

1. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

Código:	CIVABI-010113
Centro de Investigación:	Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad
Programa:	BIOTECNOLOGÍA Y RECURSOS GENÉTICOS
Título del Proyecto:	Estandarización de un Protocolo para el Aislamiento y Cuantificación de los Genes para la Expresión de Antocianinas en tres variedades o ecotipos pertenecientes al género rubus, colectadas en la provincia de Tungurahua.
Grupo de Investigación:	Biodiversidad y Recursos Genéticos
Area de Conocimiento:	Ciencias de la Vida
Línea de Investigación:	Biodiversidad y Recursos Genéticos
Tipo de Investigación:	Aplicada
Campo :	Tecnologías
Investigador Principal :	VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS
Proyectos Vinculados :	
Duración del Proyecto :	12 Meses
Localización del Proyecto :	Laboratorio de Biología Molecular - CIVABI
Fecha de ingreso :	27/09/2013 11:08

2. ANTECEDENTES

Rubus es uno de los géneros de mayor diversidad morfológica y genética. Este género presenta un amplio espectro de especies silvestres y de cultivares domesticados para fruta comestible. Esta fruta se la puede consumir tanto en fresco como en procesado y con el reciente enfoque de salud y bienestar relacionados con su actividad antioxidante, el consumo y por lo tanto la demanda ha aumentado en los últimos años. Entre los trabajos de actualidad en mejoramiento se ha buscado variedades para un alto contenido de antocianinas para diferentes aplicaciones en industria y salud.

Si bien este cultivo tiene grandes potencialidades de crecer de la misma manera los problemas fitopatológicos y plagas pueden incrementarse. Entre las enfermedades más importantes se encuentra *Botrytis cinérea*. Otro problema que se suscita es la verticilosis causada por *Verticillium sp.*, que produce daños vasculares y la marchitez.

En los últimos años el cultivo a gran escala ha estado limitado, por la dificultad en la obtención de material para la siembra certificada, de buena calidad genética y sanitaria, así como en la cantidad para iniciar una nueva plantación, la propagación actualmente se la realiza vía asexual principalmente (Marulanda et al. 2000).

Uno de los objetivos primordiales del cultivo y comercialización de rubus son las antocianinas, estos, son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. Estas pertenecen al grupo de los flavonoides y son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. Sus funciones en las plantas son múltiples, desde la de protección de la radiación ultravioleta hasta la de atracción de insectos polinizadores.

El interés por los pigmentos antocianínicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorantes alimenticios, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. Ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos, además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas y otras muchas más aplicaciones como en funciones neurológicas, el sistema inmune, entre otras.

3. JUSTIFICACIÓN

Rubus es uno de los géneros de mayor diversidad morfológica y genética. Este género presenta un amplio espectro de especies silvestres y de cultivares domesticados para fruta comestible. Esta fruta se la puede consumir tanto en fresco como en procesado y con el reciente enfoque de salud y bienestar relacionados con su actividad antioxidante, el consumo y por lo tanto la demanda ha aumentado en los últimos años. Ecuador, en el año 2008 obtuvo un crecimiento significativo en la exportación de *Rubus glaucus* (mora), alcanzando 22 mil USD que representan cerca de 12 toneladas de mora, con un crecimiento equivalente al 241.25% respecto al 2007. Estados Unidos es el primer socio comercial ecuatoriano, captando el 56% de las exportaciones totales de mora, seguido por España con el 20% (CICO, 2009).

Dentro de este trabajo, se ha considerado identificar y aislar los genes que codifican para las Antocianinas, en vista de su gran importancia en la dieta nutricional y los aportes que brinda para el ser humano.

Para lograr cuantificar las Antocianinas, las técnicas moleculares y el avance en la Biotecnología ha permitido el desarrollo de diversos métodos alternativos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos rápidos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleicos, tienen la potencialidad de ser muy específicos. Tal es el caso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la técnica PCR-TR (PCR en Tiempo Real), ambas tecnologías moleculares basadas en la amplificación in vitro del ADN; esta última tiene la ventaja de que lleva a cabo simultáneamente los procesos de amplificación y detección en el mismo vial y que determina la cantidad de ADN sintetizado en cada momento de la reacción.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estandarizar un protocolo para el aislamiento y cuantificación de los genes para la expresión de antocianinas en tres variedades o ecotipos pertenecientes al género rubus colectadas en la provincia de

Tungurahua.

4.2 Objetivos Especificos

- 1 Adquirir materiales y reactivos para los análisis. Capacitación.
- 2 Calibrar los equipos del Laboratorio de Biología Molecular del CIVABI de la UPS- Sede El Girón.
- 3 Estandarizar un Protocolo para el aislamiento de genes de Antocianinas.
- 4 Establecer un Protocolo para la cuantificación de Antocianinas

5. ESTADO DEL ARTE

La Biología Molecular y sus aplicaciones en la forma de Biotecnología a pesar de llevar sólo 25 años de desarrollo, ya ha tenido un inmenso impacto en grandes áreas de la economía mundial y han generado evaluaciones, nuevos productos y servicios que se transan anualmente en miles y millones de dólares.

Los nuevos avances en biología molecular y el desarrollo de la tecnología robótica y secuenciación genómica y proteica han permitido el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas altamente específicas y de gran rendimiento. La genómica y proteómica contribuyen a la identificación de biomarcadores y la biotecnología aporta métodos para producir reactivos de alta pureza.

La identificación de genes codificantes de antígenos específicos, su clonación y producción recombinante y la producción de anticuerpos monoclonales, fragmentos de éstos y anticuerpos de una sola cadena han hecho posible el desarrollo de nuevas técnicas inmunológicas más seguras y de sensibilidad y especificidad elevadas. Para la detección de material genético se han desarrollado nuevas medidas metodológicas basadas en la hibridación y amplificación (PCR y PCR en tiempo real) en formatos multiplex y en microarreglos y para su detección se han diseñado moléculas reporteras que permiten su cuantificación. Aunque estos métodos requieren instrumentación compleja, puede ya anticiparse que pronto serán accesibles para su aplicación en salud pública.

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos.

Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real.

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia, de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes a la hora de realizar una PCR en Tiempo Real, es la calidad del material de partida. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental.

Aunque en los últimos años se han hecho grandes progresos en la simplificación de la extracción y purificación de los ácidos nucleicos bacterianos y virales de muestras clínicas, todavía no se ha encontrado un método automático universal que se pueda utilizar con cualquier tipo de muestra.

6. METODOLOGÍA

Se recolectarán muestras vegetales de rubus de la Provincia de Tungurahua, estos son varios ecotipos o variedades de los cuales se mantendrá una colección in vivo e in vitro.

De la colección in vivo, durante la etapa juvenil de las plantas de rubus se obtiene el RNA total del fruto y hojas con el protocolo de extracción del Kit de ROCHE y por medio de la transcripción reversa se sintetiza cDNA usando el kit de Transcriptor FirstStrand cDNA Synthesis de ROCHE. A partir de eso se podrá estudiar la expresión génica que codifica para las antocianinas.

La reacción de PCR se lleva a cabo en un volumen final de 20 µl, en los capilares específicos para el LightCycler 2.0 se emplean las muestras de cDNA, agua MQ (Sigma); Buffer de Reacción 1 X, dNTP's 0.2 mM, primers específicos para las secuencias codificantes para las antocianinas y 2.5 U de TaqADN polimerasa, las condiciones en el termociclador son: temperatura inicial de desnaturalización 94°C por dos minutos seguido de 35 ciclos con desnaturalización 94°C por un minuto, alineamiento 52°C, dos minutos de extensión a 72°C y finalmente una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Los resultados de la amplificación se comparan con un control positivo representado por un estándar o concentrado cuantificado anteriormente, que se debe analizar previamente con un HPLC en su parte química y se tiene también un control negativo en el cual el ADN de la muestra es reemplazado por 5 µl de agua estéril. La técnica de PCR en tiempo real se llevará a cabo probando los protocolos e insertos propuestos por la casa comercial Roche en vista que es el proveedor principal por la marca del equipo, el cual consiste en 47 ciclos compuestos por tres pasos, desnaturalización (95 °C por 2 minutos), anillamiento (40 °C por 30 segundos) y amplificación (72 °C por 35 segundos) en el equipo LightCycler Instrument (Roche Diagnostics, Germany), para estandarizar el Protocolo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Almeida, J. y Contreras, I. s.f. Propagación in vitro de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) a partir de miniestacas. Universidad de los Andes, Mérida y Venezuela. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Laboratorio de cultivos in vitro y Centro de ingeniería genética. Publicado en *Ecofisiología y Fisiología vegetal*. 162p.

Azadi, P. Khosh-Khui, M. Beyramizadeh, E. y Bagheri, H. 2007. Optimization of factors affecting in vitro proliferation and rooting of *Rosa hybrida* L. cv. Rafaela. *International Journal of Agricultural Research*, 2: 626-631.

Boss, P.K., C Davies, Robinson, S.P. (1996). Analysis of expression of anthocyanin pathway genes and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol.* 130:729-739.

Castro, D. y Gaviria, G. 1995. Propagación in vitro de especies del género *Rubus*. *Investigaciones Universidad Católica de Oriente, Antioquia (Colombia)*, pp. 3-9

Centro Agrícola de Quito (CAQ). 1992. Manual técnico del cultivo de la mora de castilla. Convenio C.A.F. Quito-Ecuador. 3-11pp.

Downey, M. JS, Harvey and Robinson, S.P. (2003). Synthesis of flavonols and expression of flavonol

Franco, G. y Giraldo, M. 1999. El cultivo de mora (en línea). Proyecto de transferencia de tecnología sobre el cultivo de mora - PRONATTA. CORPOICA - Colombia. Consultado el 16 ago. 2009. Disponible como: [Cultivo%20de%20la%20mora.pdf](#)

Henríquez, E. 2004. Evaluación de tres factores de enraizamiento en estacas de morera (*Morus alba*). Tesis. Ingeniero Agrónomo. Santiago - Chile. Facultad de Ciencias Agrónomas. Escuela de Agronomía. Universidad de Chile.

Hernández, C. Lopera, M. Mora, B. y Cárdenas, J. 1999. Desarrollo de un protocolo de propagación masiva de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) mediante la utilización del cultivo de tejidos in vitro. *Actual Biol* 21(70):3-12

Jaakola, L., Maatta, K., Pirttila, A.M., Torronen, R., Karenlampi, S., Hohtola, A. (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation and anthocyanin, proanthocyanidin production in plant cell-based bioprocessing: Anthocyanin as a case study. *Journal of Plant Physiol.* 111:1059-1066.

Jaakola, L., Maatta, K., Pirttila, A.M., Torronen, R., Karenlampi, S., Hohtola, A. (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation and anthocyanin, proanthocyanidin and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol.* 130:729-739.

Kong, J. M., Chiam, L. S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, C. (2003). Analysis and biological activitiesL.).Grape Wine Res. 9:110-121.

López, G., Gómez, J., Aguilar, J.(2011). Aislamiento de los genes de la Ruta Biosintética de Antocianinas en Jamaica (Hibiscussabdariffa L). Revista Fuente Año 3 No. 8 Julio - Septiembre 2011.

Marulanda, M. Carvajalino, M. y Vento, H. 2000. Establecimiento y multiplicación in vitro de plantas seleccionadas de RubusglaucusBenth para el departamento de Risaralda (Colombia). Actual Biol 22 (73): 121-129p.

Murashige, T. 1974. Plant Propagation Throught tissue culture. Ann. Rev. Plant. Phisiology. 25: 136-137.

Pierik, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi ¿ Prensa. Madrid ¿ España. 319 p.

Ramírez, C. Carrizosa, M. Rivera, D. y Linares, E. 1998. Conservación del germoplasma de moras silvestres (Rubus spp.) de la cuenca del río del Palmar municipio de Ubaque (Cundinamarca, Colombia). II: Conservación y manejo ex situ. PlantGeneticResourcesNewsletter 115:13-22.

Roca, W. y Mroginski, L.1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro, in Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura. Cali, Colombia. 19-40 p.
synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (Vitisvinifera

Vaca, I. 2012. Regeneración de plantas completas de Rubusglaucus(Benth), mediante el uso de reguladores de crecimiento. Tesis. Master en Biotecnología Agrícola. Guayaquil- Ecuador. Facultad de ingeniería mecánica y ciencias de la producción. Escuela superior politécnica del litoral.

Zhang, W., Franco, C., Curtin, C. and Conn, S. 2004.To stretch the boundary of secondary metabolite

8. RESULTADOS ESPERADOS

El primer resultado esperado es el adiestramiento y la capacitación necesaria para poner en práctica nuestra experiencia y conocimientos en el desarrollo de tecnologías modernas para la investigación científica que no han sido antes desarrolladas dentro del Laboratorio de Biología Molecular del CIVABI en la Universidad Politécnica Salesiana.

Posteriormente, se aislará y cuantificará genes que codifican para la expresión de Antocianinas en algunas variedades o ecotipos del género rubus como parte de un Trabajo de Investigación completo y complejo que inmiscuye varias áreas de la Biotecnología.

Con respecto al uso de la PCR-TR para la detección de genes, se definirá si las ventajas de la técnica, radica en la sensibilidad, especificidad y capacidad para procesar grandes cantidades de muestras en poco tiempo.

Los productos del Proyecto, es decir los análisis podrán ser observados, después de cada corrida en el termociclador se realizaran varias pruebas para corroborar los datos y así tener una lectura correcta, finalmente el Producto final será un Artículo Científico reportando los datos.

9. TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA Y/O SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN

Para la transferencia de Tecnología y dar a conocer los Resultados, se pretende escribir un Artículo científico para ser publicado en la Revista y periódico de la Universidad, entregar un soporte impreso y digital para la página web y repositorios de la Universidad y si es posible la participación en el evento de divulgación científica, Las Jornadas de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana.

10. IMPACTOS DEL PROYECTO

Académico - Científico:

En general, las Facultades de Educación, las Universidades pedagógicas y otras instituciones no incluyen entre sus cuadros académicos a un número significativo de investigadores científicos.

Es difícil entonces que los profesores de ciencias tengan una vivencia real de lo que significa hacer ciencia, una vivencia que puedan transmitir a sus alumnos.

Por lo que incentivos como estos, son muy importante para generar nuevas ideas, proyectos y promover la conciencia social en investigación científica y tecnológica.

Es seguro predecir que el ritmo del avance científico-tecnológico con estos proyectos en nuestra Universidad se va a incrementar en esta década. Otro fenómeno importante tiene que ver con el acortamiento del periodo que transcurre entre la generación de los conocimientos científicos y el momento que esas aplicaciones llegan al ¿público¿ mundial como nuevos productos o servicios. En los países desarrollados, las empresas y las universidades e institutos de investigación han forjado bien lubricadas alianzas (Bioclusters) y acuerdos que muy eficientemente y con gran rapidez traducen los nuevos conocimientos en aplicaciones y mejoramientos de procesos y productos que llegan al mercado con sólo meses de demora.

Esto es lo que debemos y vamos a copiar adecuadamente (Benchmarking) de los países industrializados y ponerlo en práctica en nuestro país y ahora.

Tecnológico - Ambiental:

Con la aplicación de este Proyecto y otros más, está claro entonces que en los próximos años tendremos un avance científico cada vez más veloz y un acelerado desarrollo tecnológico y al mismo tiempo habrán grandes desafíos para enfrentar, mediante las herramientas de la ciencia y tecnología, la problemática del desarrollo sustentable. Es decir que el desarrollo en investigación, ciencia y tecnología tiene que ir de la mano para poder conseguir soluciones a problemas medio ambientales en el menor tiempo posible y aplicar resultados a mejorar el estilo de vida de las personas, como es el caso de este Proyecto con el trabajo en cultivo in vitro, se genera mayor producción de alimentos en poco tiempo y la evaluación y mejoramiento genético puede brindar más alimento con más y mejores nutrientes para a una población.

11. INFORMACIÓN DE COFINANCIADORES (en caso de que existieran)

