



Obtención de un ADN complementario que codifica una fructano 1-exohidrolasa en yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson

Obtaining a complementary DNA encoding a fructan 1-exohydrolase in yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson

Patricia Moreno Díaz^{1,*}; Mariella H. Uchima Flores¹; Rosa Cabrera Pintado²; Roger Torres Aliaga²

¹ Departamento Académico de Biología - Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Molina s/n La Molina Lima-Perú. Apartado 12-056 La Molina.

² Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología – Instituto Nacional de Innovación Agraria. Av. La Molina 1981. La Molina Lima-Perú.

Received February 27, 2019. Accepted June 12, 2019.

Resumen

El yacón es una planta asterácea originaria de los Andes que en los últimos años ha recibido especial atención por sus propiedades nutricionales y farmacológicas. Sus raíces almacenan fructanos de tipo inulina con bajo grado de polimerización, también llamados fructooligosacáridos (FOS). La pérdida de los FOS en las estructuras reservantes con la consecuente disminución de sus propiedades funcionales están relacionadas directamente con la actividad de la enzima fructanoexohidrolasa (FEH). Las plantas de yacón fueron obtenidas de la estación experimental "Baños del Inca" perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Examinando cuatro métodos de extracción de RNA total a partir de las raíces reservantes, se obtuvo un mejor rendimiento y calidad con el método CTAB modificado. El juego de cebadores diseñados y la técnica de RT-PCR generaron fragmentos traslapados del gen *feh*, así como el extremo 3' del ARNm. El ensamblaje de los fragmentos permitió determinar cerca del 80 por ciento de la secuencia del gen y la región no codificante del extremo 3'. La construcción del árbol filogenético mostró un alto grado de identidad de la secuencia con las 1-FEHs de: *C. intybus* (88,5 %), *H. tuberosus* (88,2 %), *V. herbacea* (86,5 %) y *A. lappa* (85 %).

Palabras clave: Yacón; CTAB; RT-PCR; 1-FEH.

Abstract

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is an asteraceous plant native to the Andes that in recent years has received special attention for its nutritional and pharmacological properties. Its roots store fructans of inulin type with low degree of polymerization, also called fructooligosaccharides (FOS). The loss of FOS in the yacón reserve structures and the consequent decrease of its functional properties are directly related to the hydrolytic activity of the enzyme fructanexohydrolase (FEH). Yacon plants were obtained from the "Baños del Inca" experimental station, belonging to the National Institute of Agrarian Innovation (INIA). By examining four methods of extracting total RNA from the storage roots, better performance and quality were obtained with the modified CTAB method the designed primer sets and the RT-PCR technique generated overlapping fragments of the *feh* gene, as well as the 3'-end of the mRNA. The assembly of the fragments allowed to determine about 80 percent of the gene sequence and a 3'untranslated region. Construction of the phylogenetic showed a high degree of identity of the sequence with the 1-FEHs of: *C. intybus* (88.5 %), *H. tuberosus* (88.2 %), *V. herbacea* (86.5 %) and *A. lappa* (85 %).

Keywords: Yacon, CTAB, RT-PCR, 1-FEH.

1. Introducción

El yacón *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson, es una planta de origen

andino que contiene altos niveles de fructanos con bajo grado de polimerización (Ohyama et al., 1990; Goto et al., 1995; Grau

How to cite this article:

Moreno, P.; Uchima, M.; Cabrera, R.; Torres, R. 2019. Obtención de un ADN complementario que codifica una fructano 1-exohidrolasa en yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. Scientia Agropecuaria 10(2): 283 – 291.

* Corresponding author
E-mail: pamodisa@lamolina.edu.pe (P. Moreno).

y Rea, 1997; Seminario *et al.*, 2003) también llamados fructooligosacáridos (FOS). Estos representan el 52 a 66% del total de carbohidratos en base seca mientras que los azúcares simples como glucosa, fructosa y sacarosa se encuentran en baja proporción (Ohyama *et al.*, 1990; Hermann *et al.*, 1998; Lachman *et al.*, 2004). Los fructooligosacáridos del yacón han sido identificados como fructanos del tipo inulina basado en el trisacárido 1-cestosa con uniones β -2,1 entre los residuos de fructosa, una sacarosa terminal (Ohyama *et al.*, 1990; Itaya *et al.*, 2002) y un GP promedio de 3.6-4.3 (Hermann *et al.*, 1998). La proporción relativa de FOS y monosacáridos fluctúan significativamente durante el ciclo de crecimiento y después de la cosecha, lo cual se evidencia en los diferentes datos publicados (Ohyama *et al.*, 1990; Fukai *et al.*, 1993; Fukai *et al.*, 1997; Hermann, *et al.*, 1998; Itaya *et al.*, 2002). Los FOS han recibido últimamente mucha atención por su significancia en nutrición humana ya que son resistentes a la digestión, pero susceptibles a la fermentación de la microflora intestinal, lo que conduce al desarrollo de funciones colónicas favorables y la estimulación selectiva del crecimiento de bifidobacterias en el colon (Grau y Rea, 1997; Ritsema y Smeekens, 2003a; Pedreschi *et al.*, 2003). Los fructanos y los FOS son sintetizados a partir de la sacarosa por la acción de fructosiltransferasas. Para la síntesis de fructanos de tipo inulina dos transferasas son responsables: una sacarosa: sacarosa fructosiltransferasa (1-SST) que cataliza irreversiblemente la formación de 1-cestosa a partir de dos moléculas de sacarosa liberando una de glucosa, y una de fructano: fructano fructosiltransferasa (1-FFT), responsable por el elongamiento de la cadena de fructano, catalizando la transferencia reversible de residuos terminales de fructosa de una 1-cestosa proveniente de fructanos con grado de polimerización ≥ 3 , a una receptora (Hendry, 1993; Vijn y Smeekens, 1999; Ritsema y Smeekens, 2003; Ritsema y Smeekens, 2003a). La movilización de los FOS en las plantas que acumulan fructanos tipo inulina ocurre por la actividad de una fructano exohidrolasa (1-FEH, EC 3.2.1.153) que preferentemente hidroliza el enlace β 2,1 del residuo fructosil terminal del fructano (Van den Ende *et al.*, 2000; Verhaest *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2011; Ueno *et al.*, 2015; Van den Ende, 2018) esta enzima no actúa sobre el enlace glicosídico de la sacarosa (Van den Ende *et al.*, 2002; Verhaest *et al.*, 2007). El clonamiento de los genes de las FEHs de

diversas especies y los ensayos de expresión han posibilitado hasta el momento el conocimiento de la función de esta enzima en el metabolismo de los fructanos, logrando relacionarlas con estados fisiológicos característicos como la respuesta a la defoliación y a las bajas temperaturas, entre otras. (Van den Ende *et al.*, 2001; Lothier *et al.*, 2007; Portes *et al.*, 2008; Meguro-Maoka y Yoshida, 2016). A partir de estos trabajos se ha podido determinar asimismo la existencia de isoformas de la enzima expresadas bajo ciertas condiciones de crecimiento en la misma planta, así Van den Ende *et al.* (2001) aislaron las isoformas 1-FEHIIa y 1-FEH IIb en *C.intybus*; Ueno *et al.* (2015) las isoformas A1EH1 y A1EH2 en *Arctium lappa* L. y Ht1-FEH I y Ht1-FEH II de *Helianthus tuberosus* en el trabajo de Xu *et al.* (2015). La pérdida del contenido de fructanos de inulina en los órganos subterráneos de varias asteráceas está relacionada directamente con la expresión y actividad hidrolítica de la enzima fructano 1-exohidrolasa (Marx *et al.*, 1997; De Roover *et al.*, 1999; Van den Ende *et al.*, 2001; Itaya *et al.*, 2007; Jiao *et al.*, 2018) y como consecuencia la disminución de las propiedades funcionales de estos alimentos. Esta investigación se centró en obtener el ADN complementario con la información de la secuencia de nucleótidos del gen de la fructano 1-exohidrolasa (1-FEH) de yacón como un primer paso para estudios posteriores de la estructura del gen y función de la enzima.

2. Materiales y métodos

Material vegetal y Extracción de RNA total

Las accesiones (PER 018283, PER 018279) de yacón fueron obtenidas de la estación experimental agraria “Baños del Inca”, Cajamarca (Perú), perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). 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. Cuatro métodos de extracción: CTAB (Lodhi *et al.*, 1994) modificado, LiCl (Verwoerd *et al.*, 1989) TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, Ca) y RNeasy Mini-Kit (Qiagen); fueron utilizados y se optimizó el que mejor resultado proporcionó tanto en rendimiento como en calidad de

ARN total. Se cuantificó el producto de la extracción mediante el espectrofotómetro Epoch™ y se visualizó la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE 1X.

RT-PCR, clonado y secuenciamiento del gen putativo de la FEH

Se obtuvo un fragmento de 579 pb utilizando los cebadores P1/P7 (F1 y R1 para este estudio) tomados del trabajo de *Asega et al.* (2008) y a partir de éste se buscaron homologías en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se consideraron las secuencias: *Cichorium intybus* (AIP90173, CAC37923, AIP90174, AAP85536, CAA72062, CAC37922), *Arctium lappa* (BAL73222), *Vernonia herbacea* (CAJ77148), *Helianthus tuberosus* (AJW31156) para el diseño del cebador específico:

9B2F1 (5' GGCGGCGATCGGGACAACAAC3'), y los cebadores degenerados; 9B1F1 (5'GGGARAAYTTYTTGCCRCA3'), 9B1R1 (5'GYTTCATMCTCCAAGCACTCAT3'), 9B1R1 (5'gYTTCATMCTCCAAGCACTCAT3'), 9B2F1 (5' GGCGGCGATCGGGACAACAAC3'), 9B2R2 (5'CCGRAAHGWCTGAAGVCCVGGCCA3') los cuales fueron utilizados en la obtención de fragmentos del gen putativo de la FEH. A partir de la secuencia obtenida fue diseñado el cebador específico 9B5F1 (5' GGCGTGTGGCTATGGCGTCT3') que en combinación con el cebador dT-Adapt 5'GACTCGAGTCGACATCGA (T17)3', se obtuvo la región carboxi-terminal y la región no codificante 3' del gen putativo de la FEH. La obtención de los fragmentos del gen putativo de la FEH se realizó mediante RT-PCR, el cADN fue sintetizando utilizando 1 µg de ARN total, 40 pmol de dT-Adapt, 0,2 mM de dNTPs mix, 200 U de transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen, USA) y 1X de buffer de la transcriptasa en un volumen final de 20 µl. Para la PCR se utilizó 1 µl del ADNc, 10 pmol de cada cebador, 800 µM de dNTPs, 2mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq ADN polimerasa Kappa y 1X de buffer de la polimerasa en un volumen final de 20µl. Las condiciones de PCR comprendieron un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 45 segundos y 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C por 10

min. Para la obtención de la región carboxiterminal y región no codificante 3' solo varió la temperatura de hibridación (45 °C). Los productos PCR fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE 1X y teñidos con bromuro de etidio.

Para la purificación de los productos PCR se utilizó el kit DNA Clean&Concentrator D4014 (Zymo Research). Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, USA) de acuerdo a las condiciones del fabricante, el plásmido recombinante fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* (DH5α). Después del tamizado de colonias, al menos tres clones fueron secuenciados en ambos sentidos (Macrogen, Korea, USA).

Edición de secuencias y construcción del árbol filogenético

La secuencia ensamblada obtenida fue utilizada para buscar homologías en la base de datos (EMBL Nucleotide Sequence Database (European Molecular Biology Laboratory), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (*Altschul et al.*, 1990). El alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, se realizó mediante los algoritmos Clustal y Muscle respectivamente, del programa MEGA 7, considerando los parámetros predeterminados. Para el cálculo de las distancias de nucleótidos, así como de aminoácidos se consideró el método de la p-distancia, d: transiciones + transversiones y tasas uniformes (*Tamura et al.*, 2007). La construcción del árbol filogenético se realizó empleando el programa MEGA 7. La elección del modelo de evolución molecular (Hasegawa-Kishino-Yanomodel) 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 método de máxima probabilidad ML, y WAG como modelo de sustitución (*Whelan et al.*, 2001).

La validación del árbol filogenético se efectuó mediante el Método de remuestreo – Bootstrap (*Felsenstein*, 1981) con 2000 repeticiones.

Tabla 1
Resultados de cuantificación de ARN (ng/µL⁻¹) total. 1, 2 & 3 (repeticiones)

Accesión Protocolo	PER 018283			PER 018279		
	1	2	3	1	2	3
LiCl 0,1 M	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

3. Resultados y discusión

Extracción de RNA total

Los resultados de los protocolos utilizados en la extracción de ARN total se visualizan en la **Tabla 1** y la integridad del ARN observada en gel de agarosa al 1% se muestra en la **Figura 1**. 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. 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, sin embargo, su uso es limitado por el número de membranas de sílice que contiene cada Kit. Por el contrario, la extracción mediante CTAB admite cuantiosas extracciones y los resultados no difieren significativamente de los obtenidos por Mini Kit-Qiagen.

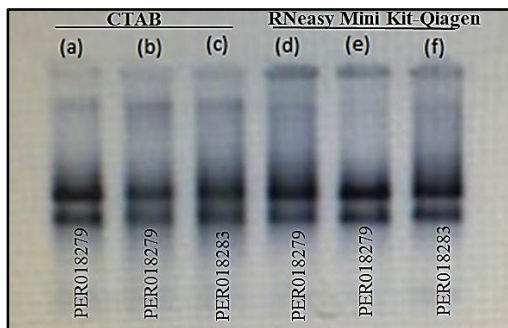


Figura 1. Extracción de ARN total mediante los protocolos CTAB [(a), (b), (c)] y RNeasy Mini Kit-Qiagen [(d), (e), (f)]. Acceso: PER018279 [(a), (b), (d), (e)], PER018283 [(c), (f)].

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 según **Tiwari *et al.* (2012)**, el método necesita de pequeñas modificaciones pues 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. El uso del LiCl en este método 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.*, 1963**). A pesar de esto, **Chan *et al.* (2004)** así como **Rubio y Zapata (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 contenidos en la muestra no se pudo evitar, aun utilizando los antioxidantes 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.

RT-PCR, clonado y secuenciamiento del gen putativo de la FEH

El primer amplicón obtenido, un fragmento de 579pb, se visualiza en la **Figura 2**, se le designó como 9B y fue utilizado como base para el diseño de los oligonucleótidos cebadores que permitieron la amplificación de los fragmentos siguientes (**Figura 3**).

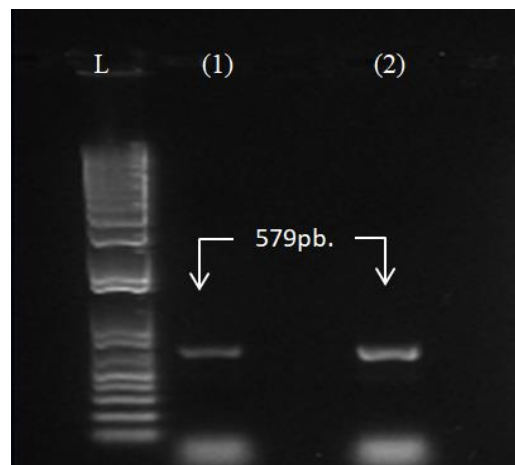


Figura 2. Productos PCR amplificados utilizando el juego de primers F1 y R1 para ambos carriles (1) y (2). Acciones: PER018279 y PER018283 para los carriles (1) y (2) respectivamente.

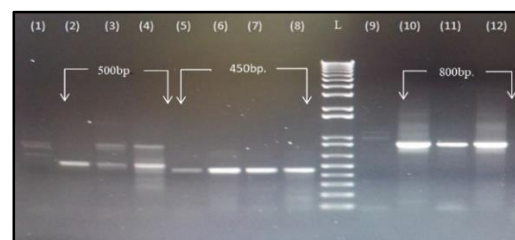


Figura 3. Productos PCR obtenidos con los juegos de primers:(9B2F1 & 9B2R1) carriles (1), (2), (3) y (4); (9B2F1 & 9B2R2) carriles (5), (6), (7) y (8); y (9B1F1&9B1R1) carriles (9), (10), (11) y (12).

La electroforesis mostró los resultados de la amplificación de fragmentos en el rango de tamaños esperados, 800 pb, 500 pb y 450 pb, en la purificación se obtuvo una adecuada concentración de los fragmentos de 800 y 500 pb. El secuenciamiento de estos productos y su ensamblaje permitió obtener un fragmento de 1550 nucleótidos correspondientes a 516 aminoácidos de la proteína. En estudios similares se halló la

estructura completa del ADNc del gen FEH (AM231149) de *Vernonia herbacea* con 2074 pb de tamaño, y una región codificante de 1,749 pb (Asega *et al.*, 2008); el ADNc (aleh1) de 2,063 pb con una región codificante de 1,746 pb (581 aa) en *Arctium lappa* L. (Ueno *et al.*, 2011); dos ADNc completos de *Helianthus tuberosus* L. (Ht1-FEH I y Ht1-FEH II), codificando proteínas de 560 y 581 aminoácidos, respectivamente (Luo *et al.*, 2018).

El empleo de la PCR anclada permitió obtener un producto amplificado para el extremo 3' (Figura 4). La región no codificante 3' del mRNA del gen putativo de la FEH del yacón, *Smallanthus sonchifolius*, tiene un tamaño de 292 nucleótidos entre el codón de terminación TAA y el inicio de la Poli A, es ligeramente más pequeña que la región no codificante del gen 1-feh-IIa (AJ295033.1) de *Cichorium intybus* con 305 nucleótidos y más grande que las regiones no codificantes de los genes 1-feh-IIb (AJ295034.1) de *Cichorium intybus* con 251 nucleótidos y 1-feh (AM231149.1) de *Vernonia herbacea* con 258.

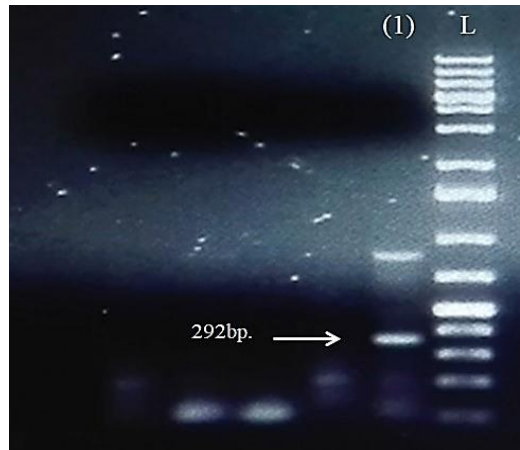


Figura 4. Productos de la PCR-anclada visualizados en gel de agarosa. El carril (1) corresponde al fragmento de tamaño 292bp de la región no codificante 3' del ARNm de la probable 1-FEH de yacón.

Secuencia ensamblada y árbol filogenético
La secuencia parcial de nucleótidos de la enzima 1-FEH (Figura 5) se ensambló manualmente, y el programa Transeq permitió su traducción (Figura 6).

```
>Yacon_9B
TTATACCAAGGAGTGTATCATTTCTTCTACCAATACAATCCATACGCCGCAACTTTCGGAACCATCGTGTGGGGCCACG
CCGTATCATAACGACCTGGTCAACTGGATCCATCTCGACCCGGCAATTTACCCGACCCAAGAAGCAGACATCAACAGCT
GCTGGTCCGGATCCGCCACCATCTCCCGGGAACATTTCCGGCCATGCTCTACACCGGCAGCGACTCAAACCTCCCGCC
AAGTCCAAGACCTCGCTGGCCGAAAAAACCTCTCCGACCTTCTCCCGGGAATGGGTCAAATACGCCGGAACCCCGA
TCATAACCCACCGGCGGGCGTCAAAGACGACTGCTTCCGCGACCCAGCACCGCCTGGCTCGGCCCGACGGCGTGT
GGCGGATCGTCTCGCGCGGATCGGGACAACAACGGCATGGCGTTTTATACAGAGCACCGATTGTTGTAAGTGGGA
CACGGTACGAACAGCCGCTTGGCTCGGGCGGATGCCACCGGAATTTGGGAGTGCCCGGAATTTTTCTGTGCCGTTGA
ACAGTACGAACCGGTTGGATACATCGCGGTATAGCGGAAATGTGATGCATGTGATGAAAGCAGGATTTGAAGGGCAT
GATTGGTACACAATCGGGACGTATAGTCTGATCGTGAGAATTTTTGCCGCAAAATGGGTTGAAATTAAGCGGAAGC
ACGTTGGATTGCGGTACGATTATGGGCAATTTATGCATCGAAATCGTTTTATGATGATTCAAGAACAGAAAGGGTT
TTGTGGGCGTGGGTTCCGGAACCTGATTCTCAAGAAGATGATATTGAAAAGGGTTGGGCTGGGCTTCAGTCAATTTCT
AGGCAATCTGATTGATGGAAGTGGGAAGCAGCTGATCCAATGGCCGGTGGAGGAGATAGAGTCACTACGTGGAAA
TGAAGTTAAGCTTCAAAAACAAGAACATCGACACCAAGCTTGTGTTGAAATTCAGGGCGTTACTGCTTCTCAGCGGA
TGTTACAATTTCTGTTCAAATTTGGAGGATTTGAAAGAGGCTGAGGTTTTGGATACGAGTCTTCGGTTGATCCGCAAGT
CTTTGTACCGAAAGGGGTGCATCTAGCAAGGGTGCCTTTGGCCCTTTGGCGTGTGGCTATGGCGTCTAAAGACTG
AAGGAACAACCGCAATCTTTAGGGTTTTCCAAAACCAAAATGGACGATACTCTGTGCTCATGTGTAGCGATCTT
AGCAGTCTACCGTTAGAAGTAACTCGACATCGACACCAAGCTTTGGCGGTTTGTGTTGAGTATAGATCTCGTCAAG
ATCTCACTGAGAACTTGATAGACACTCTATTATTGAGAGTTTCGGAGCAGGGGGAAAGACATGCACCACAAGTCTG
ATTTATCCTAAATTTCTACCTACGAAGATGCTCATCTTTTCGCATTTAAACAATGGGACTCAAAGTGTCAAAATTTCTC
AAATGAGTGCTTGAGATGAAAAATGCAGAATTTGTAATTGATCAGATCGTAAAAAGTGGCGCTTAAAAATGCTAGA
TGATCTGGATGTTTTAAAATAGATAAAGATTACTCTTGTAAAAAGGTTAAAGTTACTCTTGTAAAAAGGTTAAAGTA
GAAGAAAACATGGGAGACCGGAAGAGTTGGTTAGGTAGCTCTTTTGTAAAGGTCATTTCTTGTGCTTTATTCCT
GTACAAAATTTTGGAGATTGTGGCCATTTTTAGGCATTTTTAAAGTTATTAAGATGTAATATTTCTGTCAAAGCA
CATGATGCCATTGTACCAATTTATTGTTTCATTAATACTATCAATATTTGAGTAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
```

Figura 5. Secuencia de nucleótidos correspondiente a la región codificante y no codificante (en negrita) del extremo 3' del ARNm de la 1-FEH de yacón (*Smallanthus sonchifolius*).

```
LYQGVYHFFYQYNPYAATFGTIVWGHAVSYDLVNWIHLDPAIYPTQEADINSCWWSGATILPGNIPAMLYTGSDSNSRQVQD
LAWPKNLSDPFLREWVKYAGNPITPPAGVKDDCFRDPSTAWLGPDPVWRIVVGGDRDNNGMFLYQSTDFVNWTRYEQP
LASADATGTWECEFFFPVPLNSTNGLDTSAYSGNVMHVMKAGFEGHDWYITIGTYSYSPDRENFLPQNGLKLSGSTLDLRYD
YGQFYASKSFYDDSKNRRVLWAWVPETDSQEDDIEKGWAGLQSFRAIWDGSGKQLIQWPVEEIESLRGNEVKLQNKKLT
GTVVEIQQVTASQADVTISFKLEDLKEAEVLDTSVVDPQLCTSERGASSKGAFFGPFVLMASKDLKEQTAFIFRVFQNN
GRYSVLMCSDLRSRSTVRSNIDTTSFGAFVDIDPRYNEISLRNLIDHSIIESFGAGGKTCTSLIYPKFLTYEDAHLFAFNNGTQS
KISQMSAWSMKNAEFVIDQIVKSA*
```

Figura 6. Secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura parcial de la proteína 1-FEH en yacón (*Smallanthus sonchifolius*). Los sitios potenciales de N-glucosilación aparecen en cursivas y subrayados. Se resaltan en color los dominios del sitio catalítico (negritas) y los sitios potenciales de N-miristoilación (subrayados).

De acuerdo a la información del programa ScanProsite, y como se muestra en la **figura 6**, la proteína presenta cuatro sitios potenciales de N-glicosilación en las posiciones ubicadas por los residuos; NLS, NWTR, NSTN y NGTQ. La descripción de otras FEHs, muestran resultados similares: cuatro sitios en la 1-FEH de *Triticum aestivum* (Van den Ende et al., 2003) y en la 1-FEH de *Lolium perenne* (Lothier et al., 2007) tres sitios tanto en la 1-FEH Ila y 1-FEH IIb de *Cichorium intybus* (Van den Ende et al., 2001), tres sitios en la 1-FEH de *Vernonia herbacea* (Asega et al., 2008) y tres en la 1-FEH de *Arctium lappa* (Ueno et al., 2011). En plantas, los N-glucanos ligados influyen fuertemente la conformación de las glucoproteínas, su estabilidad y actividad biológica, pudiendo además afectar el plegamiento post-traducciona de la proteína (Rayon et al., 1998). La secuencia parcial de la 1-FEH de yacón muestra además dos de los tres motivos altamente conservados que conforman el sitio activo de las glucosil hidrolasas de la familia GH32, que según Henrissat y Davies (1997) agrupa a las enzimas que metabolizan fructanos y a las invertasas de tipo vacuolar y de pared. En el análisis de la estructura proteica de la 1-FEH Ila de *C.intybus*, Verhaest et al., (2005) señalan tres aminoácidos que son altamente conservados dentro de las glucosil hidrolasas de la familia 32 y que

cumplen un rol fundamental en el mecanismo catalítico de la enzima, éstos son: Asp22, Asp147 y Glu201, que son parte respectiva de los tres motivos NDPNG, FRDP y WECPD del sitio activo. Haciendo analogía con esta estructura y la de otras enzimas de la misma familia, la 1-FEH putativa de yacón presenta los aspartato y glutamato de los dos últimos motivos y el aspartato restante se encontraría en el primer motivo aún no determinado. En la **Figura 6** pueden observarse también los sitios de posible N-miristoilación, de función aún no establecida en los residuos; GNipAM, GSdsNS, GLdtSA, GLkISG, GQfyAS, GVtaSQ y GGktCT. Estos sitios se encuentran presentes en otras fructano exohidrolasas, el fragmento del gen muestra al parecer pertenencia a la superfamilia GH32_62_32_68 (glucosil fructosidasas), con presencia de multidominios Glyco 32 (glucosil hidrolasas 32), SacC (Sucrosa 6 fosfato hidrolasa SacC – metabolismo y transporte de carbohidratos) y scrB_fam (Sucrosa 6 fosfato hidrolasa – metabolismo energético y biosíntesis y degradación de polisacáridos).

La secuencia de aminoácidos de la FEH de yacón tiene un alto grado de identidad respecto a las 1-FEHs de especies emparentadas (**Figura 7**), siendo estos valores: *C. intybus* (88,5 por ciento), *H. tuberosus* (88,2 por ciento), *V. herbacea* (86,5 por ciento) y *A. lappa* (85,0 por ciento).

	AIP90174.1_fruktan_1-exohidrolase_IIb_Cichorium_intybus	9B_YACÓN	C-AC37922.1_fruktan_1-exohidrolase_IIa_Cichorium_intybus	AJW31156.1_fruktan_1-exohidrolase_Helianthus_tuberosus	pdb1ST8IA_Chain_A_Fruktan_1-exohidrolase_IIa	CAJ77148.1_putative_fruktan_1-exohidrolase_partial_Vernonia_herbacea	BAL73222.1_fruktan_1-exohidrolase_Arctium_lappa	KYH87436.1_Concanavalin_A-like_lectin/glucanase_superfamily_Cynara_scolymus	CAD49079.1_fruktan_1-exohidrolase_Campanula_rapunculoides	C-AD48199.1_fruktan_1-exohidrolase_Triticum_aestivum	C-AD48404.1_fruktan_6-exohidrolase_Beta_vulgaris	CAA26513.1_levansucrase_Bacillus_subtilis
AIP90174.1 fruktan 1-exohidrolase IIb Cichorium intybus												
9B YACÓN	88.48											
CAC37922.1 fruktan 1-exohidrolase IIa Cichorium intybus	96.32	88.5										
AJW31156.1 fruktan 1-exohidrolase Helianthus tuberosus	84.8	88.2	84.6									
pdb1ST8IA Chain A Fruktan 1-exohidrolase IIa	96.32	88.5	100	84.6								
CAJ77148.1 putative fruktan 1-exohidrolase partial Vernonia herbacea	86.52	86.5	87.5	83.1	87.5							
BAL73222.1 fruktan 1-exohidrolase Arctium lappa	85.05	85	84.8	80.4	84.8	82.6						
KYH87436.1 Concanavalin A-like lectin/glucanase superfamily Cynara scolymus	84.8	85.3	84.6	80.9	84.6	83.3	93.9					
CAD49079.1 fruktan 1-exohidrolase Campanula rapunculoides	66.91	65.9	67.2	65.2	67.2	64.2	65.7	65.686				
CAD48199.1 fruktan 1-exohidrolase Triticum aestivum	49.51	50.2	49.5	50.2	49.5	48	48	48.529	51.7			
CAD48404.1 fruktan 6-exohidrolase 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 7. Porcentajes del grado de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la FEH en estudio y 1-FEH de especies relacionadas.

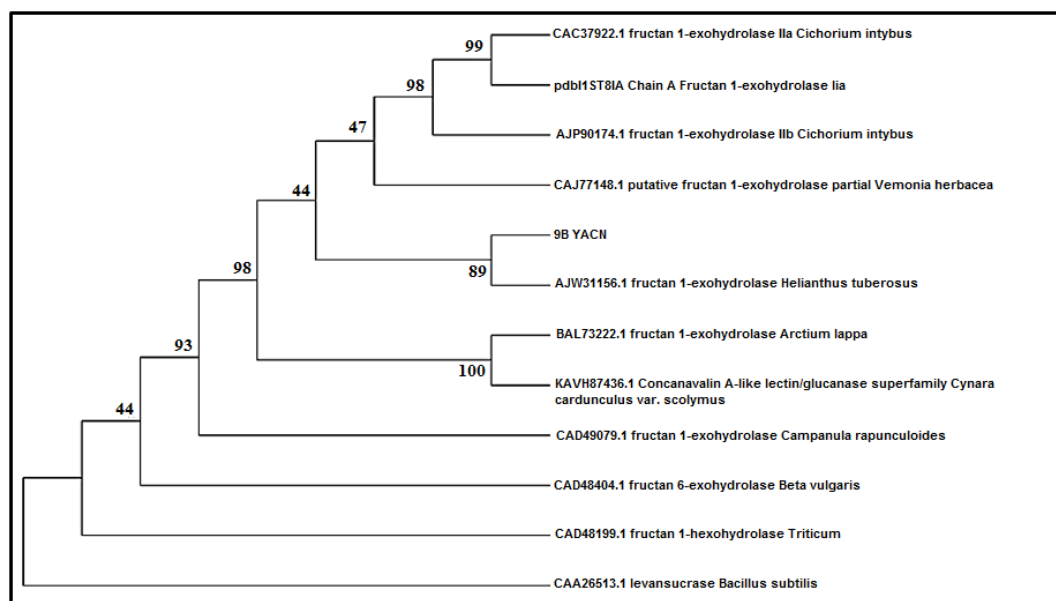


Figura 8. Árbol filogenético de la secuencia FEH de *S. sonchifolius* y sus homólogos 1-FEH de *C.intybus*, *V.herbacea*, *A.lappa*, *H. tuberosus* y *C. rapunculoides*.

El árbol consenso Bootstrap obtenido a partir de 2000 réplicas (Figura 8) indicó un 89 por ciento de credibilidad del nodo que relaciona las secuencias FEH de *S. sonchifolius* y la 1-FEH de *H. tuberosus*. La similitud con otras fructano exo-hidrolasas de miembros de la familia Asteraceae, su ubicación en un clado conjuntamente con la FEH de *H. tuberosus* y relativamente separada de las FEH de *Cichorium intybus* y *Vernonia herbacea*, sugieren que el gen 9B de yacón podría ser una forma alélica distinta a las anteriormente descritas para la actividad 1-FEH. Cabe resaltar que *Helianthus tuberosus* es una asterácea que a similitud del yacón contiene fructo-oligosacáridos cuya concentración varía de acuerdo a la etapa de crecimiento y al estado fisiológico en el que se encuentre (Itaya *et al.* 2002; 2007; Luo *et al.*, 2018; Jiao *et al.*, 2018), lo cual sugeriría uno o más patrones de expresión, formas alélicas específicas o un control mediado por las fructosiltransferasas e hidrolasas del metabolismo de los fructanos en cada especie. Se hacen necesarios ensayos complementarios posteriores para completar su caracterización.

4. Conclusiones

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. 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. 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. herbacea* (86,5 por ciento) y *A. lappa* (85 por ciento). La secuencia de aminoácidos de la 1-FEH en yacón expuso tres probables sitios de N-glucosilación y dos de los tres sitios de las regiones consenso del sitio activo que confirmarían la identidad de 1-FEH.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto PI-092 PNIA por el financiamiento de esta investigación y al Mg. Marco Gálvez Gargurevich por sus aportes y recomendaciones para el inicio de este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. 1990. Basic local alignment search tool. *Lipman DJ. J Mol Biol.* 215(3): 403-10.
- Asega, A.F.; Roberto, J.; Schroeven, L.; Van den Ende, W.; Carvalho, M.A. 2008. Cloning, Characterization and Functional Analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) *RusbyPlant Cell Physiol* 49(8): 1185–1195.

- Barlow, J.J.; Mathias, A.P.; Williamson, R.; Gammack, D.B. 1963. A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochemical Biophysical Research Communications* 13: 61-66.
- Chan, C.; Teo, S.; Ho, C.; Othman, R.; Phang, S. 2004. Optimization of RNA extraction from *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 16: 297-301.
- De Roover, J.; Van Laere, A.; De Winter, M.; Timmermans, J.W.; Van den Ende, W. 1999. Purification and properties of a second fructanexohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiologia Plantarum* 106: 28-34.
- Demeke, T.; Ratnayaka, I.; Phan, A. 2009. Effects of DNA extraction and purification methods on real-time quantitative PCR analysis of Roundup Ready soybean. *J. AOAC Int.* 92: 1136-1144.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
- Fukai, K.; Miyasaki, S.; Nanjo, F.; Hara, Y. 1993. Distribution of Carbohydrates and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science and Plant Nutrition* 39(3): 567-571.
- Fukai, K.; Ohno, S.; Nanjo, F.; Hara, Y. 1997. Seasonal fluctuations in fructano content and related enzyme activities in yacón (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science and Plant Nutrition* 43(1): 171-177.
- Goto, K.; Fukai, K.; Hikida, J.; Nanjo, F.; Hara, Y. 1995. Isolation and Structural Analysis of Oligosaccharides from Yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(12): 2346-2347.
- Grau, A.; Rea, J. 1997. Yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp&Endl.) H. Robinson. In: Hermann M & Heller J (eds.): Andean roots and tubers: ahupa, arracacha, maca, yacón. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 21. Institute of plant Genetic and Crop Plant Research. Gatersieben / International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy: 199-242.
- Hasegawa, M.; Iida, Y.; Yano, T.; Takaiwa, F.; Iwabuchi, M. 1985. Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. *J MolEvol.* 22(1): 32-8.
- Hendry, G.A.F. 1993. Evolutionary origins and natural fractions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* 123: 3-14.
- Henrissat, B.; Davies, G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol.* 7(5): 637-44.
- Hermann, M.; Freire, I.; Paos, C. 1999. Compositional diversity of the yacón storage root. In: Impacto a changing world: program report 1997-98. International Potato Center (CIP): 425-432.
- Itaya, N.M.; Machado De Carvalho, M.A.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2002. Fructosyltransferase and hydrolase activities in rhizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). *Physiologia Plantarum* 116: 451-459.
- Itaya, N.M.; Asega, A.F.; Machado De Carvalho, M.A.; Figueiredo-Ribeiro R.C.L. 2007. Hydrolyase and fructosyltransferase activities implicated in the accumulation of different chain size fructans in three Asteraceae species. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 647-656.
- Jiao, J.; Wang, J.; Zhou, M.; Ren, X.; Zhan, W.; Sun, Z.; Zhao, H.; Yang, Y.; Liang, M.; Van den Ende, W. 2018. Characterization of fructan metabolism during Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) germination. *Frontiers in Plant Science* 9: 1384.
- Lachman, J.; Havrland, B.; Fernández, E.C.; Dudjak, J. 2004. Saccharides of yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. EtEndl.)) H. Robinson) tubers and rhizomes and factors affecting their content. *Plant Soil Environ* 50(9): 383-390.
- Lodhi, M.A.; Ye, G.N.; Weeden, N.F.; Reisch, B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12: 6-13.
- Lothier, J.; Lasseur, B.; Le Roy, K.; Van Laere, A.; Prudhomme, M.P.; 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: 1969-1983.
- Luo, R.; Song, X.; Li, Z.; Zhang, A.; Yan, X.; Pang, Q. 2018. Effect of soil salinity on fructan content and polymerization degree in the sprouting tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) *Plant Physiology and Biochemistry* 125: 27-34.
- Marx, S.; Nosberger, J.; Frehner, M. 1997. Seasonal variation of fructan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β -(2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *New Phytol* 135: 267-277.
- Meguro-Maoka, A.; Yoshida, M. 2016. Analysis of seasonal expression levels of wheat fructanexohydrolase (FEH) genes regulating fructan metabolism involved in wintering ability. *Journal of Plant Physiology* 191: 54-62.
- 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.
- Pedreschi, R.; Campos, D.; Noratto, G.; Chirinos, R.; Cisneros-Zevallos, L. 2003. Andean yacón root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(18): 5278-5284.
- Portes, M.T.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.; Carvalho, M.A.M. 2008. Low temperature and defoliation affect fructan-metabolizing enzymes in different regions of the rhizophores of *Vernonia herbacea*. *Journal of Plant Physiology* 165: 1572-1581.

- Rayon, C.; Lerouge, P.; Faye, L. 1998. The protein N-glycosylation in plants. *Journal of Experimental Botany* 49: 1463-1472.
- Ritsema, T.; Smeekens, S. 2003. Engineering fructan metabolism in plants. *J. Plant Physiol.* 160: 811-820.
- Ritsema, T.; Smeekens, S. 2003a. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223-230.
- Rubio, J.; Zapata, O. 2011. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of Mangrove plants. *Electron. J. Biotechnol.* 14(5): 1-2.
- 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 pp.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software vers. 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tiwari, K.; Jadhav, S.; Gupta, S. 2012. Modified CTAB technique for isolation of DNA from some medicinal plants. *Res. J. Med. Plant* 6: 65-73.
- Ueno, K.; Ishiguro, Y.; Yoshida, M.; Onodera S.; Shiomi, N. 2011. Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.). *Chemistry Central Journal* 5(16): 1-9.
- Ueno, K.; Yokoshima, S.; Sasajima, Y.; Ishiguro, Y.; Yoshida, M.; Shiomi, N.; Onodera, S. 2015. Two Fructan 1-Exohydrolase Isoforms Hydrolyze Fructans in Edible Burdock (*Arctium lappa* L.) during Storage at a Low Temperature. *J. Appl. Glycosci.* 62: 65-72.
- Van den Ende, W.; Michiels, A.; De Roover, J.; Verhaert, P.; Van Laere, A. 2000. Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell wall ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *Plant J.* 24: 447-456.
- Van den Ende, W.; Michiels, A.; Van Wouterghem, D.; Clerens, S.; De Roover, J.; Van Laere, A. 2001. Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloofchicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIa and 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiol.* 126: 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. 2003. Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-Trimmers during Graminan Biosynthesis in Stems of Wheat? Purification, Characterization, Mass Mapping, and Cloning of Two Fructan 1-Exohydrolase Isoforms. *Plant Physiol.* 131: 621-631.
- Van den Ende, W. 2018. Novel fructanexohydrolase: unique properties and applications for human health. *Journal of Experimental Botany* 69(18): 4227-4231.
- Verhaest, M.; Lammens, W.; Le Roy, K.; De Ranter, C.J.; Van Laere, A.; Van den Ende, W.; 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: 400-411.
- Verhaest, M.; Lammens, W.; Le Roy, K.; De Ranter, C.J.; Van Laere, A.; Rabijns, A.; Van den Ende, W. 2007. Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. *New Phytologist* 174: 90-100.
- Verwoerd, T.C.; Dekker, B.M.M.; Hoekema, A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17(6): 2362.
- Vijn, I.; Smeekens, S. 1999. Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* Vol. 120:351-359.
- Whelan, S.; Goldman, N. 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach, *Mol Biol Evol.* 18: 691-699.
- Xu, H.; Liang, M.; Xu, L.; Li, H.; Zhang, X.; Kang, J.; Zhao, Q.; Zhao, H. 2015. Cloning and functional characterization of two abiotic stress-responsive Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) fructan 1-exohydrolases (1-FEHs). *Plant Mol. Biol.* 87: 81-98.