



Estandarización de RT-PCR durante la expresión diferencial de genes en el proceso de hidratación-deshidratación de *Ferocactus peninsulæ* y *Ferocactus recurvus*

Monsalvo Reyes Alejandro Cruz, Ortiz-Sánchez José Roberto*, Martínez-García Martha, Salazar Rojas Víctor Manuel, Campos Contreras Jorge Eduardo

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Unidad de Biología y Prototipos. Laboratorio de Bioquímica Molecular. Av de los Barrios No1. Los Reyes Iztacala. Tlalnepantla. Edo. de Méx. C.P. 54090.

*Autor para correspondencia: r.ortz97@gmail.com

Recibido

21/agosto/2019

Aceptado

28/octubre/2019

Palabras clave:

Ferocactus, RT-PCR, Expresión diferencial.

Keywords:

Ferocactus, RT-PCR, Differential expression.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue estandarizar la técnica de RT-PCR para la expresión diferencial de genes durante la germinación de *F. peninsulæ* y *F. recurvus* con tiempos de hidratación-deshidratación. Se empleó cDNA obtenido previamente a distintos tiempos de germinación con un tratamiento de hidratación y deshidratación. Previo a la estandarización, se diseñaron los iniciadores a utilizar por medio del programa primer3 para posteriormente evaluar su calidad junto con la de cDNA, la RT-PCR se llevó a cabo con kits comerciales. Se amplificaron regiones de los genes CASP, ULP, SEEP, LEAP, FEER, TRXH, junto con ACTINA para cactáceas como testigo. Los resultados de la RT-PCR determinaron en relación a la expresión de actina y la técnica fue capaz de reconocer diferencias de expresión entre cada tiempo gen y especie.

ABSTRACT

The objective of this study was to standardize the RT-PCR technique for differential gene expression during germination of *F. peninsulæ* and *F. recurvus* with hydration dehydration times. CDNA previously obtained at different germination times was used with a hydration and dehydration treatment. Prior to standardization, the first ones to be used were designed through the primer program to subsequently evaluate their quality along with that of the cDNA. The RT-PCR was carried out with commercial kits. Regions of the CASP, ULP, SEEP, LEAP, FEER, TRXH genes were amplified, along with ACTINA for cacti as control. The results of the RT-PCR were determined in relation to actin expression and the technique was able to recognize differences in expression among each time, gene and species.

Introducción

Las cactáceas son una familia de plantas con flores que presentan un amplia variedad y distribución en México, teniendo la región de Tehuacán-Cuicatlán en Puebla y Oaxaca como uno de los principales puntos de distribución, albergando por lo menos a 81 especies, de las cuales el 25% son endémicas de la zona y muchas de ellas están amenazadas debido a que son extraídas ilegalmente para ser comercializados (Semarnat, 2016). Éstas al ser plantas angiospermas presentan formación y dispersión de semillas como eventos fundamentales de su ciclo de vida, con la función de multiplicar y perpetuar la especie; por lo tanto, es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores (Doria, 2010) y con suma importancia ecológica al intervenir en gran parte del mantenimiento de la diversidad genética de las especies (Dubrovsky, 1998).

La semilla es una unidad reproductiva compleja, que en especies de zonas áridas ha desarrollado estrategias para germinar con poca humedad disponible y prolongadas sequías; al ser el agua un factor limitante en estos ambientes, juega un papel clave en la germinación de cactáceas en zonas áridas (Evenari, 1985), por lo que es un proceso de transición arriesgada para la semilla, sobre todo al no tener periodos estables de humedad (Cervantes y Martínez, 2000). Se ha reportado que semillas de algunas cactáceas pertenecientes al género *Ferocactus* responden a eventos de humedad discontinuos (“memoria de hidratación”) como una forma de adaptación, debido que en algunas especies se acorta el tiempo de germinación después de tratamientos de deshidratación comparado con tratamientos de humedad constante (Dubrovsky, 1996; Contreras et al., 2015; Contreras et al., 2016; Lima y Meiado, 2018; Ren y Tao, 2003; Ruttanaruangboworn et al., 2017; Santini et al., 2017; Yan, 2015).

Al representar esta importancia la memoria hidratación en un trabajo previo se buscó la descripción de eventos a nivel molecular que mejoran la germinación después de ciclos Hidratación-Deshidratación (López-Urrutia et al., 2014), dilucidando la posible participación algunos genes, como LEA1_ORYSI cuya función radica en la embriogénesis tardía y expresarse en momentos de estrés participando durante el proceso conocido como “priming” (Fercha et al., 2014), encontrándose presente el gen incluso en *Escherichia coli* en momentos de estrés hídrico (Rakhra et al., 2017) ; SSG2 AVESA 12S encargado del almacenamiento de nutrientes en la semilla; TRX1 evitando la oxidación, involucrándose en múltiples procesos celulares reduciendo el estrés hídrico al

facilitar el agua en las vacuolas (Welsh et al., 2002), sin embargo es necesario realizar más trabajos en este ámbito al no ser estudiados todos los genes participantes como RHA2A_ARATH, SEEP RAPS, FDX 3, BLE3_ORYSI, para los cuales únicamente se tiene información de su posible funcionamiento, como es el caso de SEEP RAPS (Late seed maturation protein P8B6) gen involucrado en la sobrevivencia de la semilla manteniendo un nivel mínimo de hidratación evitando la desnaturalización de los componentes citoplasmáticos; RHA2A_ARATH (E3 ubiquitin-protein ligase RHA2A) que se involucra en la regulación positiva del Ácido Abscísico (ABA) y respondiendo a cambios salinos y estrés osmótico durante la germinación y desarrollo temprano de la plántula; BLE3_ORYSI (CASP-like protein BLE3) involucrado en la elongación celular. Debido a que la actividad de estos genes se relaciona con el estrés hídrico y elongación celular, su expresión puede verse afectada cuando la semilla se encuentra en hidratación discontinua, por lo tanto es posible evidenciar de igual manera la presencia de esta adaptación en otras especies del mismo género.

Se conocen diversas técnicas para trabajar a nivel molecular pero la PCR de transcripción inversa o RT-PCR, permite el uso de RNAm como molde logrando observar la expresión que se tiene en cada gen a distintos tiempos. El RNAm se transcribe de forma inversa en DNA complementario (cDNA) utilizando una transcriptasa inversa siendo así este el iniciador paso de RT-PCR, además la transcriptasa inversa también tiene una función de RNasa H, que degrada la porción de RNA inicial; la eficiencia de la reacción de la iniciadora cadena puede afectar al proceso de amplificación. A partir de aquí, se utiliza el procedimiento de PCR cuantitativo o en tiempo real para amplificar el cDNA (Cortázar y Silvia, 2004; Neidler, 2017). Por lo que, el presente trabajo tiene la finalidad de estandarizar la técnica de RT-PCR para la expresión diferencial de genes durante la germinación de *F. peninsulæ* y *F. recurvus* con ciclos de hidratación-deshidratación.

Metodología

Obtención de muestras biológicas

Se germinaron semillas de *F. peninsulæ* (Baja California, 2014) como grupo testigo y de *F. recurvus* (Puebla, 2018) como grupo experimental; con fotoperiodo controlado (12 horas día/noche) a una temperatura de 30°C y humedad relativa constante del 60-65%. Se extrajeron 50 semillas de su fruto, separándolas de la pulpa para realizarles un lavado, escuriéndolas con solución de NaClO (Hipoclorito de Sodio) al 30% por 15 minutos y

después se enjuagaron con agua destilada hasta retirar por completo la solución; por especie se utilizaron dos cajas (una correspondiente al tratamiento de hidratación-deshidratación (HD) y otra al testigo que permaneció en condiciones constantes de germinación) con 25 semillas cada una, la caja petri fue revestida previamente con una capa de papel filtro humedecido con 6ml de agua destilada, colocadas las semillas en las cajas, fueron selladas con plástico adherible para evitar la pérdida de humedad al interior.

El tratamiento fue sujeto a un solo ciclo de hidratación-deshidratación que consiste en incubarlo bajo condiciones de germinación durante 3 días, desecación (pérdida de condiciones de germinación) por 4 días en oscuridad total al envolver la caja petri con aluminio y finalmente se colocaron nuevamente en condiciones de germinación. Las semillas correspondientes al tratamiento control siempre mantuvieron las condiciones de germinación.

Las muestras se colocaron en tubos eppendorf y congeladas hasta la extracción de RNA mensajero de acuerdo con los siguientes tiempos:

- 0 días: Después de ser escarificadas las semillas (T₀)
- 4 días: Cuando el tratamiento se retiró de condiciones de germinación (T_D)
- 7 días: El tratamiento fue colocado en condiciones de germinación (T_H)
- Germinación: La radícula mide medio centímetro

Extracción de RNA mensajero y síntesis de cDNA

El RNA mensajero se extrajo de muestras de semillas de *F. recurvus* y *F. peninsulae* congeladas utilizando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus de la marca ZYMO RESEARCH con 50 -100 mg de semillas, siguiendo el protocolo del fabricante.

Finalizada la extracción se realizó la síntesis de cDNA con el kit Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase siguiendo el protocolo del fabricante, las muestras fueron congeladas a -70° C.

Diseño de Iniciadores

Se realizó el diseño de iniciadores para las secuencias de los genes LEA1_ORYSI (iniciador LEAP), BLE3_ORYSI (iniciador CASP), SSG2_AVESA 12S (iniciador SSG), RHA2A_ARATH (iniciador UPL), SEEP RAPSA (iniciador SEEP), FDX 3 (iniciador FEER) y TRX1 (iniciador TRXH) por medio del programa primer 3 en el cual se establecieron las siguientes condiciones para la

obtención de amplicones de 80-120 pb: T_m= 60°, GC%=50; se utilizó iniciador de Actina para cactáceas como testigo (housekeeping) en los ensayos.

PCR punto final

Se llevaron a cabo reacciones de PCR punto final para ensayar el diseño de los iniciadores y la calidad del cDNA obtenido en un trabajo previo, utilizando el Kit MyTaq DNA polymerase con un volumen final de 10ul, siendo aforado con agua grado molecular, la reacción se realizó con el siguiente programa en el termociclador T100 BIO-RAD: un minuto a 95°C, seguido de 40 ciclos compuestos por 30 segundos a 94°, 20 segundos a 57° y 30 segundos a 74°C, finalmente 8 minutos a 74°. Los amplicones obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% con regulador TBE 1X y teñido con Midori Green Advance en una cámara de electroforesis corriendo durante 20 minutos a 70V.

RTq-PCR

Obtenidos los geles de agarosa con los amplicones esperados se realizó RTq-PCR por triplicados utilizando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix con reacciones de 10µl con 0.5µl de cDNA por reacción, en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System con el siguiente programa: ciclo inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos. Los datos fueron analizados con el software LibRe PCR: Analysis of quantitative RT-PCR Data.

Resultados y discusión

Utilizando el cDNA obtenido de los transcritos, se comprobó la actividad correspondiente a los diferentes genes por la presencia del producto de PCR amplificado en geles de agarosa (figura 1-5); obteniendo amplicones de tamaño (120 pb), pureza y concentración requerido a los distintos tiempos evaluados: 0 días (T₀) 4 días (T_D) 7 días (T_H), tiempo de germinación HD (T_{gHD}) y tiempo de germinación grupo testigo (T_{gC}).

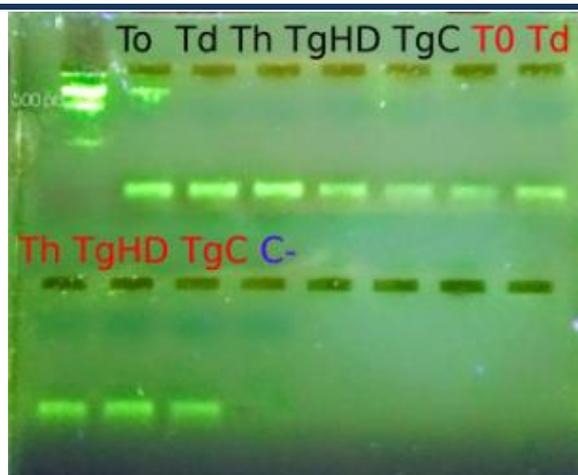


Figura 1. Productos de PCR correspondientes al iniciador SSG en distintos tiempos para ambas especies. *F. recurvus* en color negro, *F. peninsulae* color rojo y testigo negativo en azul.

El iniciador SSG presenta una expresión con menor variación entre tiempos y especies (figura 1), mientras que el iniciador de Actina (figura 2) para el caso de *F. recurvus* tiene una expresión disminuida en el tiempo de deshidratación (Td), esto no ocurre de igual manera con *F. peninsulae*, la cual únicamente para el To presenta nula expresión que posiblemente sea ocasionada por un error metodológico.

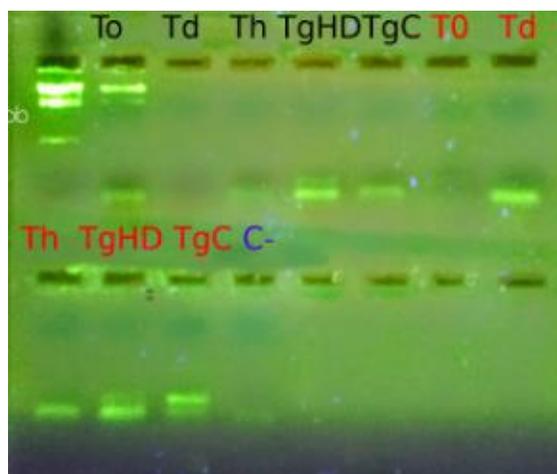


Figura 2. Productos de PCR correspondientes al iniciador Actina en distintos tiempos para ambas especies. *F. recurvus* en color negro, *F. peninsulae* color rojo y testigo negativo en azul.

El iniciador del gen LEAP (figura 3) presenta para ambas especies una disminución en la actividad durante el To, por lo que su actividad se ve referenciada a una etapa posterior cuando la semilla esta siendo hidratada.

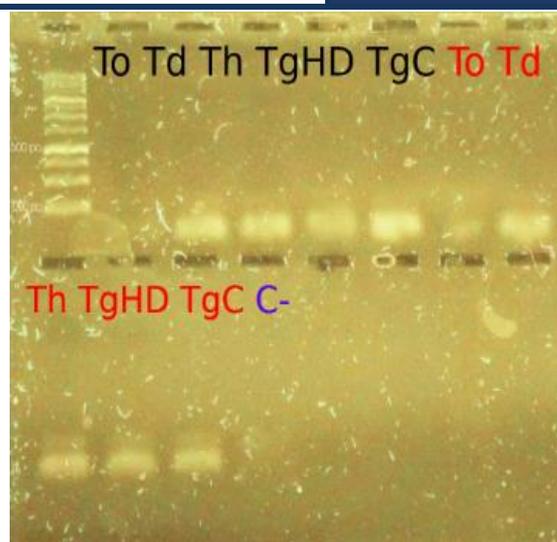


Figura 3. Productos de PCR correspondientes al iniciador LEAP en distintos tiempos para ambas especies. *F. recurvus* en color negro, *F. peninsulae* color rojo y testigo negativo en azul.

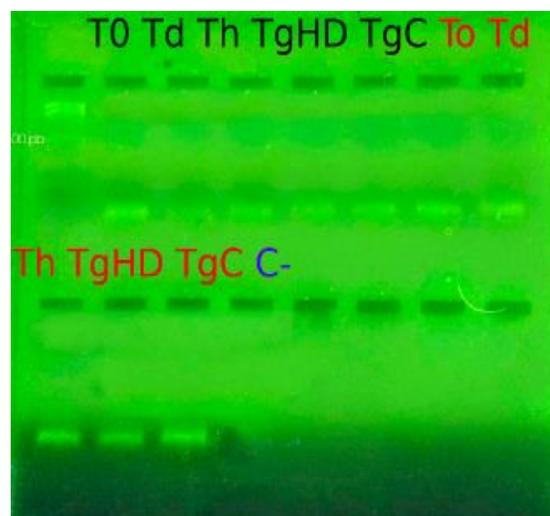


Figura 4. Productos de PCR correspondientes al iniciador UPL en distintos tiempos para ambas especies. *F. recurvus* en color negro, *F. peninsulae* color rojo y testigo negativo en azul.

Los iniciadores UPL (figura 4) y CASP (figura 5) presentan una expresión similar en los distintos tiempos evaluados en el presente trabajo, sin embargo, para el iniciador CASP se tiene una mayor cantidad de transcritos en *F. recurvus* que en *F. peninsulae*; mientras que el iniciador UPL presenta una expresión inversa para las especies.

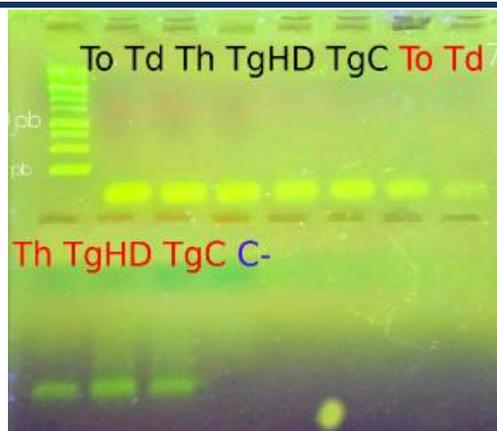


Figura 5. Productos de PCR correspondientes al iniciador CASP en distintos tiempos para ambas especies. *F. recurvus* en color negro, *F. peninsulae* color rojo y testigo negativo en azul.

Con la técnica de RT-PCR se observó contaminación continua en los iniciador LEAP y SSG a pesar del reemplazo de reactivos, por lo que se realizó un ensayo sin cDNA mostrando que existe contaminación en los iniciadores (figura 6).

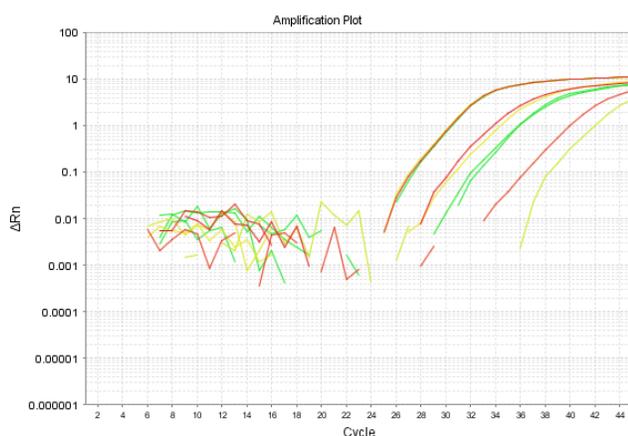


Figura 6. Contaminación de los iniciador LEAP y SSG detectada por el equipo de RT-PCR

Mediante mapas de expresión (Heat maps) se muestra que las condiciones de estandarización fueron óptimas para la amplificación de cDNA por medio de RT-PCR (figura 7), mostrando a la vez la relación entre iniciadores y tiempos. Por otro lado al representarlos con barras (figura 8) se presenta un comportamiento similar al obtenido en el mapa de expresión.

Los resultados del presente estudio indican que la reacción de RT-PCR se efectuó dentro de los parámetros aceptables establecidos por Cortázar y Silvia en 2004 para este tipo de metodología. Aunque en este estudio no se determinaron las causas de las diferencias en la

expresión lo cual es posible que se deba a las necesidades biológicas o a las condiciones ambientales distintas que presenta cada especie empleada en el trabajo, mediante mapas de expresión se observó la diferencia en el nivel de expresión de cada uno de los iniciadores, TXNH y SEEP fueron los que presentaron una mayor diferenciación con respecto a los demás para *F. peninsulae* y *F. recurvus* respectivamente, por lo tanto es necesario un trabajo más profundo para dilucidar la presencia de memoria de hidratación en *F. recurvus*.

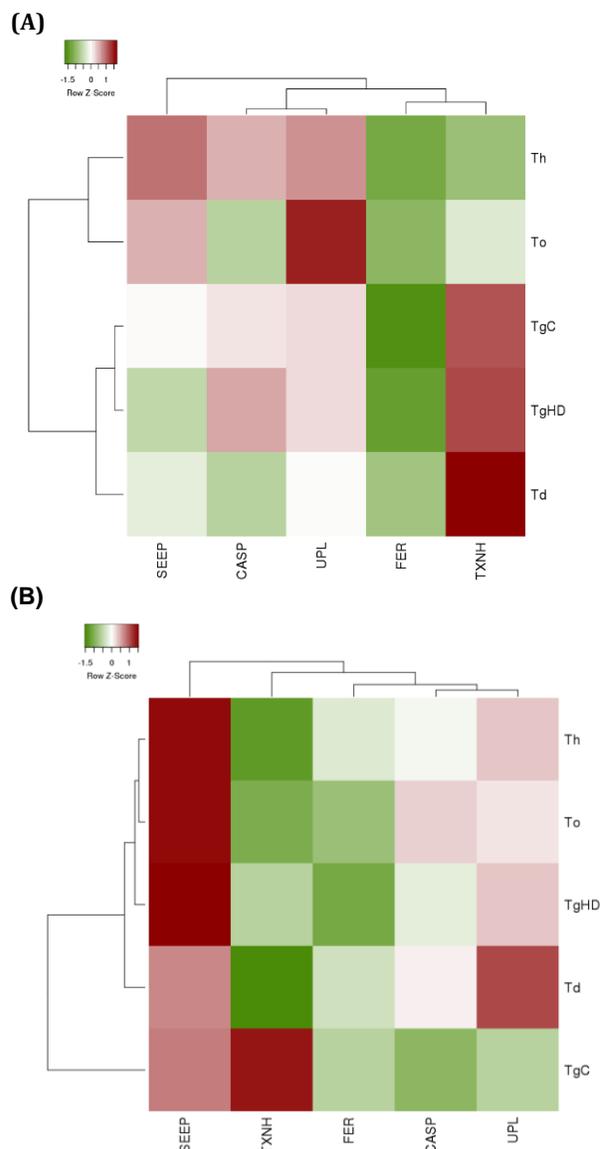
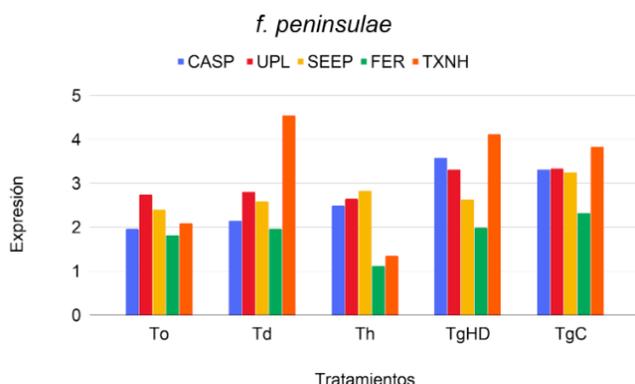


Figura 7. Mapas de expresión. Expresión de los iniciadores presentes en la respuesta de memoria de hidratación con respecto a su expresión a Actina para cactáceas en **A.** *F. peninsulae* y **B.** *F. recurvus*.

(A)



(B)

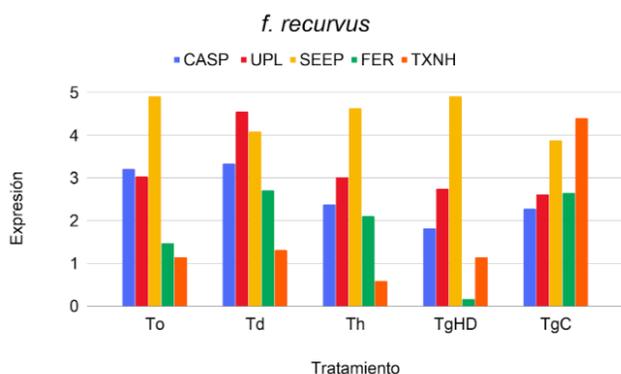


Figura 8. Expresión respecto al iniciador de actina, en azul se observa el iniciador CASP, en rojo UPL, en amarillo SEEP, en verde FER y en naranja TXNH para **A.** *f. peninsulæ* y **B.** *F. recurvus*.

El uso de esta técnica permite realizar estudios de expresión diferencial en el género *Ferocactus* para conocer los genes involucrados en las diferentes etapas cuando se presenta memoria de hidratación, al lograrse la normalización de técnicas tales como la amplificación de los transcritos en semillas al tener un ciclo de HD; esto a pesar de que en la actualidad esta técnica es utilizada principalmente para el diagnóstico y detección de virus, así como de levaduras (Bowers et al., 2008; Castro et al 2012; Chiok et al. 2011; González, 2016).

Esta técnica tiene la ventaja de permitir tipificar el desarrollo de germinación con una alta sensibilidad y especificidad, de acuerdo a Sánchez et al., 2000. En el trabajo realizado no se hicieron cálculos de sensibilidad ni especificidad de la prueba con los diferentes genes, lo cual fue una limitante para la estandarización. Los resultados de este estudio, hacen evidente la necesidad de realizar otros experimentos que incluyan un mayor

número de muestras distribuidos por días y no por tiempo, así como muestras completas del grupo testigo.

Conclusiones

La técnica de RT-PCR validada en el presente trabajo, posee las condiciones óptimas para el buen funcionamiento de los iniciadores evaluados para *F. peninsulæ* y *F. recurvus*.

Debe incorporarse una mayor cantidad de muestras debido al contener escasas muestras del grupo testigo el análisis final puede verse sesgado al interpretar el comportamiento natural del gen; así como contar el tiempo en días, para manejar de esta forma los datos con una veracidad mayor y puedan ser interpretados con una mayor facilidad.

Referencias

- Bowers R. M., LaPatra S. E., Dhar A.K., (2008). Detection and quantification of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *J Virol Methods*, 147:226-234.
- Castro G., Manchego A., Chiok K. L., Sandoval N., More J., Ramírez M., Rivera, H. (2012). Estandarización de la técnica RT-PCR tiempo real para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 4:491-498.
- Cervantes L., Martínez P. (2000). Ensayos de germinación en semillas de *Fouquieria purpusii* Brandege. *Revista Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 45:52-61.
- Chiok K. L., Manchego A., Rivera H., Sandoval Ch.N., Ramírez, M. (2011). Estandarización y validación de la técnica RT-PCR cualitativa en tiempo real para la detección del virus de la peste porcina clásica. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, RIVEP*, 22;377-387.
- Contreras Q. M., Pando M. M., Jurado E. (2015). Seed germination of plant species from semiarid zones after hydration-dehydration treatments. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 1:41-50.
- Contreras-Quiroz M., Pando-Moreno M., Jurado E., Flores J., Bauk K., Gurvich D. E., (2016). Is seed hydration memory dependent on climate? Testing this hypothesis with Mexican and Argentinian cacti species. *Journal of Arid Environments*, 130:94-97.
- Cortázar M. A., Silvia R. E., P. (2004). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Page. 17-27.

- Doria J., (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, 31:74-85.
- Dubrovsky J. G., (1996). Seed hydration memory in Sonoran desert cacti and its ecological implication. *American Journal of Botany.*, 83:624-632.
- Dubrovsky J. G., (1998). Discontinuous hydration as a facultative requirement for seed germination in two cactus species of the Sonoran Desert. *Journal of the Torrey Botanical Society.*, 25: 33-39.
- Evenari M., (1985). Adaptations of plants and animals to the desert environment. In M. Evenari, I. Noy-Meir & D. W. Goodall (Eds.), *Ecosystems of the world: Hot deserts and arid shrublands*. Amsterdam. p. 79-92.
- Fercha A., Capriotti A. L., Caruso G., Cavaliere C., Samperi R., Stampachiachiere S., Laganà A. (2014). Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress. *Journal of proteomics.*, 108:238-257.
- González Ll M. J. (2016). Estandarización de técnicas moleculares (RT-PCR E IC-RT-PCR) para el diagnóstico de infección por los principales virus que atacan a las uvas pisqueras del Perú. Tesis de Maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia
- Lima A. T., Meiado M. V. (2018). Effect of hydration and dehydration cycles on *Mimosa tenuiflora* seeds during germination and initial development. *South African Journal of Botany*, 116:164-167.
- López-Urrutia E., Martínez-García M., Monsalvo-Reyes A., Salazar-Rojas V. M., Montoya R., Campos, J. E. (2014). Differential RNA-and protein-expression profiles of cactus seeds capable of hydration memory. *Seed Science Research.*, 2:91-99.
- Neidler S. (2017). What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR?. ENZO. Recuperado el 22 de Abril del 2019 de: <http://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr/>
- Rakhra G., Kaur T., Vyas D., Sharma A. D., Singh, J., Ram, G. (2017). Molecular cloning, characterization, heterologous expression and in-silico analysis of disordered boiling soluble stress-responsive wBsSRP protein from drought tolerant wheat cv. PBW 175. *Plant physiology and biochemistry.*, 112:29-44.
- Ren J., Tao L. (2003). Effect of hydration-dehydration cycles on germination of seven *Calligonum* species. *Journal of Arid Environments.*, 55:111-122.
- Ruttanaruangboworn A., Chanprasert W., Tobunluepop P., Unwin, D. (2017). Effect of seed priming with different concentrations of potassium nitrate on the pattern of seed imbibition and germination of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of integrative agriculture.*, 16:605-613.
- Sánchez F. J. A., Cruz J. E. A., Gutiérrez C. C., Olvera D. P. R., Zavala M. E. M. (2000). Incorporación de la técnica de RT-PCR para la detección del virus sincitial respiratorio. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.*, 13:145-152.
- Santini B. A., Rojas-Aréchiga M., Morales E. G. (2017). Priming effect on seed germination: Is it always positive for cacti species? *Journal of Arid Environments.*, 147:155-158.
- Semarnat (2016). Cactáceas, riqueza natural de México. Recuperado el 17 de Agosto del 2019 de: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/cactaceas-riqueza-natural-de-mexico>
- Welsh S. J., Bellamy W. T., Briehl M. M., Powis, G. (2002). The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 α protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer research.*, 17:5089-5095.
- Yan M. (2015). Seed priming stimulate germination and early seedling growth of Chinese cabbage under drought stress. *South African Journal of Botany.*, 99:88-92.