*, ambas comparten dos dominios conformados por hojas beta antiparalelas de diferentes tamaños y dos alfa hélices. La inserción de bucles en las hojas crea interrupciones en las hebras; tal es el caso de la hebra A de la cuchilla III del residuo 147 a 151 en *C. intybus* y en los residuos 119 al 123 en *S. sonchifolius*, siendo la estructura aminoacídica la “misma en ambas especies”, conformada por los aminoácidos: DPSTA. Se observó también la interrupción de un bucle largo en dos filamentos de una misma cuchilla por una estructura de alfa hélice correspondiente al sitio 298 a 306 de estructura aminoacídica: “QADDIEK” de la cuchilla V seguida de una breve hebra beta en *Cichorium*. La misma interrupción fue visualizada en la estructura 3D para *S. sonchifolius*, siendo los sitios afectados 270 hasta 278 que conforman la hélice alfa con los aminoácidos: QEDDIEK y la diferencia respecto a la alfa hélice en *C. intybus* reside en un único aminoácido GLU372. La segunda alfa hélice presenta el mismo número de aminoácidos para ambas especies, diferenciándose en dos residuos: VAL364 y THR367 de

la estructura PQVLCTE de *S. sonchifolius* mientras que en *C. intybus* tenemos ALA391 y ASN 394 en PQALCNE (Figura 16).

Aunque la estructura 3D y la secuencia aminoacídica presentaron gran similitud, estos residuos no son totalmente conservados. Las diferencias más notables se encontraron en los tamaños de las hebras hélices beta, en las interrupciones en una secuencia y el acortamiento de hebras, así como también los cambios puntuales o en más de un residuo en comparación de la hebra homóloga. En estas diferencias encontramos además una estructura de ocho aminoácidos conformada por la secuencia “WIHLDPAI” que parte de TRP35 hasta ILE42 correspondiente a una hebra de la hélice beta quintuple en el dominio N-terminal de yacón, mientras que; el alineamiento de la secuencia aminoacídica de *C. intybus* indica la presencia de una hebra corta constituida por cuatro aminoácidos que corresponden a “WIHL” partiendo de TRP63 a LEU66. Los aminoácidos THR157 y ARG158 en yacón dieron origen a una hebra beta hélice corta cuya secuencia homóloga en *C. intybus* correspondió a una hebra de gran tamaño conformada desde LYS185 a SER193. Se encontró también una hebra constituida por trece aminoácidos que inicia desde AR310 a LEU321 ubicada en la estructura conformada por dos hojas beta antiparalelas que forman el pliegue tipo “sándwich” en el dominio C- terminal de yacón. La visualización de la secuencia homóloga en *C. intybus* indicó una ruptura de la hebra dando origen a dos hebras cortas que se encuentran conformadas por ARG338 a VAL342 y GLN345 a LEU349.

4.5.2. Sitio activo tentativo

El mecanismo de reacción de la glucosil hidrolasa implica la protonación del oxígeno glucosídico; seguido por un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico del sustrato del azúcar por un grupo carboxilato (Koshland y Stein, 1954). Los aminoácidos altamente conservados por comparación aminoacídica de *C. intybus* son Asp119 y Glu 173 miembros de las regiones “FRDP” y “WECPE” correspondientemente; regiones conservadas dentro de la familia GH32.

Experimentos de mutación en éstas regiones conservadas en proteínas homólogas a 1-FEH IIa de *C. intybus* y a la 1-FEH de yacón, indican el papel crucial de estos residuos en el mecanismo catalizador para la hidrólisis del enlace glucosídico (Batista *et al.*, 1999;

Reddy y Maley, 1990, 1996). El hecho de que estos aminoácidos se agrupan en un sitio activo putativo fue consistente con los hallazgos. Por analogía con un estudio de Reddy y Maley (1996) sobre la levadura invertasa, se identificó el aminoácido homólogo a Asp22 de 1-FEH IIa como el nucleófilo y Glu201 como el catalizador ácido / base en *C. intybus* que por extrapolación podríamos extender a un ASP aún no hallado en el presente estudio como nucleófilo de la reacción y GLU 173 como el catalizador ácido/base en yacón. Es así que; la simulación de la reacción para 1-FEH de yacón sería: un fructano de tipo inulina se une al sitio activo donde su oxígeno glucosídico es protonado por Glu173. Posteriormente, se realiza un ataque nucleofílico por el carboxilato de Asp "n" formando un complejo enzima-fructosa inestable. Finalmente, este intermediario se hidroliza liberando fructosa y enzima libre.

La reacción de hidrólisis en general da como resultado dos posibles resultados estereoquímicos, aquellos asociados ya sea con la inversión o con la retención de la configuración anomérica (Henrissat y Davies, 1997). Ambos mecanismos implican un estado de transición similar a un ion oxocarbenio. Hidrolasas como 1-FEH IIa, retienen la configuración anomérica, usando un intermediario enzimático-covalente a través del mecanismo de doble desplazamiento (Reddy y Maley, 1996), mientras que las enzimas inversoras liberan productos en un solo paso, utilizando un nucleófilo que activa una molécula de agua. La distancia promedio entre el catalizador ácido / base y el nucleófilo refleja la presencia o ausencia de una molécula de agua, siendo 5.5 Å para retener enzimas y 10 Å para las enzimas inversoras (Davies y Henrissat, 1995; McCarther y Withers, 1994). Sin embargo estos valores no se cumplen en 1-FEH IIa (6.9 Å entre los donante de protones y el nucleófilo; según Verhaest *et al.*, 2005) ni para levansucrasa (6.82 Å para la enzima libre; Meng y Fütterer, 2003) e invertasa (6.70 Å para la enzima libre; Alberto *et al.*, 2004). Por lo tanto, es probable que no haya una relación funcional exacta con la distancia entre los residuos catalíticos. Alberto *et al.* (2004) proponen que las diferentes posiciones vinculantes de los azúcares en el extremo reductor, son los cruciales en definir los mecanismos catalíticos de las diversas enzimas, en lugar de las distancias entre los residuos catalíticos.

Numerosos estudios de mutagénesis dirigida al sitio de la tríada catalítica han sido reportados confirmando su función esencial en la catálisis (Reddy y Maley, 1990, 1996;

Batista *et al.*, 1999; Song y Jacques, 1999; Yanase *et al.*, 2002; Meng y Fütterer, 2003; Ozimek *et al.*, 2004; Altenbach *et al.*, 2005; Ritsema *et al.*, 2005; Le Roy *et al.*, 2007^a citado por Lammens *et al.*, 2008). Las metodologías para determinar el rol de los residuos involucrados en la función de catálisis utilizan mayormente mutaciones por sustituciones específicas al sitio, resultando la pérdida parcial o total de la actividad enzimática. Lammens *et al.* (2007) mutaron el nucleófilo (D23) y el catalizador ácido base (D203) por Alanina de *A. thaliana* (AtcwINV1), teniendo como resultado mutantes completamente inactivos. Por otro lado los datos de mutagénesis dirigida en levansucrasa de *B. subtilis* al ácido general (Glu342) por Alanina llevaron a la inactividad enzimática en los experimentos realizados por Meng & Fütterer (2003).

No solo la presencia de estos tres residuos pertenecientes a la triada catalítica son responsables de la función de actividad enzimática, sino también ha sido reportada la presencia de varios residuos cercanos al sitio activo o a la hendidura entre los dominios que serían probablemente responsables del óptimo acoplamiento, estabilidad, especificidad, orientación y degradación del sustrato.

Varios autores compararon residuos homólogos claves en FEH IIa de *C. intybus*, invertasa de *A. thaliana* (AtcwInv) y la 6-FEH de *B. vulgaris* (Bv) a través de mutaciones por sustitución tratando de dilucidar los aportes de cada uno de estos residuos en el acoplamiento enzima-sustrato. Lammens *et al.* (2008) realizaron diversos estudios con mutantes de invertasa 1 de pared celular de *Arabidopsis thaliana* (AtcwINV1), observando importantes cambios en cuanto a la unión y estabilidad de la sacarosa. Ellos refieren algunos aminoácidos claves no pertenecientes a la triada catalítica, como el aminoácido conservado Ac. Aspártico 239 (D239); importante para la óptima unión de la sacarosa a la hendidura ya que interactúa con el oxígeno dos y tres del anillo de glucosa. Observaron además que la sustitución por Alanina (D239A) altera la especificidad del sustrato, mostrando actividad exohidrolasa en vez de actividad invertasa, y preferencia por el sustrato 1-kestosa. Los autores mencionan que un equivalente a este residuo se encuentra en levansucrasa (E340) de *B. subtilis* / (Q399) de *Glucanobacter diazotrophicus*, sin embargo la 1-FEH, Beta fructosidasa y exoinulinasa carecen de este residuo. ¿Podría entonces (D239A) considerarse parte de una invertasa defectuosa?, ¿Es este el único

residuo la clave para diferenciar invertasas de FEHs?, ¿La introducción de D239 en las FEH conduciría al aumento de la actividad invertasa? Los experimentos realizados por Le Roy *et al.*, (2008) se hicieron en 6-FEH de *B. vulgaris* en el homólogo D239 (Fenilalanina, F233). La mutación F233D tuvo como resultado el significativo aumento de la actividad hidrolizante de sacarosa además de la disminución de su actividad general contra leván y 6-kestosa, sin embargo la preferencia por estos sustratos permaneció. El aminoácido Lisina 242 (K242) se encuentra muy cerca de D239 y es muy probable que lo ayude a mantener una posición favorable para la unión al sustrato. El residuo tirosina 279 (Y279) que está altamente conservado en GH32, se localiza cercano al catalizador ácido/base E203 y según Lammens *et al.* (2008) es probable que module el pKa de la cadena lateral de E203.

Los residuos W82, R148, D239 y K242 de AtcwINV1 cumplen un papel importante en la orientación de la subunidad de la glucosa. Lammens *et al.* (2008) mencionan que las mutaciones en los residuos pertenecientes a la triada catalítica de *A. thaliana* (D23, E203 y D149) no tienen ningún efecto en la unión al sustrato pero conduce a la inhibición de la actividad enzimática. Los autores refieren que el sustrato se encuentra estabilizado por una amplia red de enlaces hidrógeno, junto con una zona hidrofóbica formada por los triptófanos conservados: W20, W47 y W82, a la vez esta red se encuentra constituida por los residuos vecinos N22, D23, R148, E203, D148 y D239 necesarios para crear un bolsillo ideal de unión a sacarosa.

Los triptófanos 82 (W82) de 1-FEH IIa de *C. intybus* y 54 (W54) de 1-FEH de *S. sonchifolius* (Figura 17) se encuentran orientados de manera diferente respecto a sus homólogos W163 (Invertasa) y W82 (levansucrasa). La diferencia en el giro y la distancia con respecto a sus homólogos podría ser una causante de la inhibición del sustrato sacarosa acoplándose a la estructura enzimática en la configuración del inhibidor. Verhaest *et al.* (2007) mencionan que la unión de la sacarosa en *Cichorium* en la configuración del inhibidor es determinada por la orientación de un solo residuo W82 conservado en WSGSAT; esta orientación se encuentra establecida por el pequeño residuo de Ser101 que permiten que la sacarosa se una en la configuración alternativa al sustrato en el sitio activo y no se hidrolice.

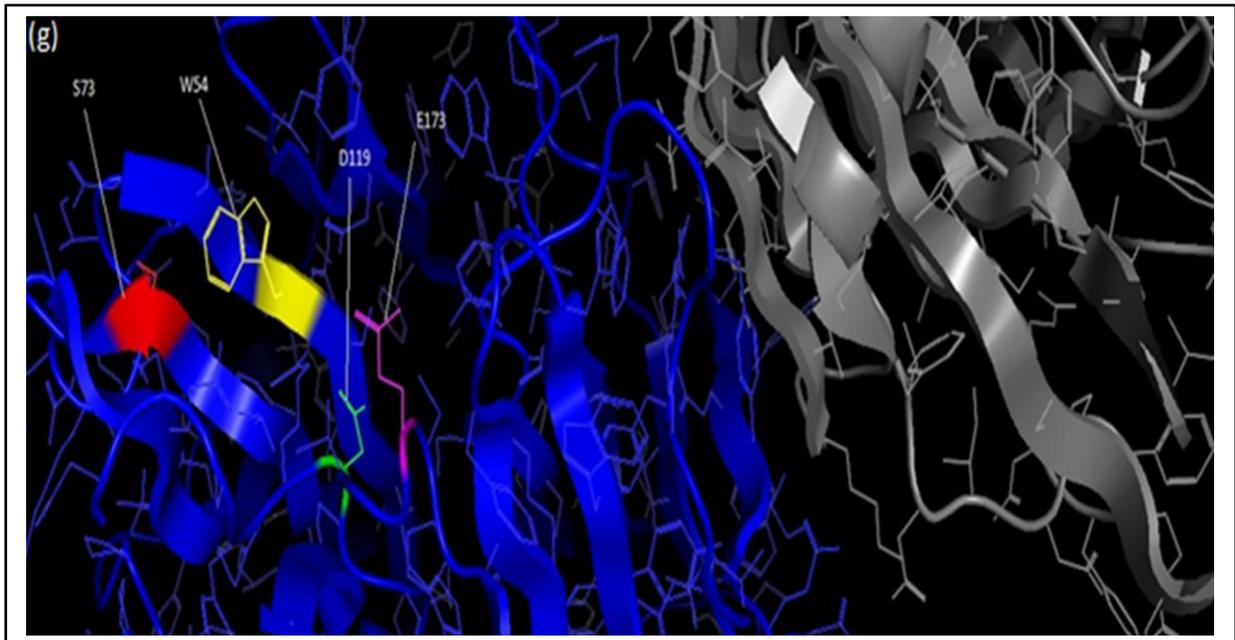


Figura 17. Modelado por homología de la FEH de yacón. Se observa los residuos: D119 (verde), E173 (rosa), W54 (amarillo) y S73 (rojo), homólogos a D147, E201, W82 Y S101 la 1-FEH II a de *C. intybus* correspondientemente. FUENTE: PyMol.

Verhaest *et al.* (2007) mencionan que el sustrato no podría hidrolizarse debido a la presencia de los enlaces hidrógenos entre el catalizador ácido/base y la fracción diferencial del glucosilo orientado hacia la sacarosa que obstaculiza al protón donante en su donación de protones al oxígeno glucosilo.

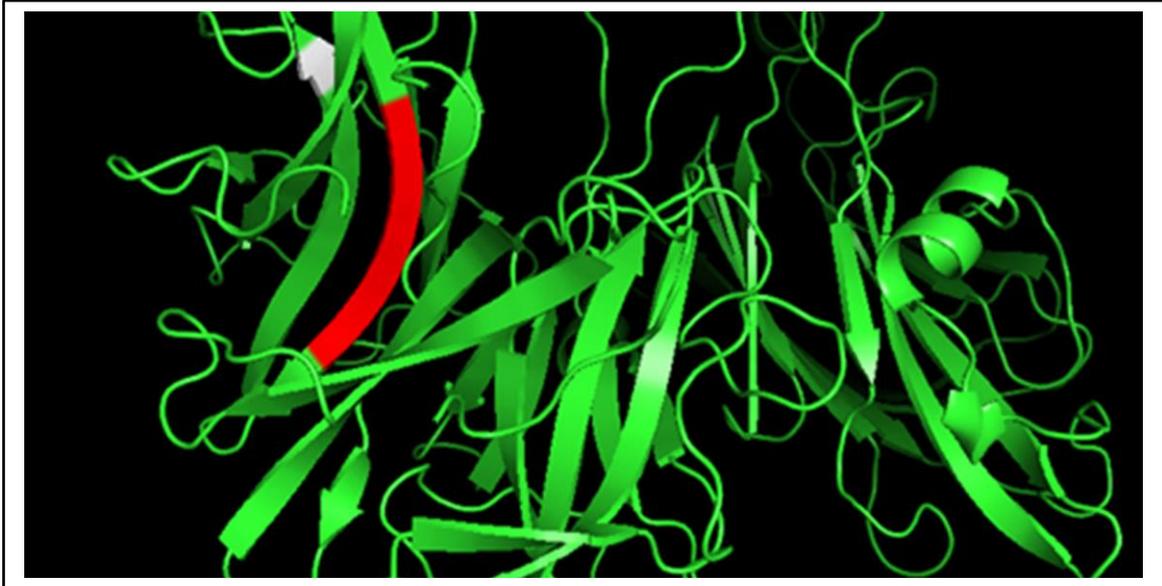


Figura 18. Modelado por homología de la FEH de *S. sonchifolius*, se representa el sitio WSGSAT (rojo) y el residuo SER73 (blanco) homólogo a Ser101 de *C. intybus*. FUENTE: *Swiss Model*.

Le Roy *et al.*, (2008) refieren que otras FEH son débilmente inhibidas por la sacarosa, estas enzimas presentan residuos hidrófobos como: Leu, Iso y Val dando una orientación diferente a W82 y probablemente impida que la sacarosa se acople a una configuración diferente a la del sustrato, sin embargo las FEH que contienen una Ser o Gly cerca al sitio W82 son fuertemente inhibidas por sacarosa, tal sea el caso de la FEH IIa de *C. intybus* o la FEH de *S. sonchifolius* que contienen una Ser cerca a este residuo (Figura 17 y Figura 18). Le Roy *et al.* (2008) realizaron experimentos de mutación dirigida al sitio en Serina 101 (SER101) en 1-FEH IIa de *C. intybus* sustituyéndolo por Leucina (S101L), un aminoácido apolar más grande, obteniendo como resultado la hidrólisis de la sacarosa, sin embargo fue necesario elevar tanto la concentración de enzima como la del sustrato. Los autores comprobaron que la 1-FEH IIa mutante permitía la unión de la sacarosa a la configuración del sustrato pero su hidrólisis era ineficiente.

Dadas las similitudes estructurales como la homología de residuos en las FEH, invertasas y levansucasas; las diferencias estructurales existentes podrían estar relacionadas a la estabilización o especificidad del sustrato. Al respecto, Chambert y Petit-Glatron (1991) y Yanase *et al.* (2002) mencionan la importancia de Arg360 (levansucrasa de *B. subtilis*) en

el reconocimiento del sustrato y las diferencias estructurales con su homólogo Glu234 (FEH IIa de *C. intybus*). Las mutaciones puntuales de Arg360 de levansucrasa, así como también las mutaciones inducidas en el homólogo His296 (levansucrosa en *Zymomonas mobilis*) mostraron el efecto en la polimerización de fructanos, ya que al sustituirlo por Lys, Ser o Leu resultó en la reducción de la capacidad de la enzima de formar el trisacárido kestosa.

Parece ser que la orientación de los residuos o toda una porción de secuencia juega un papel importante en la funcionalidad de la hebra, se tiene el conocimiento que el residuo Arg360 de levansucrasa se encuentra orientado hacia el sitio activo, mientras que Glu234 de 1-FEH IIa se tuerce sobre 180 grados en dirección opuesta. Meng y Fütterer (2003) mencionan que Arg360 forma el sitio de enlace para el residuo aceptor de levano y lo más probable es que la orientación sea diferente en el residuo homólogo de FEH o la ausencia completa en las invertasas. Estos aminoácidos pueden ser fundamentales para la diferencia estructural de la polimerización o degradación enzimática, ya que estas últimas solo tienen una pequeña molécula de agua como aceptor.

Otra diferencia estructural en el sitio activo es el Cys174 FEH, Cys202 en 1-FEH IIa, Cys191 en invertasa y el Arg343 correspondiente en levansucrasa. La mutación por sustitución del residuo Cys en invertasa de levadura por Ala mostró una disminución del 70% en la actividad de la enzima, por lo tanto es probable que Cys174 desarrolle un papel fundamental en el proceso catalítico, posiblemente manteniendo un microambiente adecuado en el sitio activo o tal vez en unión al sustrato. (Verhaest., 2005).

4.5.3. Sitio de Unión tentativo

Una hendidura (Figura 19, línea discontinua) que emerge del sitio activo se observa entre los dominios N y C terminal de 1-FEH IIa de *C. intybus* y la 1-FEH de *S. sonchifolius*. Le Roy *et al.* (2008) señalan que probablemente esta hendidura represente el sitio de unión a inulina basándose en la posición de 1-kestosa en el sitio activo donde su glucosa terminal

se orienta hacia la hendidura, incluyendo varias moléculas de glicerol en ella. Diversos autores como Verhaest (2005), Tremblay *et al.* (2006) y Le Roy *et al.* (2008) destacan la presencia de glicerol como un buen indicador para sitios de unión de alta afinidad al azúcar, además de la ausencia de un sitio putativo de N- glucosilación (N-X-S/T) cerca a la hendidura que parece ser una característica general de todas las FEHs capaces de degradar inulina de mayor DP.

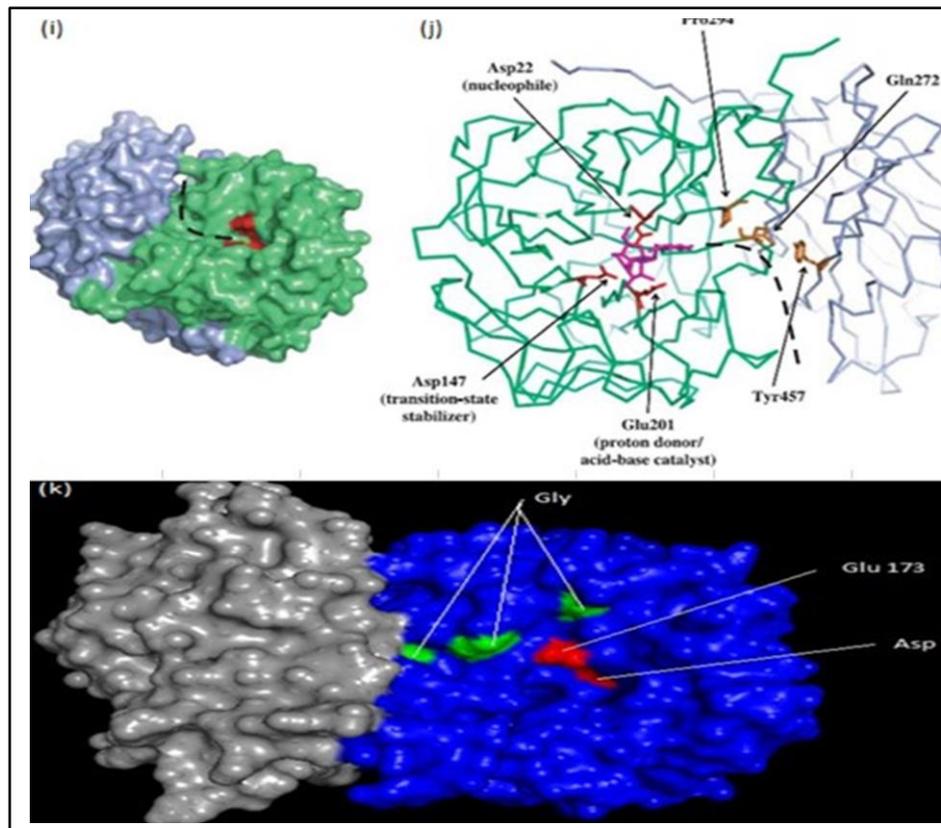


Figura 19. Descripción general de la estructura tridimensional de *C. intybus* fructan 1-exohidrolasa (1-FEH IIa). (i) presencia de una hendidura (línea punteada) entre los dominios N-terminal (verde) y C-terminal (azul). El sitio activo está indicado en rojo. (j) Detalle de 1-kestosa (rosa) en el sitio activo (rojo) de 1-FEH IIa. Los residuos sometidos a mutagénesis están indicados en naranja. Las figuras están preparadas con PyMol (DeLano, 2002).FUENTE: Le Roy *et al.*, 2007. (k) Modelado estructural de la FEH de yacón, dónde se observa los dominios N-terminal (Azul) y C-terminal (plomo), los residuos que conforman el sitio activo (rojo) y los residuos Gly (verde).

La invertasa de *A. thaliana* (AtcwInv) y la 6-FEH de *B. vulgaris* (Bv) sí contienen un sitio putativo de N-glucosilación cerca al sitio activo y lo más probable según Verhaest *et al.* (2006) es que se encuentre bloqueando la hendidura en AtcwInvI. Le Roy *et al.* (2007)

realizaron experimentos de mutagénesis en 1-FEH IIa de *C. intybus* para verificar el efecto de glucosilación cerca a la hendidura, creando un sitio de N- glucosilación a través del residuo Prolina 294. De ahí que P294N resultó en la disminución general de su actividad en diez veces la hidrólisis de 1- kestosa respecto al tipo salvaje, por otro lado, las inulinas de mayor DP no se vieron afectadas. Estos resultados sugieren que la introducción de la cadena de glucosilo muy probablemente bloquee la hendidura e impida la unión y degradación de la inulina (Le Roy *et al.*, 2007).

Verhaest *et al.*, 2006 refieren la presencia de una glucosilación ligada a Asparagina (N) en los homólogos de Pro294 de AtcwINV1 (Asn299) y Bv6-FEH (Asn293) confirmada por la determinación de la estructura. Es interesante que estas enzimas son capaces de degradar 1-kestosa de forma limitada pero no inulinas de mayor DP (Van den Ende *et al.*, 2003b; De Coninck *et al.*, 2005). Le Roy *et al.* (2007) realizaron experimentos de desglucosilación de estos residuos homólogos a P294 en AtcwINV1 (Asn299) y Bv6-FEH (Asn293), sus resultados sugieren que probablemente la ausencia de sitios de N-glucosilación son necesarios para crear un espacio a la inulina, pero no es suficiente para determinar su eficiente unión y catálisis.

Los resultados de las desglucosilaciones mostraron una fuerte disminución en la actividad específica general en ambas especies, la presencia del glucosilo en *A. thaliana* podría ser necesaria para mantener una conformación estable entre la enzima y el sustrato. Según Wyss (1996) las cadenas de glucosil cumplen un papel estabilizador a través de la presencia de enlaces hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre la cadena de oligosacáridos y la proteína. Por otro lado, los efectos de la desglucosilación de Bv6-FEH mostraron que el papel de los sitios de N-glucosilación podrían afectar al correcto plegamiento de la proteína además de su estabilización global.

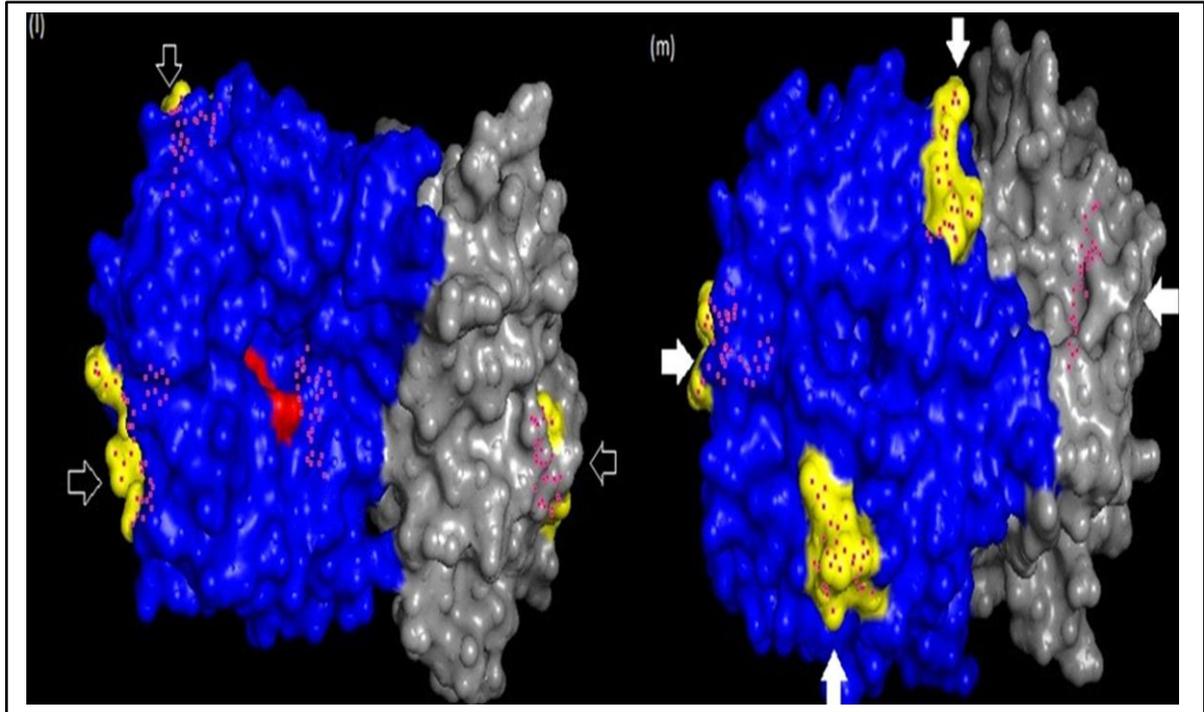


Figura 20. Modelado de la estructura cristalina de la 1-FEH de yacón, (l) sitios de N-glucosilación (color amarillo) lejanos al sitio activo (color rojo), (m) vista reversa de la estructura. Imagen obtenida por PYMOL.

El modelado por homología de la estructura correspondiente a la 1-FEH de *S. sonchifolius* reveló tres sitios de N-glucosilación lejanos al sitio activo (Figura 20), siendo probable que la enzima en estudio tenga la capacidad de hidrolizar cadenas de mayor grado de polimerización o que presente estos puntos de glucosilación con fines de estabilización según lo sugiere Le Roy *et al.* (2007).

V. CONCLUSIONES

1. La estandarización del protocolo de extracción CTAB permitió la obtención de un ARN total de buena cantidad y calidad a partir del tejido fresco de raíces de yacón (PER018279). Las modificaciones del protocolo se basaron en el uso de mayor concentración de ácido ascórbico y β -mercaptoetanol.
2. El ensamblaje y análisis de los amplicones obtenidos correspondió con la estructura parcial de un gen con probable actividad exohidrolasa (1-FEH) en raíces reservantes de yacón. El extremo no codificante del ARNm del gen 1-FEH correspondiente a la región 3' mostró un tamaño esperado de 292 bp.
3. La secuencia 1-FEH de yacón obtenida mostró un alto grado de identidad con las 1-FEHs de otras asteráceas *C. intybus* (88.5 por ciento), *H. tuberosus* (88.2 por ciento), *V. herbácea* (86.5 por ciento) y *A. lappa* (85 por ciento).
4. La simulación de cristalización de la estructura 1-FEH mostró similitud con otras FEH respecto al número de N- glicosilaciones y residuos claves fuera del sitio activo involucrados en el correcto funcionamiento de la enzima.
5. La secuencia de aminoácidos de la 1-FEH en yacón expuso tres probables sitios de N-glicosilación y dos de los tres sitios de las regiones consenso del sitio activo que confirmarían la identidad de 1-FEH.

VI. RECOMENDACIONES

1. El proceso de extracción de la enzima se debe iniciar en épocas frías, dónde se han reportado mayores concentraciones de FEH.
2. Se debe partir con buenas concentraciones de RNA cuando se emplean metodologías extensas como la clonación, evitando la pérdida del material de partida.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, RP; Pandey, RN; Flournoy; LE. 1996. Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) by Plant Polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* 14(1):17- 22.
- Alberto, F; Bignon, C; Sulzenbacher, G; Henrissat, B; Czjzek, M. 2004. "The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases". *The Journal of Biological Chemistry* 279(18):18903–18910.
- Altenbach, D; Nüesch, E; Ritsema, T; Boller, T; Wiemken, A. 2005. Mutational analysis of the active center of plant fructosyltransferases: festuca 1-SST and barley 6-SFT. *FEBS Lett* 579: 4647–4653.
- Altschul, SF; Gish, W; Miller, W; Myers, EW. Lipman, DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.
- Andersson, H; Asp, N-G; Bruce, A; Roos, S; Wadstrom, T; Wold, AE. 2001. Health effects of probiotics and prebiotics. A literature review on human studies. *Scandinavian Journal of Nutrition* 45: 58-75.
- Amaya, J. 2002. Desarrollo del yacón (*Polymnia sonchifolia* (Poepp&Endl)) a partir de rizóforos y de yemas axilares. Tesis Doctoral en Agronomía- Área de Horticultura. Universidad Estatal Paulista Julio de Mesquita Filho, Brasil. 89 p.

- Asami, T; Minamisawa, K; Tsuchiya, T; Kano, K; Hori, I; Ohyama, T; Kubota, M; Tsukihashi, T. 1991. Fluctuation of oligofructan contents in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*) during growth and storage. *Soil Science and Plant Nutrition* 62(6):621-627.
- Asega, AF; Carvalho, MA. 2004. Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 313–319.
- Asega, AF; Roberto, J; Schroeven, L; Van den Ende, W; Carvalho, MA. 2008 Cloning, Characterization and Functional Analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant and Cell Physiology* 49(8): 1185–1195.
- Aybar, MJ; Sánchez, AN; Grau, A; Sánchez, S. 2001. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 74(2):125–132.
- Batista, FR.; Hernández, L; Fernández, JR.; Arrieta, J; Menéndez, C; Gómez, R; Támara, Y; Pons, T. 1999. Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affects sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity. *The Biochemical Journal* 337(3):503–506.
- Barlow, JJ; Mathias, AP; Williamson, R; Gammack, DB. 1963. A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 13:61-66.
- Barrett, LW; Fletcher, S; Wilton, SD. 2012. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 69(21):3613–3634.
- Bernal-Lugo, I; Camacho, A; Carballo, A. 2000. Effects of seed ageing on the enzymatic antioxidant system of maize cultivars. In: Black, M; Bradford, KJ;

Vázquez-Ramos, J. (eds.). Proceedings of the Sixth International Workshop on Seeds, Mérida, México, 1999. 1:151-160.

- Bialeski, RL. 1993. Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. *Plant Physiology* 103(1):213-219.
- Blake, CC; Koenig, DF; Mair, GA; North, AC; Phillips, DC; Sarma, VR. 1965. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* 206(4986):757–761.
- Brighenti, F; Casiraghi, MC; Canzi, E; Ferrari, A. 1999. Effect of consumption of a ready to eat breakfast cereal containing inulin on the intestinal milieu and blood lipids in healthy male volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition* 53(9):726-733.
- *Brown,TA. 2006. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. Cambridge, MA: Blackwell Pub. [ISBN 978-1-4051-1121-8](#).*
- Cárdenas, M. 1969. Manual de plantas económicas de Bolivia. Imprenta Icthus, Cochabamba, Bolivia. 333 p.
- Cathala, G; Savouret, JF; Mendez, B; West, BL; Karin, M; Martial, JA; Baxter, JD. 1983. A Method for Isolation of Intact, Translationally Active Ribonucleic Acid. *DNA* 2 (4): 329-335.
- Cavers, P; Qaderi, M; Manku, R; Downs, M. 2000. Intermittent germination: causes and ecological implications. In: *Seed Biology, Advances and Applications*. Black, M; Bradford, K; Vázquez-Ramos, J (eds.). Proceedings of the Sixth International Workshop on Seeds, Mérida, México, 1999. p. 363-374.
- Chambert, R; Treboul, G; Dedonder, R. 1974. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* 41(2): 285–300.

- Chambert, R; Petit-Glatron, M.F. 1991. Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *The Biochemical Journal* 279 (1):35–41.
- Chan, C; Teo, SS; Ho, CL; Othman, R.; Phang, SM. 2004. Optimization of RNA extraction from *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 16: 297–301.
- Chen, HL; Lu, YH; Lin, JJ; Ko, LY. 2000. Effects of fructooligosaccharide on bowel function and indicators of nutritional status in constipation elderly men. *Nutrition Research* 20 (12):1725-1733.
- Cheng, BY; Janes, HW. 2001. *PCR Cloning Protocols*. 2ed, v. 192, p. 250-252.
- Chicata Pacheco, R. 1998. Viabilidad de la semilla botánica y comparación fenotípica de progenies y clones provenientes del germoplasma de yacón (*Polymnia sonchifolia*). Tesis de Grado, Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Perú. 152 p.
- Chomczynski, P; Sacchi, N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162(1):156-159.
- Claessens, G; Van Laere, A; De Proft, M. 1990. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L). *Journal of Plant Physiology* 136 (1):35–39.
- Collantes, M. 2009. Efecto del consumo de *polimnia sonchifolia* en los niveles de lípidos en pacientes dislipidémicos. *Revista especializada en Nutrición (ReNut)* 3(9):425-435.

- Collazos, C; White, P; White, H; Viñas, E; Alvistur, E; Urquieta, R; Vásquez, J; Díaz, C; Quiróz, A; Roca, A; Hegsted, M; Bradfield, R; Herrera, N; Faching, A; Robles, N; Hernández, E; Arias, M. 1993. La composición de alimentos de mayor consumo en el Perú. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Nutrición, Lima, Perú. 63 p.
- Cusi, MG; Cioé, L; Rovera, G. 1992. PCR amplification of GC-rich templates containing palindromic sequences using initial alkali denaturation. *BioTechniques* 12(4):502–504.
- Davidson, MH; Synecki, C; Maki, KC; Torri, SA; Drenan, KB. 1998. Effects of dietary inulin in serum lipids in men and women with hypercholesterolemia. *Nutrition Research* 18(3):503- 517.
- Davies, GJ; Henrissat, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3(9):853–859.
- Davies, GJ; Wilson, KS; Henrissat, B. 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *The Biochemical Journal* 321 pt. 2: 557–559.
- Dauter, Z; Lamzin, V; Wilson, K. 1997. The benefits of atomic resolution. *Current Opinion in Structural Biology* 7(5):681–688.
- De Coninck, B; Le Roy, K; Francis, I; Clerens, S; Vergauwen, R; Halliday, AM; Smith, SM; Van Laere, A; Van den Ende, W. 2005. Arabidopsis AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant Cell and Environ* 28:432–443.
- Degasperi, M.I; Itaya, N.M; Buckeridge, M.S; Figueiredo- Ribeiro, R.C.L. 2003 Fructan degradation and hydrolytic activity in tuberous roots of *Viguiera discolor*

Baker (Asteraceae), an herbaceous species from the cerrado. *Brazilian Journal of Botany* 26(1): 11–21.

- Delzenne, NM; Aertssens, J; Verplaetse, H; Roccaro, M; Roberfroid, M. 1995. Effect of fermentable fructooligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. *Life Science* 57(17):1579-1587.
- Delzenne, NM; Kok, N; Fiordaliso, M; Deboyser, D; Goethalsf; Roberfroid, M. 1993. Dietary fructooligosaccharides modifies lipid metabolism in rats. *American Journal of Clinical Nutrition* 57: S820.
- Delzenne, NM; KOK, NN. 1999. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *Journal of Nutrition* 129: S1467-S1470.
- De Roover, J; Van Laere, A; De Winter, M; Timmermans, JW; Van den Ende, W. 1999. Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiologia Plantarum* 106:28–34.
- DeLano, WL. 2002. *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, Palo Alto, CA.
- Delort, J; Dumas, J. B; Darmon, M. C; Mallet, J. 1989. An efficient strategy for cloning 5' extremities of rare transcripts permits isolation of multiple 5'-untranslated regions of rat tryptophan hydroxylase mRNA. *Nucleic Acids Research* 17(16):6439–6448.
- Demeke, T; Ratnayaka, I; Phan, A. 2009. Effects of DNA extraction and purification methods on real-time quantitative PCR analysis of Roundup Ready soybean. *Journal of AOAC International* 92(4):1136-1144.

- Ellegard, L; Andersson, H; Bosaeus, I. 1997. Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 51(1):1-5.
- Fakruddin, Md; Shahnewaj, K; Chowdhury, A; Mohamma, R; Hossain, N; Islam, S; Chowdhury, A. 2013. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 5(4):245-252.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17(6):368-376.
- Fernández, EC; Rajchl, A; Lachman, J; Cízková, H; Kvasnicka, F; Kotíková, Z; Milella, L; Voldrich, M. 2013. Impact of yacon landraces cultivated in the Czech Republic and their ploidy on the short- and long-chain fructooligosaccharides content in tuberous roots. *LWT - Food Science and Technology* 54:80-86.
- Fiordaliso, M; Kok, N; Desager, J; Goethals, F; Deboyser, D; Roberfroid, M; Delsenne, NM. 1995. Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. *Lipids* 30(2):163-167.
- Fisher, TR; Wells, JR. 1962. Heteromorphic pollen grains in *Polymnia*. *Rhodora*. 64:336-339.
- Foy, EV. 2005. *Smallanthus sonchifolius* en el tratamiento de hiperlipoproteínas e hipercolesterolemia inducidas en ratas albinas. *Rev. Facultad de medicina humana. Nutrición clínica* 5(1):27-31.
- Forvillede, E; De Souza, R; Ellendersen, L; Masson, M. 2014. Phenolic profile and antioxidant activity of extracts of leaves and flowers of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Industrial Crops and Products* 62:499–506.

- Frías, AM; Grau, A; Lozzia, E; Caro, S. 1997b. Estudio citológico del yacón (*Polymnia sonchifolia*) y el yacón del campo (*P. macroscypha*). Congreso Argentino de Genética (28, 1997, Tucumán, Argentina).
- Froger, A; Hall, JE. 2007. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments* (6):253.
- Frohman, MA; Martin, G.R. 1989. Rapid amplification of cDNA ends using nested primers. *Technique* 1:165-170.
- Fukai, k; Ohno, S, Nanjo, F; Hara, Y. 1997. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science and Plant Nutrition* 43(1):171-177.
- Genta, S; Cabrera, W; Habib, N; Pons, J; Carrillo, IM; Grau, A; Sánchez, S. 2009. Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition* 28(2):182–187.
- Gibson, GR; Roberfroid, MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition* 125(6):1401-1412.
- Gmeiner, M; Kneifel, W; Kulbe, KD; Wouters, R; De Boever, P; Nollet, L; Verstraete, W. 2000. Influence of a synbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME Reactor). *Applied Microbiology Biotechnology* 53(2):219-223.
- Graefe, S; Hermann, M; Manrique, I; Golombek, S, Buerkert, S. 2004. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. *Field Crops Research* 86(2):157-165.

- Grau, A; Slanis, A. 1996. Is *Polymnia sylphiooides* var. *perennis* a wild ancestor of yacon? Resumos I Congreso Latino Americano de Raíces Tropicais. CERAT-UNESP. São Pedro, Brasil.
- Grau, A; Rea, J. 1997. Yacon, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp & Endl.) H. Robinson. In: Hermann M. & J Heller (eds.): Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca, yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 21. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. p. 199-242.
- Gutterman, Y. 2000. Genotypic and phenotypic germination survival strategies of ecotypes and annual plant species in the Negev Desert of Israel. In: Black M, Bradford K, Vásquez-Ramos J (eds.). Seed Biology: Advances and applications. Proceedings of the Sixth International Workshop on Seeds, Mérida, México, 24-28 Jan 1999. CABI, Wallingford, p. 389-399.
- Habib, NC, Honoré, SM; Genta, SB; Sánchez, SS. 2011. Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats. Biochemical approach. *Chemico-Biological Interactions* 194(1): 31–39.
- Hasegawa, M; Lida, Y; Yano, T; Takaiwa, F; Iwabuchi, M. 1985. Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* 22(1):32-38.
- Heiser, C. 1963. Numeración cromosómica de plantas ecuatorianas. *Ciencia y Naturaleza*. 6:2-6.
- Hermann, M; Freire, I; Pazos, C. 1999. Compositional diversity of the yacon storage root. In: *Impact a changing world: Program Report 1997-98*. International Potato Center (CIP), Lima, Perú. p. 425-432.

- Huang, SH; Hu, YY; Wu, CH; Holcenberg, J. 1990. A simple method for direct cloning cDNA sequence that flanks a region of known sequence from total RNA by applying the inverse polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 18(7):1922.
- Ishiki, K; Salgado Moreno, Arellano, J. 1997. Revision of chromosome number and Karyotype of Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Resúmenes del Primer Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos del Noroeste Argentino. INTA, Salta, Argentina.
- Jackson, KG; Taylor, GR; Clohessy, AM; Williams, MC. 1999. The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and women. *The British Journal of Nutrition* 82(1):23-30.
- Jirovsky, D; Horáková, D; Kotouček, M; Valentová, K; Ulrichová, J. 2003. Analysis of phenolic acids in plant materials using HPLC with amperometric detection at a platinum tubular electrode. *Journal of Separation Science* 26(8):739–742.
- Johnson, LN; Phillips, DC. 1965. Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Angstrom resolution. *Nature* 206(4986): 761–763.
- Koshland, DE; Stein, SS. 1954. Correlation of Bond Breaking with Enzyme Specificity. Cleavage Point of Invertase. *The Journal of Biological Chemistry* 208:139–148.
- Lachman, J; Havrland, B; Fernández, EC; Dudjak, J. 2004. Saccharides of yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson) tubers and rhizomes and factors affecting their content. *Plant Soil Environ* 50(9):383-390.

- Lammens, W; Le Roy, K; Van Laere, A; Rabijns, A; Van den Ende, W. 2008. Crystal Structures of *Arabidopsis thaliana* Cell-Wall Invertase Mutants in Complex with Sucrose. *Journal of Molecular Biology* 377(2):378–385.
- Lakhvir, L; Rashmita, S; Rajesh, G; Priti, S; Sanjay, K. 2001. RNA Isolation from high-phenolic tea leaves and apical buds. *Plant Molecular Biology Reporter* 19(2):181.
- Lau, EC; Li, ZQ; Slavkin, SC. 1993. Preparation of denatured plasmid templates for PCR amplification. *BioTechniques* 14:378.
- Le Roy, K; Lammens, W; Verhaest, M; De Coninck, B; Rabijns, A; Van Laere, A; Van den Ende, W. 2007b. Unraveling the difference between invertases and fructan exohydrolases: A single amino acid (Asp-239) substitution transforms *Arabidopsis* cell wall invertase1 into a fructan 1-exohydrolase. *Plant Physiology* 145(3):616–625.
- Le Roy, K; Verhaest, M; Rabijns, A; Clerens, S; Van Laere, A; Van den Ende, W. 2007a. *N*-glycosylation affects substrate specificity in chicory 1-FEH IIa: evidence for the presence of an inulin binding cleft. *The New Phytologist* 176(2):317–324.
- Le Roy, K; Lammens, W; Van Laere, A; Van den Ende, W. 2008. Influencing the binding configuration of sucrose in the active sites of chicory fructan 1-exohydrolase and sugar beet fructan 6-exohydrolase. *The New Phytologist* 178(3):572–580.
- León, J. 1964. Plantas alimenticias andinas. Boletín técnico N°.6. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Zona Andina. Lima, Perú. 112p.
- Lodhi, MA; Ye, GN; Weeden, NF; Reisch, BI. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1):6-13.

- Loh, EY; Elliott, JF; Cwirla, S; Lanier, LL; Davis, MM. 1989. Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain. *Science* 243 (4888):217-220.
- Loomis, WD. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology* 31:528-544.
- Lothier, J; Lasseur, B; Le Roy, K; Van Laere, A; Prud'homme, MP; Barre, P; Van den Ende, W; Morvan-Bertrand, A. 2007. Cloning, gene mapping, and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from *Lolium perenne* implicated in fructan synthesis rather than in fructan mobilization. *Journal of Experimental Botany* 58(8):1969–1983.
- Luo, J; Rizkalla, SW; Alamowitch, C; Boussairi, A; Blayo, A; Barry, JL; Laffitte, A; Guyon, F; Bornet, FR; Slama, G. 1996. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63(6):939-945.
- Luo, J; Van Yperselle, M; Rizkalla, SW; Rossi, F; Bornet, FR; Slama, G. 2000. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides does not affect basal hepatic glucose production or insulin resistance in type 2 diabetics. *The Journal of Nutrition* 130(6):1572-1577.
- Mahipal, S; Arpita, Y; Xiaoling, M; Eugene, A. 2010. Plasmid DNA Transformation in *Escherichia Coli*: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl₂ Treated Cells. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6(4): 561–568.

- Manrique, I; Gonzales, R; Valladolid, A; Blas, R; Lizárraga, L. 2014. Producción de semillas en yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.)) mediante técnicas de polinización controladas. *Ecología Aplicada* 13(2):135-145.
- Manrique, I; Párraga, A. 2005. Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos Andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). Jarabe de yacón: principios y procesamiento. Lima: Centro Internacional de La Papa. 40p.
- Mansilla, R; López, C; Flores, M; Espejo, R. 2010. Estudios de la Biología Reproductiva en cinco accesiones de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) Robinson. *Ecología Aplicada* 9(2):167-175.
- Mayta, P; Payano, J; Peláez, J; Pérez, M; Pichardo, L; Pucán, L. 2001. Efecto hipoglicemiante de la raíz del *Smallanthus sonchifolius* en adultos jóvenes clínicamente sanos (estudios preliminares). In Simposio Latinoamericano de Raíces y Tubérculos (2, 2001, Lima, Perú). Guía del participante. Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Perú, np. (resumen).
- Mantovani, W; Martins, FR. 1988. Variaciones fenológicas de las especies del cerrado de la Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 11:101–112.
- McCarter, JD; Withers, SG. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology* 4(6):885–892.
- Meng, G; Fütterer, K. 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology* 10(11):935–941.
- Meyer, S; Temme, C; Wahle, E. 2004. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 39(4):197-216.

- Mullis, KB.1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262(4):56-61.
- Meza, G. 1995. Variedades nativas de Llacon (*Polymnia sonchifolia* Ker Gawler) en Cusco. UNSAAC-CICA, Kayra; CIP-COTESU.
- Michiels, A; Van Laere, A; Van den Ende, W; Tucker, M. 2004. Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. *Journal of Experimental Botany* 55(401):1325–1333.
- Muñoz, AM; Ramos-Escudero, F; Alvarado-Ortiz, C; Castañeda, B. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química Del Perú* 73(3):142-149.
- Niness, KR. 1999. Inulin and oligofructose: What are they? *Journal of Nutrition* 129(supl. 7): S1402-S1406.
- Ninfa, J; Alexander, P; Ballou, D. 2004. Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology. Wiley. ISBN 1891786008. OCLC 633862582.
- Ohara, O; Dorit, RL; Gilbert, W. 1989. One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(15):5673–5677.
- Ohyama, T; Ito, O; Yasuyoshi, S; Ikarashi, T; Minamisawa, K; Kubota, M; Tsukihashi, T; Asami, T. 1990. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacón (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science and Plant Nutrition* 36(1):167- 171.
- Ozimek, LK; van Hijum, SA; van Koningsveld, GA; van der Maarel, MJ; van Geel-Schutten, GH; Dijkhuizen, L. 2004. Site-directed mutagenesis study of the three

catalytic residues of the fructosyltransferases of *Lactobacillus reuteri* 121. FEBS Letters 560(1): 131–133

- Ozimek, LK; Kralj, S; van der Maarel, MJ; Dijkhuizen, L. 2006. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. Microbiology 152 pt. 4:1187–1196.
- Pedersen, AB; Sandström, B; Van Amelsvoort, JM. 1997. The effect of ingestion of inulin on blood lipids and gastrointestinal symptoms in healthy females. British Journal of Nutrition 78(2):215-222.
- Pedreschi, R; Campos, D; Noratto, G; Chirinos, R; Cisneros-Zevallos, L. 2003. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(18):5278-5284.
- Polanco, M. 2011. Caracterización Morfológica y Molecular de materiales de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poep. & Endl) H. Robinsón Colectados en la Eco-Región Eje Cafetero de Colombia. Tesis Magister en Ciencias Agrícolas con énfasis en Fitomejoramiento. Palmira, Colombia. Universidad Nacional De Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias Coordinación General de Posgrados.
- Portes, MT; Carvalho, MAM. 2006. Spatial distribution of fructans and fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbácea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) in different developmental phases. Plant Science 170:624–633.
- Portes, MT; Figueiredo-Ribeiro, RC; Carvalho, MA. 2008. Low temperature and defoliation affects fructan-metabolizing enzymes in different regions of the rhizophores of *Vernonia herbacea*. Journal of Plant Physiology 165(15):1572-1581.

- Reddy, VA; Maley, F. 1990. Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 265(19):10817–10820.
- Reddy, VA; Maley, F. 1996. Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *The Journal of Biological Chemistry* 271(24):13953–13957.
- Rhodes, G. 2006. *Crystallography Made Crystal Clear, Third Edition: A Guide for Users of Macromolecular Models*, 3rd ed., Academic Press.
- Ritsema, T; Hernández, L; Verhaar, A; Altenbach, D; Boller, T; Wiemken, A; Smeekens, S. 2006. Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box. *The Plant Journal* 48:228–237.
- Roberfroid, MB. 1993. Dietary fiber, inulin and oligofructose: A review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33(2):103-148.
- Roberfroid, MB. 1999. Caloric value of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition* 129 suppl. 7: S1436-S1437.
- Roberfroid, MB. 2000. Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. *Nutrition* 16(7/8):677-679.
- Rubio-Piña, J; Zapata-Pérez, O. 2011. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 14(5):1-2.
- Rutherford, PP. 1981. Some biochemical changes in vegetables during storage. *Annals of Applied Biology* 98:538-541.

- Russo, D; Valentão, P; Andrade, P; Fernández, E; Milella, L. 2015. Evaluation of Antioxidant, Antidiabetic and Anticholinesterase Activities of *Smilax sonchifolia* Landrace and Correlation with Their Phytochemical Profiles. International Journal of Molecular Sciences 16 (8):17696-17718.
- Saiki, R; Scharf, S; Faloona, F; Mullis, K; Horn, GT; Erlich, HA; Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230(4732):1350–1354.
- Saiki, RK; Gelfand, DH; Stoffel, S; Scharf, SJ; Higuchi, R; Horn, G; Mullis, KB; Erlich, HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239(4839):487–491.
- Salgado Moreno, VX. 1996. Evaluación y caracterización citogenética de 16 estradas de Jicama (*Polymnia sonchifolia* Poep. & Endl.) de Sudamérica. Tesis de Grado, Universidad Central del Ecuador.
- Salzman, RA; Fujita, T; Zhu-Salzman, K; Hasegawa, PM; Bressan, RA. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. Plant Molecular Biology Reporter 17:11-17.
- Sghir, A; Chow, JM.; Mackie, RI. 1998. Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharides as selective substrate. Journal of applied Microbiology 85(4):769-777.
- Seminario, J; Valderrama, M; Manrique, I. 2003. El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), Lima, Perú, 60 p.

- Seminario, J; Valderrama, M. 2003. Propagación de tres morfotipos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp&Endl)) H. Robinson, Mediante Nudos de tallo. Programa de Raíces y Tubérculos Andinos. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Universidad Nacional de Cajamarca 11(1):109-117.
- Simonovska, B; Vovk, I; Andrensek, S; Valentová, K; Ulrichová, J. 2003. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. Journal of Chromatography A 1016(1):89-98.
- Soto, J. 2012. Evaluación de la diversidad genética de colecciones de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) “Yacón” del Perú. Tesis Magister en Mejoramiento Genético de Plantas. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Sousa, S; Pinto, J; Rodrigues, C; Gião, M; Pereira, C; Tavaría, F; Malcata, F; Gomes, A; Bertoldo-Pacheco, M; Pintado, M. 2015. Antioxidant properties of sterilized yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour. Journal Science Direct Food Chemistry 188:504-509.
- Svobodová, E; Dvoráková, Z; Čepková, PH; Viehmanová, I; Havlíčková, L; Fernández, E; Russo, D; Meza, G. 2013. Genetic diversity of yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson) and its wild relatives as revealed by ISSR markers. Journal of Biochemical Systematics and Ecology 50:383–389.
- Sturm, A; Hess, D; Lee, HS; Lienhard, S. 1999. Neutral invertase is a novel type of sucrose-cleaving enzyme. Physiologia Plantarum 107:159–165
- Suzuki, M; Chatterton, NJ. 1996. Science and technology of fructans. CRC Press. USA. 193-199.

- Tamura, K; Dudley, J; Nei, M; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8):1596-1599.
- Talledo, D; Escobar, M. 1996. Caracterización cariotípica de germoplasma RTA. Laboratorio de Biología Celular y Genética. Memorias. Quito, Ecuador: INIAP.
- Tapia, C; Castillo, R; Mazón, N. 1996. Catálogo de Recursos Genéticos de raíces y tubérculos andinos en el Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quito, Ecuador, 180p.
- Takasugi, M; Masuda, T. 1996. Three 4'-hydroxyacetophenone-related phytoalexins from *Polymnia sonchifolia*. *Phytochemistry. Ecological Biochemistry* 43(5):1019-1021.
- Takenaka, M. Yan, X; Yoshida, M; Nagata, T; Nakanishi, T. 2003. Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(3):793-796.
- Tiwari, K; Jadhav, SK; Gupta, S. 2012. Modified CTAB technique for isolation of DNA from some medicinal plants. *Research Journal of Medicinal Plants* 6:65-73.
- Tremblay, DM; Tegoni, M; Spinelli, S; Campanacci, V; Blangy, S; Huyghe, C; Desmyter, A; Labrie, S; Moineau, S; Cambillau, C. 2006. Receptor-binding protein of *Lactobacillus lactis* phages: Identification and characterization of the saccharide receptor-binding site. *Journal of Bacteriology* 188(7):2400– 2410.
- Valentová, K; Ulrichová, J. 2003. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* prospective andean crops for the prevention of chronic diseases. *Biomedical Papers* 147(2): 119-130.

- Valentová, K; Cvak, L; Muck, A; Ulrichová, J. Simanek, V. 2003. Antioxidant activity of extracts on rat hepatic metabolism. *European Journal of Nutrition* 42:61–66.
- Van Den Ende, W; Mintiens, A; Speleers, H; Onuoha, A; Van Laere, A. 1996. The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* L. during growth, storage and forcing. *New Phytol* 132:555–563.
- Van den Ende, W; Michiels, A; Van Wonterghem,, D; Clerens, S; De Roover, J; Van Laere, A. 2001. Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIa and 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiology* 126(3):1186–1195.
- Van den Ende, W; Michiels, A; De Roover, J; Van Laere, A. 2002. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *Scientific World Journal* 2:1281–1295.
- Van den Ende, W; Clerens, S; Vergauwen, R; Van Riet, L; Van Laere, A; Yoshida, M; Kawakami, A. 2003a. Fructan 1- exohydrolases. Beta-(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology* 131(2):621–631.
- Van den Ende, W; De Coninck, B; Van Laere, A. 2004. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends in Plant Science* 9(11):523–528.
- Van den Ende, W; Yoshida, M; Clerens, S; Vergauwen, R; Kawakami, A. 2005. Cloning, Characterization and functional analysis of novel 6-Kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* 166(3):917-932.

- Venkatachalam, P; Thanseem, I; Thulaseedharan, A. 1999. A rapid and efficient method for isolation of RNA from bark tissues of *Hevea brasiliensis*. *Current Science* 77(5): 635-637.
- Vergauwen, R; Van Den Ende, W; Van Laere, A. 2000. The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. *Journal of Experimental Botany* 51(348):1261–1266.
- Verhaest, M; Van den Ende, W; Le Roy, K; De Ranter, CJ; Van Laere, A; Rabijns, A. 2005. X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *The Plant Journal* 41(3):400–411.
- Verwoerd, T; Dekker, BM; Hoekema, A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research* 17(6):2362.
- Wells, JR. 1971. Variation in *Polymnia* pollen. *American Journal of Botany* 38:124-130.
- Whelan, S; Goldman, N. 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *The Molecular Biology and Evolution* 18(5):691-699.
- Wyss, DF; Wagner G. 1996. The structural role of sugars in glycoproteins. *Current Opinion in Biotechnology* 7(4):409–416.
- Yamashita, K; Kawai, K; Itakura, M. 1984. Effect of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutrition Research* 4(6): 961-966.
- Yan, X; Suzuki, M; Ohnishi-Kameyama, M; Sada, Y; Nakanishi, T; Nagata, T. 1999. Extraction and identification of antioxidants in the root of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(11):4711-4713.
- Yanase, H; Maeda, M; Hagiwara, E; Yagi, H; Taniguchi, K; Okamoto, K. 2002. Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *Journal of Biochemistry* 132(4):565–572.

- Zardini, E. 1991. Ethnobotanical notes on “Yacon”, *Polymia sonchifolia* (Asteraceae). *Economic Botany* 45 (1):72-85.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de extracción de ARN Total con TRIZOL

Chomczynski *et al.*, 1987

Extracción y Homogenizado.

- Colocar 50 – 100 mg de tejido de raíz en un Eppendorf de 2.0 ml, sobre nitrógeno líquido.
- En una gradilla previamente enfriada en nitrógeno líquido colocar el eppendorf conteniendo el tejido, seguidamente pulverizar el tejido utilizando un pilón de plástico.
- Colocar nuevamente el Eppendorf sobre nitrógeno líquido. Agregar 1 ml, de Trizol – Reagent (Invitrogen) y homogeneizar en un vórtex.
- Dejar reposar durante 5 min, a T° ambiente.

Separación

- Centrifugar por 10 min, a 12 000 g y 4°C.
- Recuperar el sobrenadante en un Eppendorf conteniendo 400 µl de cloroformo, agitar vigorosamente por 15 segundos, dejar en reposo 15 min, a T° ambiente.
- Centrifugar por 15 min, a 12 000 g y 4 °C.

Precipitación y Lavado

- Remover cuidadosamente utilizando un pipetor el sobrenadante, a un Eppendorf y agregar igual volumen de isopropanol.
- Centrifugar por 20 min, a 12 000 g y 4°C.

- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante para evitar que se desprenda el pellet, después de eliminar el isopropanol secar el borde del Eppendorf.
- Lavar el pellet Adicionando 1 ml de etanol al 70 % y agitando.
- Centrifugar por 10 min, a 12 000 g y 4°C.
- eliminar el sobrenadante, secar el borde del Eppendorf.
- Llevar el pellet a una campana de extracción durante 30 – 60 min, hasta la total evaporación del alcohol. Finalmente, resuspender el pellet en 100 µl de agua destilada libre de nucleasas y almacenar a -20°C.

Anexo 2: Protocolo de extracción de ARN Total empleando LiCl 0,1M

Verwoerd *et al.*, 1989

- Pesar 100 mg de raíces reservantes y colocarlos en tubos Eppendorf de 2 ml.
- Sumergir los tubos Eppendorf conteniendo el tejido en nitrógeno líquido (se pueden almacenar a – 80°C, hasta su uso).
- Colocar los tubos en una gradilla en la que los tubos ajusten perfectamente, para permitir fácilmente triturar el tejido,
- Triturar el tejido utilizando un pequeño pilón de plástico previamente enfriado hasta obtener un fino polvo (Trabajar rápidamente evitando que el tejido vuelva a hidratarse).
- Agregar 500 µl de buffer de extracción [fenol – 0.1M LiCl, 0.1M Tris HCl pH 8.0, 0.01M EDTA, 1% SDS (1:1)] previamente calentado (80 °C) y homogenizar durante 30 segundos.
- Adicionar 250 µl de una mezcla de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1) y agitar en un vórtex.
- Centrifugar durante 10 minutos a 13 000 r.p.m.
- Recuperar el sobrenadante y Repetir pasos 6 - 7
- Recuperar el sobrenadante y mezclar con LiCl 4M (1:1).
- Precipitar el ARN durante toda la noche a 4°C, colectando el precipitado por centrifugación a 13 000 r.p.m. durante 15 minutos
- Disolver el Pellet en 250 µl de agua
- Agregar 0.1 volúmenes de 3M AcONa pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol.
- Centrifugar a 13 000 r.p.m durante 15 minutos y hacer 3 lavados del pellet con etanol al 70%.
- Secar levemente el pellet (dejar secar el pellet demasiado afecta su solubilidad).
- Resuspender en 50 – 100 µl de agua bidestilada estéril libre de ARNasa.

Anexo 3: Protocolo de extracción de RNA total usando el kit RNeasy Mini Kit, Qiagen

(RNeasy Mini Kit, Qiagen, Germany)

- Pesar 100 mg de tejido de raíz tuberosa y colocar en un mortero
- Agregar 450 μ l de buffer RLC (Guanidina Hidroclorida) y 15 μ l de β -mercaptoetanol.
- Triturar y homogenizar utilizando un mortero estéril y frío.
- Transferir todo el lisado a una columna de color violeta (aproximado 600 μ l) previamente colocado dentro de un tubo colector
- Centrifugar por 30 segundos a 12 000 r.p.m.
- Del tubo colector recuperar el sobrenadante y transferir a un tubo de 1,5 ml.
- Adicionar 0.5 volúmenes de etanol absoluto, pipeteando suavemente.
- Agregar la suspensión a un tubo de color rosado previamente colocado dentro de un tubo colector.
- Centrifugar por 30 segundos a 12 000 r.p.m.
- Eliminar el contenido del tubo colector
- Agregar luego 700 μ l de RW1.
- Centrifugar por 30 segundos a 12 000 r.p.m.
- Agregar luego 700 μ l de RLE.
- Centrifugar por 30 segundos a 12 000 r.p.m.
- Eliminar el contenido del tubo colector
- Centrifugar luego por 3 minutos a 12 000 r.p.m., agregando luego 50 μ l de agua libre de nucleasas.
- Centrifugar por 3 minutos a 12 000 r.p.m. y almacenar a -20 °C.

Anexo 4: Protocolo de extracción de RNA total utilizando el protocolo CTAB (Lodhi *et al.*, 1994) modificado por R. Torres A

- Colocar 1 gr de raíces reservantes en un mortero y agregar 200 µl de β-mercaptoetanol, 500 µl de ácido ascórbico y 2 ml de buffer CTAB.
- Triturar y macerar utilizando un mortero y un pilón enfriado, añadiendo otros 7 ml de buffer CTAB.
- Agregar 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1), mezclando vigorosamente por inversión.
- Centrifugar por 10 minutos a 5 000 r.p.m
- Recuperar el sobrenadante, repetir el proceso desde la adición de cloroformo: alcohol: isoamílico (49; 1).
- Precipitar con 1 volumen de 2-propanol, dejando reposar por 2 horas a 4 °C.
- Centrifugar por 25 minutos a 5 000 r.p.m.
- Resuspender en 600 µl de 100 mM de LiCl, 20 mM de Tris – HCl pH 8 y 1 mM de EDTA.
- Extraer una vez con 1 volumen de cloroformo isoamílico 49:1
- Precipitar el RNA con 1 volumen de LiCl 5M, mezclando por inversión y precipitar durante toda la noche a 4 °C.
- Colectar el RNA por centrifugación a 13 000 r.p.m. por 20 minutos.
- Eliminar el sobrenadante
- Lavar 2 veces el pellet con 1 ml de etanol al 70 %.
- Dejar secar el pellet a temperatura ambiente
- Resuspender luego en 50 µl de agua libre de nucleasas
- Almacenar a -20 ° C

Buffer CTAB

3% CTAB

100 mM Tris-HCl, pH8.0

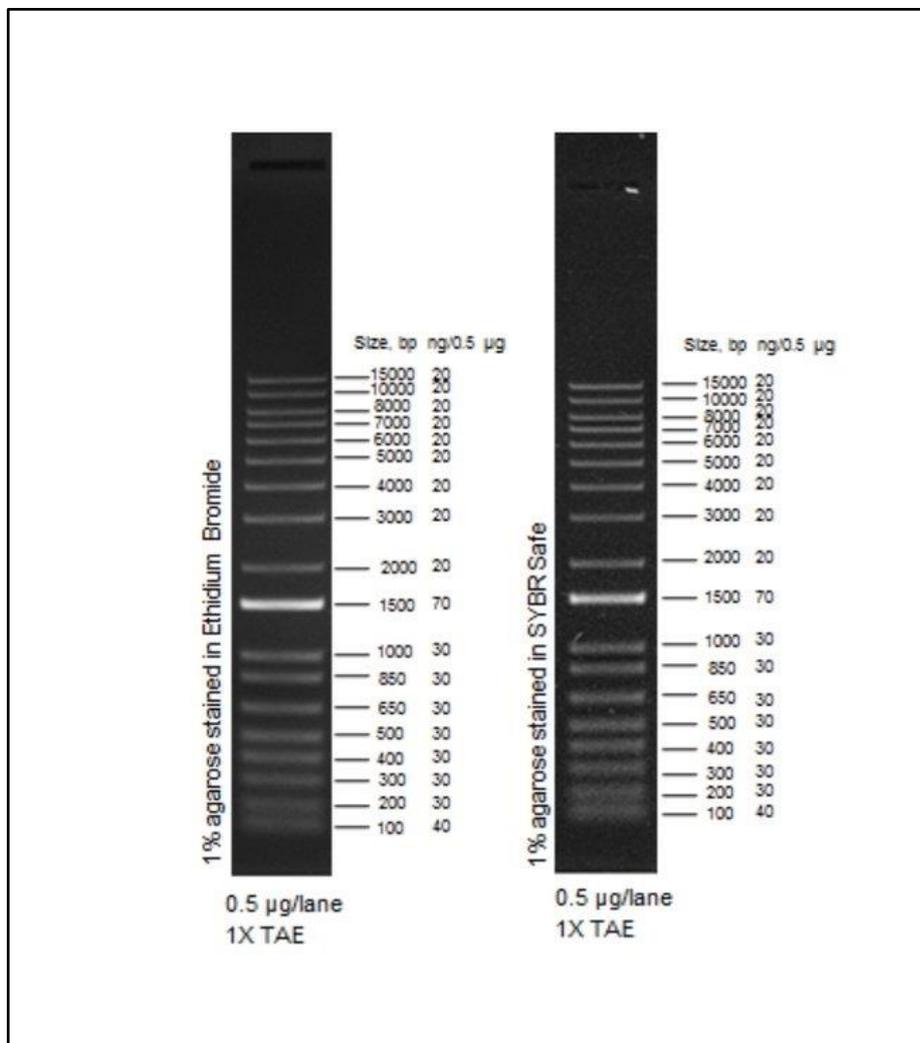
20mM EDTA

1.4M NaCl

2.0% PVP-40, previo al uso.

Anexo 5.

Marcador 1Kb Plus Invitrogen.



Anexo 6.

Vector pGEMT-easy.

