

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA BASE MOLECULAR DEL PROCESO DE DORMANCIA EN *ILEX PARAGUARIENSIS*

HERNÁNDEZ LÓPEZ, Diego.

Estudiante del Curso de Ciencias Biológicas - ILACVN – UNILA;
E-mail: diego.lopez@aluno.unila.edu.br;

ROJAS, Cristian Antonio.

Docente/pesquisador del curso de Ciencias Biológicas - ILACVN – UNILA.
E-mail: cristian.rojas@unila.edu.br.

1 Introducción

El cultivo de Yerba Mate enfrenta dificultades consecuencia del escaso proceso de domesticación por el cual ha pasado esta planta, lo que lleva a que se conserven la mayoría de sus características silvestres, poco deseables para la agricultura, como la baja tasa de germinación de sus semillas y desuniformidad de la misma provocada por un fenómeno de dormancia que puede prolongarse hasta 1 año. La dormancia se da como resultado de la interacción entre promotores e inhibidores de la germinación que se instalan en el embrión cuando el fruto es aun inmaduro, impidiendo la germinación.

El objetivo de este trabajo es entender el proceso de dormancia y su término, en *Ilex paraguariensis* a nivel molecular. Vale mencionar que la metodología original fue modificada en el curso del estudio debido a dificultades que fueron surgiendo, no obstante el objetivo general propuesto inicialmente se mantuvo, enfocando identificar las rutas metabólicas y los genes involucrados en el control y regulación del proceso de germinación, específicamente del fenómeno de dormancia. Este trabajo pretende no solo aportar conocimiento específico sobre la biología de *Ilex*, sino que por tratarse de una planta representativa de un grupo de plantas que presentan poca importancia comercial son poco estudiadas, sin embargo no son menos importantes ya que a este grupo pertenecen la mayor parte de plantas no domesticadas que pueblan los ecosistemas naturales y muchas de ellas pueden presentar mecanismos de dormancia similares a los encontrados en Yerba Mate.

2 Metodología

Materiales: Computador Hewlett Packard modelo 15-AF131dx AMD® A6 4 core, memoria RAM 4GB, 500GB 5400RPM hard drive, con software Windows 10 Home (64-bit);

Transcripto de Yerba Mate de 200 mil secuencias; TAIR (<https://www.arabidopsis.org/html>); NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); programas: BioEdit v7.2.5; Blast2Go.

1- Prospección de genes involucrados em dormancia y germinacion de Yerba Mate:

Se comparan secuencias de un transcripto de *Ilex paraguariensis* usando como referencia una base de datos de genes relacionados a dormancia y germinación de *Arabidopsis thaliana*, para esto son seleccionadas 31 secuencias de dormancia y 83 de germinación de TAIR, estas secuencias fueron cargadas en formato BLAST al programa BioEdit así como también las secuencias del transcriptoma de Yerba. El programa realiza un alineamiento de secuencias buscando homologías. Esta relación es soportada por un *e-value* que indica la probabilidad de que las secuencias comparadas se parezcan en la base de datos por acaso, en lugar de ser por homología (ABASCAL, 2003). Como medida de corte, el estudio continua únicamente con aquellas secuencias que obtuvieron e-valor menor que e-050. Las secuencias de los genes de interés encontrados en nuestro genoma fueron copiadas y llevadas a la base de datos NCBI, Para las secuencias de *Arabidopsis* obtenidas de TAIR se usa BLASTP, sección que busca dominios de proteínas en su base de datos utilizando un anzuelo de proteínas y para las secuencias de Yerba Mate, se realizó la búsqueda de dominios proteicos conservados mediante BLASTX (de nucleótido a proteína). obtenidos los dominios proteicos conservados de *Ilex* y de *Arabidopsis*, se realiza la comparación entre ellos.

2- Anotación funcional parcial del transcriptoma de Yerba Mate: fueron separadas aleatoriamente 10 mil secuencias y realizada la anotación funcional mediante el programa Blast2go (CONESA *et al*, 2008). Este software usa el Gene Ontology como forma de facilitar el intercambio de informaciones disponibles entre la colección de secuencias que serán analizadas y un banco de datos y estandariza la representación de los genes y sus productos para todos los sistemas biológicos, permite realizar búsquedas *on line* con BLAST, búsqueda por secuencias similares, entre otras funciones (ALTSCHUL, 1990).

3 Fundamentación teórica

La Yerba Mate es una planta de la familia *Aquifoliaceae* cuya distribución geográfica comprende la región Este de Paraguay, Noreste argentino, sur de Brasil y algunas localidades de Uruguay (GIBERTI, 2011). Es cultivada y consumida en América Latina desde antes de la colonización, usada en bebidas e infusiones, tiene aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y además se destaca la presencia de compuestos como alcaloides y polifenoles que le otorgan propiedades medicinales. La planta presenta una gran connotación simbólica

regional, pero pese a esto se desconoce gran parte de su biología (RODIGHERI *et al*, 1997). Uno de los principales problemas de la producción de Yerba es la baja tasa de germinación de sus semillas, el largo periodo, y la desuniformidad de la misma, provocados por el fenómeno de dormancia la cual se define como una condición en la que una semilla viable deja de germinar sobre condiciones ambientales favorables (FINKELSTEIN *et al*, 2008) este mecanismo permitiendo que la germinación se dé a intervalos de tiempo, aumentando las chances de sobrevivencia, es un carácter adaptativo, eliminado de la mayoría de las especies cultivadas por selección. Además, la presencia de inhibidores en el endosperma de las semillas impiden el desarrollo del embrión el cual permanece en una fase inicial de desarrollo hasta después de la dispersión (FOWLER, 2000). Estudios han relacionado la dormancia con cambios en la expresión génica y actividad enzimática (FINKELSTEIN *et al*, 2008). En este contexto se hace importante conocer los mecanismos que controlan estos procesos en Yerba Mate. La Bioinformática ofrece una herramienta al estudio de estas cuestiones. Haciendo uso de esta tecnología, recientemente, un grupo de investigación en Yerba Mate elaboró un transcriptoma obteniendo 200.000 secuencias a partir de secuenciación de nueva generación (NGS). Con esta información disponible y mediante softwares bioinformáticos este trabajo pretende identificar las rutas metabólicas y genes involucrados en el control y regulación del proceso de germinación y específicamente del fenómeno de dormancia en Yerba. De esta manera, conociendo mejor los mecanismos que están por detrás de la dormancia en esta planta, será posible también entender un poco más sobre los mecanismos usados por otras plantas como las recalcitrantes, aportando nuevos conocimientos, por ejemplo en la implementación de bancos de semillas y germoplasma.

4 Resultados

1- Prospección de genes: Las homologías encontradas por lineamiento fueron agrupadas en 4 categorías: i) Secuencias que presentan los mismos dominios en *Arabidopsis* e *Ilex*. En ellas se ve la conservación de aminoácidos pertenecientes al sitio catalítico importantes para la constitución del dominio. Estas regiones sugieren la caracterización de los mismos tipos de enzimas. ii) Secuencias con dominios que están presentes en *Arabidopsis* y no se encuentran en *Ilex*; iii) Secuencias con dominios que están presentes en *Ilex* y no se encuentran en *Arabidopsis*, en estos grupos se ven varias duplicaciones de dominio, iv) proteínas que no presentan dominios conservados evidentes ni en *Arabidopsis* ni en *Ilex*, pese a no encontrar dominios conservados, se encontró homologías lo cual puede deberse a

dominios conservados a nivel de conformación tridimensional. 2- Anotación funcional parcial: la porción de transcripto analizada revela que el organismo con el cual las secuencias de *Ilex paraguariensis* demostraron mayor cantidad de homologías fue *Vitis vinifera*, la uva, se obtuvo también una lista de 114 vías metabólicas presentes en esta planta de las que se destacan la vía de las purinas y tiamina por la cantidad de secuencias involucradas.

5 Conclusiones

Se consiguió mapear varias de las secuencias involucradas en dormancia y germinación. Resta saber si las secuencias homólogas en *Ilex* desempeñan exactamente las mismas funciones, ya que para algunas de las secuencias no se encontraron dominios conservados, ya sea por la distancia filogenética entre especies comparadas o porque efectivamente no existe la secuencia en Yerba. La maquinaria que lleva a cabo los procesos de germinación y dormancia en *Ilex* fueron mínimamente evidenciados y es apenas el punto de partida para tener un entendimiento satisfactorio de la totalidad del proceso. La disponibilidad de un transcriptoma de Yerba ofrece la posibilidad de explorar más en profundidad las vías metabólicas por detrás de estos y otros procesos hasta el momento poco estudiados. El 5% de dicho transcripto analizado fue suficiente para mapear algunas rutas enzimáticas involucradas en estos y otros procesos.

6 Principales referencias bibliográficas

FINKELSTEIN, R., et al., **Molecular aspects of seed dormancy**. Annu Rev Plant Biol, 2008. 59: p. 387-415.

FOWLER, J.A.P. STURION J.A., **Aspectos da Formação do Fruto e da Semente na Germinação da Erva-mate**. Embrapa, 2000(45): p. 1-5.

CONESA, Ana; GÖTZ, Stefan. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. International journal of plant genomics, 2008 (2008).