

**Lusetti, Luisina**

*Estudio de genes de la familia MYB relacionados con la tolerancia al estrés salino en Lotus spp*

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria  
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Lusetti, L. 2015. Estudio de genes de la familia MYB relacionados con la tolerancia al estrés salino en Lotus spp [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en:  
<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/estudio-genes-familia-myb.pdf> [Fecha de consulta:.....]

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA**



**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Ingeniería en Producción Agropecuaria**

Estudio de genes de la familia MYB relacionados con la  
tolerancia al estrés salino en *Lotus spp.*

**Trabajo final de graduación para optar por el título de:  
Ingeniero en Producción Agropecuaria**

Autor: Lusetti, Luisina.

Profesor Tutor: Erica Duarte Silveira, MSc., Ph.D.

Profesor Co-Tutor: Maria Luz Zapiola, MSc., Ph.D.

Fecha: 2015

## **RESUMEN**

El género *Lotus* comprende alrededor de 100 especies anuales y perennes distribuidas en todo el mundo. Algunas de las especies de *Lotus* muestran un gran potencial para la adaptación a estreses abióticos. Entre estas especies se encuentra *Lotus tenuis*, especie herbácea, que se encuentra naturalizada en los bajos salinos alcalinos de la Pampa Deprimida hace más de 50 años y es muy valorada como forrajera en los sistemas ganaderos. Como características principales se encuentra la variabilidad genética de sus poblaciones, la plasticidad genotípica de las plantas, su tolerancia al anegamiento y a la salinidad. Teniendo en cuenta la importancia de los daños causados por el estrés en las plantas, sería de gran utilidad comprender cuales son los mecanismos moleculares a través de los cuales las plantas detectan el estrés y transducen la señal dentro de las células para generar respuestas adaptativas y de esta manera poder diseñar estrategias que permitan mejorar la tolerancia al estrés de los cultivos. Uno de los mecanismos de la regulación de la expresión génica es a través de los factores de transcripción (FT). Estos, entre otras funciones, regulan las respuestas adaptativas, por eso sería importante conocer cuáles son los genes involucrados en estas respuestas. Varias familias de FT se encuentran involucradas en la respuesta al estrés abiótico en plantas, una de ellas es la familia de proteínas MYB, siendo esta una de las más numerosas en las plantas. El objetivo de este trabajo es identificar FT tipo MYB en *L. tenuis* y evaluar su relación con la respuesta adaptativa al estrés salino.

Para este experimento se extrajo ADN de hojas de plantas que crecieron en condiciones normales y ARN de raíces de plántulas que permanecieron bajo condiciones de salinidad por 8 y 24 horas, de dos familias de medio hermano (FMH) de *L. tenuis*, una susceptible y otra tolerante a la salinidad. Se realizaron varias reacciones de PCR y RT-PCR, que arrojaron como resultado amplificación del fragmento genómico y del transcrito con el tamaño esperado. Una vez secuenciados estos fragmentos se determinó la presencia de FT tipo MYB en *L. tenuis*.

Analizando los resultados preliminares de la expresión relativa de los genes MYB estudiados bajo condiciones de estrés salino, se observó expresión bajo condiciones de salinidad como en condiciones normales de crecimiento, lo que sugiere que estos genes no solo responden al estrés salino sino también a otros estreses o factores. Para el gen MYB 102\_1420 se observó mayor expresión del tratamiento con solución salina a las 24 horas que a las 8 horas. Al comparar ambas FMH vemos que el comportamiento es similar. Para el gen MYB 102\_950 se observó que la FMH susceptible bajo condiciones de salinidad a las 8 horas presenta mayor expresión que a las 24 horas, con la FMH tolerante sucede todo lo contrario.

El estudio de la capacidad de adaptación y tolerancia a los distintos estreses y el control de las respuestas adaptativas por medio de los FT en *L. tenuis* permitirá contribuir a mejorar su adaptación en la Pampa Deprimida, y de esta manera poder identificar poblaciones aptas para ser cultivadas en suelos salinos.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>5</b>
<b>IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION DEL TEMA.....</b>	<b>5</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>6</b>
a) <i>Material Vegetal.....</i>	<i>6</i>
b) <i>Análisis bioinformático y diseño de oligonucleótidos.....</i>	<i>6</i>
c) <i>Extracción, cuantificación de ADN y amplificación de los fragmentos genómicos de los genes MYB.....</i>	<i>7</i>
d) <i>Tratamiento de estrés salino para estudio de expresión de los genes MYB.....</i>	<i>8</i>
e) <i>Extracción y cuantificación de ARN.....</i>	<i>9</i>
f) <i>Síntesis de cADN.....</i>	<i>9</i>
g) <i>Reverse transcription polimerase chain reaction (RT-PCR).....</i>	<i>9</i>
h) <i>Secuenciación y análisis bioinformático de las secuencias.....</i>	<i>10</i>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>12</b>
a) <i>Identificación in silico de genes de la familia MYB asociados al estrés abiótico y diseño de primers para su amplificación en L. tenuis.....</i>	<i>12</i>
b) <i>Extracción de ADN y amplificación de MYB en L. tenuis por PCR.....</i>	<i>15</i>
c) <i>Extracción de ARN y amplificación por RT-PCR.....</i>	<i>16</i>
d) <i>Análisis de las secuencias.....</i>	<i>21</i>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>22</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>23</b>

## ***1- INTRODUCCION***

A causa del aumento en la población mundial, la demanda de alimentos también ha incrementado. Según FAO el requerimiento de productos agrícolas para el 2030 será mayor al 60% (FAO 2000, [www.fao.org](http://www.fao.org)). Sin embargo áreas destinadas a la producción alimentaria están sujetas a una constante degradación. Esta degradación producida por la agricultura ocurre a tal velocidad que uno de los grandes desafíos para poder alcanzar la demanda de alimentos es disminuir y revertir el deterioro del suelo y/o adaptar a los cultivos a las nuevas condiciones limitantes.

Uno de los factores responsables de la degradación de los suelos agrícolas es la salinización. Este fenómeno se produce como resultado de la acumulación de sales en la superficie debido al ascenso de las aguas freáticas. La salinidad afecta el crecimiento y la producción al reducir el potencial hídrico de la solución del suelo y al crear un desequilibrio nutritivo por la elevada concentración de elementos como sodio y cloro.

De 230 millones de hectáreas que se encuentran bajo riego, 45 millones están afectados por la salinidad, lo cual indica que se pierden al año 1.5 millones de hectáreas de suelos irrigados. La mayoría de los cultivos son sensibles a la salinidad y su producción se ve afectada cuando se cultivan en suelos salinos (Barkla *et al.*, 2007). Sin embargo existen plantas que son capaces de adaptarse a condiciones salinas. Los mecanismos de adaptación de estas plantas a esta condición de estrés es consecuencia de cambios fisiológicos y bioquímicos controlados por señales moleculares, logrando, de esta manera, regular la modificación de rutas biosintéticas que resultan en ajuste osmótico y la protección de las estructuras celulares (Leidi y Pardo, 2002).

Argentina es el tercer país con suelos afectados por salinidad en el mundo, luego de Rusia y Australia, según FAO-UNESCO. Se considera que 20 millones de hectáreas aproximadamente se encuentran perjudicados por distintos grados de salinidad primaria mientras que de las tierras irrigadas, el 34 % tiene problemas de salinidad secundaria (Franco, 2011). Una de las zonas más afectada por este problema es la “Pampa Deprimida Bonaerense” situada en el Centro Este de la Provincia de Buenos Aires, abarcando nueve millones de hectáreas de las cuales el 60% presenta suelos hidromórficos e hidrohalomórficos, debido a un drenaje deficiente, baja permeabilidad y a la presencia de la napa freática cercana. Allí, la cría bovina es la actividad dominante y se sustenta sobre la productividad de sus pastizales escasos en leguminosas (Escaray *et al.*, 2012), siendo su vegetación predominante la estepa gramínea.

El género *Lotus* comprende alrededor de 100 especies anuales y perennes distribuidas en todo el mundo. Algunas de las especies de *Lotus* muestran un gran potencial para la adaptación a un número de estreses abióticos (Escaray *et al.*, 2012). Dentro de esas especies se encuentra *Lotus tenuis*, una especie herbácea, de hábito de crecimiento prostrado, que florece en primavera-verano-otoño y es valorada como forrajera para los sistemas ganaderos de la región. *L. tenuis* se encuentra naturalizado en los bajos salinos alcalinos de la Pampa Deprimida hace más de 50 años (Vignolo *et al.*, 1999). Dentro de las características principales de esta leguminosa se encuentra la variabilidad genética de sus poblaciones, la

plasticidad genotípica de las plantas, su tolerancia al anegamiento y a la salinidad. La tolerancia a la salinidad es un proceso complejo que involucra: mantenimiento del balance iónico, mecanismo de ajuste osmótico, restauración del balance oxidativo y otras adaptaciones estructurales y metabólicas (Franco, 2011).

Los estreses pueden ser abióticos o bióticos. En la naturaleza, los factores estresantes actúan conjuntamente, existiendo un agente primario, que actúa con mayor intensidad y da lugar a cambios en la morfología, metabolismo y desarrollo de la planta, y agentes secundarios, que contribuyen al debilitamiento de la vitalidad de la planta (Lichtenthaler, 1996). Las plantas están expuestas a constantes cambios en el medio que actúan como estímulos externos y desencadenan cascadas de señalización; a su vez, éstas determinan que la planta responda y se adapte a las condiciones del medio o, por el contrario, que la planta muera (Scandalios, 2005).

La vía de transducción de señales comienza con la percepción de la señal y continúa con la generación de nuevos mensajeros. Estas vías pueden tener como blanco final FT (factores de transcripción) que controlan la expresión de los genes involucrados con la respuesta al estrés.

Los FT son proteínas que modulan la transcripción de los genes uniéndose a motivos de ADN específicos (Pazin y Kadonaga, 1997) y se clasifican en distintas familias en función de su estructura primaria, que suele estar muy conservada dentro de la misma clase. Varias familias de FT se encuentran involucradas en la respuesta al estrés abiótico en plantas, una de ellas es la familia de proteínas MYB, siendo esta una de las más numerosas en las plantas (Arratia y Aguirre, 2013).

Una característica común de las proteínas MYB es la presencia de un dominio de unión al ADN que se encuentra conservado entre los animales, las plantas, los protozoarios y los hongos. El dominio MYB, consiste en dos regiones de cerca de 50 aminoácidos de longitud, que son capaces de formar tres hélices alfa cada una, y así unirse al ADN. Los MYB se encuentran implicados en varias funciones como es el control de la proliferación y la diferenciación celular, la regulación del metabolismo, la señalización celular en respuesta a estímulos externos. Estas funciones de las proteínas MYB se han estudiado en numerosas especies de plantas como *Arabidopsis thaliana*, maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), petunia (*Petunia hybrida*), vid (*Vitis vinífera*) y manzana (*Malus domestica*) utilizando análisis genéticos y moleculares (Revisado por Dubos *et al.*, 2010). En *A. thaliana* se determinó que el gen MYB 102 es inducido bajo condiciones de estrés salino (Fujita *et al.*, 2011). Otro estudio da información detallada sobre la participación de los FT MYB en trigo y su relación con el estrés salino (Rahaie *et al.*, 2010). En *L. japonicus*, especie emparentada con *L. tenuis*, estudios de expresión génica evidenciaron que FT tipo MYB están relacionados con la respuesta al estrés salino (Sánchez *et al.*, 2008). A partir de este experimento se pudo observar que para el gen que codifica para un supuesto MYB hubo un aumento en la expresión génica tanto en condiciones de aclimatación salina gradual como en condiciones de sequía, no así en shock salino.

La identificación de genes de la familia MYB en *Lotus spp* y su relación con la tolerancia al estrés salino permitirá conocer el papel de estos FT en especies de esta familia y posibilita su utilización en estrategias de mejoramiento por biotecnología. Este trabajo tiene como objetivo la búsqueda de genes de la familia

MYB en *L. tenuis* y evaluar la relación de la expresión de este FT con la respuesta adaptativa al estrés salino.

### ***HIPÓTESIS***

1. Los FT MYB presentes en *L. japonicus* se encuentran también en *L. tenuis*, por ser especies emparentadas.
2. La respuesta al estrés salino en *L. tenuis* está relacionada con la presencia y expresión de los FT tipo MYB.

### ***IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA***

En la Argentina, la fuente de alimento más importante para el ganado, está representada por especies nativas y forrajeras cultivadas. Esto constituye un atributo económico importante para la producción ganadera.

En los últimos años, la expansión del cultivo de soja en todo el país, ha llevado a la ganadería hacia zonas marginales y a suelos con limitaciones más marcadas. Esto crea la necesidad de aumentar la producción de especies forrajeras que se adapten mejor a esas condiciones.

En la Pampa Deprimida, zona de cría de ganado por excelencia en el país, existe un importante problema de salinidad y alcalinidad en los bajos y una de las especies forrajeras que mejor se adapta es *L. tenuis*. La tolerancia a distintos estreses abióticos de *L. tenuis* permite que esta especie pueda ser utilizada como modelo para determinar los genes involucrados con el estrés salino, y así utilizarlos en la biotecnología para transferencia de estos a otras especies no adaptadas.

## 2- MATERIALES Y METODOS

### a) Material Vegetal.

Para el presente estudio se utilizaron semillas de dos poblaciones de *L. tenuis*, una tolerante (490) y una susceptible (2241) a la salinidad, ambas cedidas por la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA- Pergamino). El material fue originado en la Provincia de Buenos Aires entre los años 2004-2006 por el Programa de Mejoramiento Genético de Especies Forrajeras para Ambientes diversos del INTA.

### b) Análisis bioinformático y diseño de oligonucleótidos.

Para identificación de genes candidatos de la familia MYB involucrados con el estrés salino en *L. tenuis* fueron buscadas secuencias tanto génicas como proteicas de genes MYB en especies del género *Lotus*, especies de otros géneros descritas en la literatura y en las especies modelo *A. thaliana* y *O. sativa*. A partir de los resultados en *A. thaliana* se buscó la expresión de genes MYB en raíces de *Arabidopsis*, utilizando el programa eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), banco de datos que presenta la expresión de diversos genes en *A. thaliana* en distintos órganos y condiciones ambientales. El análisis del gen en este programa fue utilizado para verificar si la expresión del gen se ve afectada en condiciones de estrés salino. A partir de este análisis se realizó una búsqueda en el banco de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de América, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y también en los bancos de datos específicos de cada especie (<http://www.arabidopsis.org/>) (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>).

Para la identificación de una secuencia consenso y de las regiones conservadas, se realizaron alineamientos múltiples utilizando el programa CLUSTALDW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>). A partir de los alineamientos y de la generación de la secuencia consenso, fueron buscadas secuencias con mayor similitud en el banco de datos de *L. japonicus* (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>), basándose en los valores de e-value, utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para amplificación de los MYB en *L. tenuis* fueron elegidas dos de las secuencias del banco de *L. japonicus* con mayor similitud a la secuencia consenso. Para el diseño de oligonucleótidos degenerados se utilizó el programa CODEHOP (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>) y el programa PRIMER 3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>) para el diseño de los demás oligonucleótidos. Se diseñaron cuatro oligonucleótidos, dos para amplificar fragmentos génicos y dos para amplificar fragmento del transcrito en *L. tenuis*. Los criterios para el diseño de los oligonucleótidos en PRIMER3 fueron los siguientes: tamaño entre 20-23 nucleótidos, Tm entre 58-65°C, contenido de bases GC 45-65% y con una máxima complementariedad local de 4 y global de 2. Una vez diseñados, los mismos fueron comparados con el banco de datos de *L. japonicus* para comprobar su especificidad. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por IDT (EE.UU).

c) *Extracción, cuantificación de ADN y amplificación de los fragmentos genómicos de los genes MYB.*

La extracción de ADN fue realizada a partir de 100 mg de hojas sanas de plantas adultas de *L. tenuis*, tolerante (FMH 490) y susceptible (FMH 2241) a la salinidad.

Las muestras fueron maceradas con nitrógeno líquido en mortero y luego se procedió a la extracción de ADN utilizando el DNAeasy Plant Mini Kit, (Qiagen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una vez obtenido el ADN, se midió su concentración utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 y se almacenó a -80°C hasta su utilización para la amplificación de los fragmentos génicos por PCR. Para la amplificación por PCR se utilizaron 10-15 ng/μL de ADN por reacción. Se probaron distintas condiciones para la amplificación del producto deseado variando los programas de corrida, con distintas temperaturas (55°C-58°C). La reacción de PCR se realizó con un volumen final de 25μL.

Tabla 1: Descripción de los oligonucleótidos utilizados para realizar la PCR.

Nombre	Secuencia	Objetivo
MYB102_1F y MYB102_2_1420R	5'TCCWTGGACWCCAGARGAAGA3' 5'GGAACCACATGGGAAGAAGA 3'	Amplificar fragmento genómico de MYB102_1420 en <i>L. tenuis</i> .
MYB102_1F y MYB102_2_950R	5'TCCWTGGACWCCAGARGAAGA3' 5'GAAGATGAAGGCGTGGAAGA 3'	Amplificar fragmento genómico de MYB102_950 en <i>L. tenuis</i> .

Tabla 2: Componentes de la reacción de PCR para amplificación de los fragmentos génicos de MYB en *L. tenuis*.

	Concentración de la Solución stock	Concentración en cada reacción
Buffer taq	10x	1X
Mgcl2	25 mM	1.5 Mm
Dntps	10 mM	0.2 mM
Primer forward	10 mM	0.2 mM
Primer reverso	10 mM	0.2 mM
Taq Polimerasa	5U	1U

Tabla 3: Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos génicos de MYB en *L. tenuis*

Procedimiento	Temperatura (°C)	Tiempo (m)	Numero de Ciclos
Etapas de Desnaturalización	94	1	1
Etapas de Desnaturalización	94	00:30	30 -35*
Primer Annealing	55	00:30	30-35*
Primer Extensión	72	00:45	30-35*
Elongación final	72	5	1

\*Se refiere a la cantidad de veces que se repiten las etapas de desnaturalización, Annealing y extensión.

Los productos de la amplificación por PCR fueron observados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con Gel red (10000x), y a 90 V, por una hora. Como control negativo fue realizada una PCR sin ADN, con agua y para estimar el tamaño de los fragmentos se incluyó el marcador molecular Gene Ruler (Fermentas).

Los fragmentos amplificados fueron purificados, utilizando el GeneJET PCR Purification Kit, siguiendo el protocolo del fabricante (Fermentas), para posterior envío a secuenciación.

#### d) Tratamiento de estrés salino para estudio de expresión de los genes MYB

Para evaluación de la expresión de MYB 102\_ 1420 y 950 en respuesta al estrés salino en raíces de *L. tenuis*, fueron aisladas raíces de plántulas de *L. tenuis* tolerante (FMH 490) y susceptible (FMH 2241) sometidas a una concentración 0 mM y 150 mM de NaCl por 8 y 24 horas.

Para esto, 90 semillas de las dos FMH fueron escarificadas por abrasión con papel lija y puestas para germinar en cámara de germinación a 25°C en placas de petri, conteniendo filtros de papel humedecidos con agua. A los 7 días posterior a la siembra se trasplantaron las plántulas a bandejas multipots sobre compost orgánico Bertinat, cuya composición es de 20-25% de materia orgánica, 5-5.5% de PH, 19.8% relación Carbono/Nitrógeno, 20-25% de cenizas y 45-50% de humedad.

Las bandejas fueron mantenidas con el mismo nivel de agua destilada por una semana en cámaras de crecimiento, con las siguientes condiciones: temperatura de 25°C; fotoperiodo de 12 horas luz / 12 horas oscuridad; luz: 360 micromoles/m<sup>2</sup> \* segundo (PAR: photosynthetic active radiation).

Fueron realizados 3 tratamientos distintos con respecto a la concentración de NaCl:

Bloque 1 (Control): Plántulas crecidas con agua destilada sin agregar NaCl.

Bloque 2 (Tratamiento 8 horas): Plántulas sometidas a una solución de 150 mM de NaCl por 8 horas.

Bloque 3 (Tratamiento 24 horas): Plántulas sometidas a una solución de 150 mM de NaCl por 24 horas. Para esto, el agua de los tratamientos de 8 y 24 horas fue reemplazada por una solución de NaCl 150 mM, mientras q el control se mantuvo con agua.

Transcurridas las 8 y 24 horas desde la sustitución del agua por la solución, se cortaron y congelaron con nitrógeno líquido de forma inmediata las raíces de las plántulas y se conservaron a -80° C, libres de ARNasas, hasta la extracción del ARN. Para cada FMH, fueron realizadas tres repeticiones por bloque conteniendo 5 plántulas/repetición.

*e) Extracción y cuantificación de ARN*

Para la extracción de ARN se molieron las raíces de cada repetición en nitrógeno líquido con varilla de vidrio, y luego se utilizó el RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen), de acuerdo con el protocolo del fabricante, incluyendo el tratamiento con ADNasa. Una vez obtenido el ARN, se midió la concentración con el espectrofotómetro Nanodrop 2000, y se verificó la integridad del ARN extraído con gel de agarosa 1%, teñido con Gel red (10.000 x).

*f) Síntesis de cADN.*

El cADN se sintetizó a partir de 500 ng de ARN/reacción, utilizando el RevertAid First Strand cADN Kit (Fermentas), siguiendo el protocolo del fabricante.

*g) Reverse transcription polimerase chain reaction (RT-PCR)*

Para la amplificación del fragmento transcrito se probaron distintas condiciones variando el número de ciclos (30-35 ciclos), temperaturas (52-55° C) y concentraciones de cADN (2.5; 5; 12.5 ng/reaccion).

Se utilizó como referencia de la expresión relativa de los MYB, el gen tubulina de *L. japonicus* con el par de oligonucleótidos Lj TUB FORWARD (5'AGGAAGGCTTTCTTGCATTG 3') y Lj TUB REVERSO (5' TCCTCCTGAACTTCATCCTCA 3') (Fragmento esperado de 170 pb) (Teakle *et al.*, 2010).

Las reacciones fueron realizadas con el termociclador MyCycler de Biorad y se realizaron con un volumen final de 25µL.

Tabla 4: Descripción de los oligonucleótidos utilizados para realizar la RT-PCR.

Nombre	Secuencia	Objetivo
MYB102_3_1420F y MYB102_2_1420R	5'TACAAGCAGAGGCCATTCAAC 3' 5'GGAACCACATGGGAAGAAGA 3'	Amplificar fragmento del transcrito de MYB102_1420 en <i>L. tenuis</i> .
MYB102_3_950F y MYB102_2_950R	5'TGGAAGGGTAGTGAATCCAAG 3' 5'GAAGATGAAGGCGTGGGAAGA 3'	Amplificar fragmento del transcrito de MYB102_950 en <i>L. tenuis</i> .

Tabla 5: Componentes de la reacción de RT-PCR para análisis de la expresión de los genes MYB en *L. tenuis*.

	Concentración de la Solución stock	Concentración en cada reacción
Buffer taq	10x	1X
Mgcl2	25 mM	1.5 mM
Dntps	10 mM	0.2 mM
Primer forward	10 mM	0.2 mM
Primer reverso	10 mM	0.2 mM
Taq Polimerasa	5U	1U

Tabla 6: Condiciones de RT-PCR para análisis de la expresión de los genes MYB en *L. tenuis*.

Procedimiento	Temperatura (°C)	Tiempo (m)	Numero de Ciclos
Etapas de Desnaturalización	94	1	1
Etapas de Desnaturalización	94	00:30	30 -35*
Primer Annealing	55	00:30	30-35*
Primer Extensión	72	00:45	30-35*
Elongación final	72	5	1

\*Se refiere a la cantidad de veces que se repiten las etapas de desnaturalización, Annealing y extensión.

Los productos de la amplificación por RT-PCR fueron observados mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (10000x), y a 130 V, por 45 minutos. Como control negativo se realizó una reacción de PCR sin cADN, con agua y para estimar el tamaño de los fragmentos se incluyó el marcador molecular Gene Ruler (Fermentas).

Los fragmentos amplificados fueron purificados, utilizando el GeneJET PCR Purification Kit, siguiendo el protocolo del fabricante (Fermentas), para posterior envío a secuenciación. Se utilizó el gen tubulina como referencia para la cuantificación de la expresión. La expresión se midió utilizando el programa GelQuantNET.

#### *h) Secuenciación y análisis bioinformático de las secuencias.*

Las muestras tanto de ADN como cADN, fueron cuantificadas, purificadas y enviadas para su secuenciación, al Departamento de Ecología, Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias reportadas en el Banco de genes (GenBank) del Centro Nacional para la información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nih.gov/>), empleando el programa tBLASTx de dicho sitio para conocer el porcentaje de identidad genética existente con secuencias ya reportadas y depositadas en el GenBank.

### 3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### a) Identificación *in silico* de genes de la familia MYB asociados al estrés abiótico y diseño de oligonucleótidos para su amplificación en *L. tenuis*.

Una de las familias de factores de transcripción relacionadas con el estrés salino es la de los MYB, descrita en especies modelos como *A. thaliana* y *O. sativa*, así como en plantas de importancia agronómica, como *Glycine max* (Fujita *et al.*, 2011). Esta información se utilizó como punto de partida para la búsqueda de genes de esta familia potencialmente involucrados en el estrés salino en *L. tenuis*, nuestra especie en estudio. La búsqueda fue realizada basándose en similitud de secuencia génica, función y análisis de expresión en condiciones de estrés.

A partir del gen AT4G21440, encontrado en *A. thaliana*, que codifica para el MYB 102 (Fujita *et al.*, 2011), y utilizando el programa en línea eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), se verificó la expresión de este gen en raíces de *Arabidopsis*. El gen AT4G21440 presentó mayor expresión en raíces bajo condición de estrés salino, a partir de las 3 horas y llega a su máximo aumento de expresión a las 24 horas, indicando un posible rol en la respuesta al estrés salino en esta especie, en este experimento.

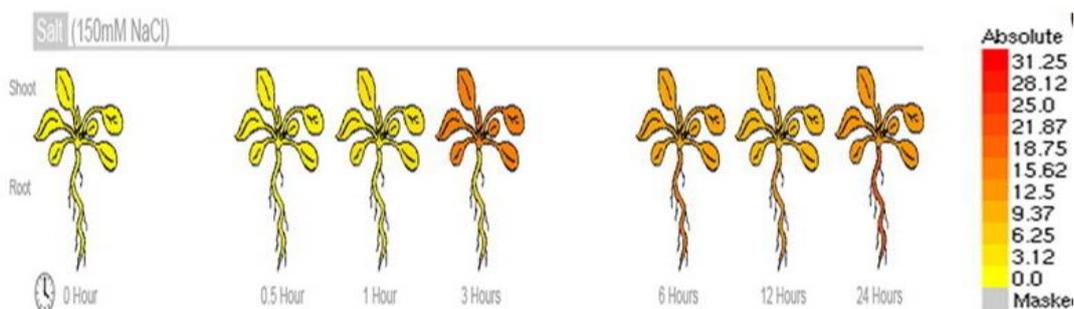


Figura 2: Expresión del gen AT4G21440 de *A. thaliana*, en presencia de 150 mM de NaCl, de acuerdo con el programa eFP Browser.

Teniendo en cuenta estos datos, fue realizado un BLASTN contra el banco de genes de *L. japonicus*, especie más próxima a la especie que se desea estudiar, resultando en tres secuencias similares al MYB 102 de *A. thaliana*.

>chr3.CM0711.160.r2.d + phase: 0  
 ATGGGAAGAGCACCTTGTGTGACAACAAAAGTGGACTCAAAAAAGGTCCATGGACACCTGAAGAAGATAACTTGCTCATCAACTATATTCA  
 AACTCATGGACCTGGAAATTGGCGAAATCTCCAAAAAATGCTGGTCTGCAAAGATGTGGCAAAGAGCTGTCGCCTTCGATGGACAATTACC  
 TGAGGCTGATATCAGAAGAGGAAGATTTTCTTTGAAGAAGAAGAGACCATCAITCAGCTACACAGTGTCTTAGGGAAACAAGTGGTCTGCT  
 ATAGCGGCTCGATTGCCAGGAAGAACAGACAATGAAATCAAGAACTACTGGAACACCCACATCAGAAAAGAGACTACTCCGAATGGGAATTG  
 ATCCTGTAACCTACGCTCCACGCCTGGATCTTCTTGACATGTCCAATGTTCTCAGAACAGCATTAACTAACCCAGCGTTTCTGAACCTTCAAG  
 GCTTGTGGTGTCAATCGTTGGTGAACCTGAATTGTTAAAGTAGCAGCTACTGCCACTTGTATCTTTAAAGAATGACAACACAGGCT  
 TGATTTACAAAAATCCACAACAAATCAATGGTATCATGAATTGTCATCAGGTGCAGAACCAAGTTGTCACCCAGAGTTTACAACGAGCCAG  
 CTCAAACACCGATTCAAAGCAACAACATGGCGATGAACATGAGCAGTTCAAAGTTCTCCGGAGAATTCAAATTCAGATTAACCCCTTCGTATTT  
 GGTGACGGTTTGGTACCTCAACAATACCAAGTTGATAATTTGCAACAGAACCCTGGAATCTGTGTATCAAAACATGATGGGATATGACTCAGT  
 TCTGTCAACGCCTTATCTACCCAGGAACCACGACGCTAAATTCACCGGCCAACTTTGCGAATAGCAGCGCAGAGGAAGAGGGGACACTT  
 ATTGCAGCGACATGTTCAAATTCGAGATTCTGAGAGTCTAGACATTAGTGACTTCTTGTA

>chr3.CM0590.950.r2.m + phase: 0  
 ATGGCCAAGTCGAATTCGGTGAAAAGAATGGAGTGAAGAAAAGGTCCATGGACTCCAGAGGAAGATCAGAAAACCTCGTTCGATTACATTAGA  
 AACATGGGCATGGGAAATGGAGAACCTTCCCAAGAATGCAGGACTTAAAGATGTGGAAAGAGTTCGCGGCTTCGCTGGCTAACTATTT  
 GAGGGCAGATATAAAGAGGGGGAAATTTCTTTAGAAGAAGAAGGCCATCCTCAATTACACAGTGTATTGGGTAACAAATGGTCTACA  
 ATTGTGCCAACTTGCAGGGAAGAACAGACAATGAGATCAAGAATTATTGGAACACCCACATCAAAAAAAGCTTTTGAAGATGGGGCTTG  
 ATCCAGTACTCACTCCACGCCTTGATGTCCTACAATTAGCTTCCATTTCTAAACTCATCTTTATACAATAATTCAGCCAGTTTAAACAACC  
 TGGTCTTTTTGGAATGAAAGGGTAGTGAATCCAAGCCAGCTTCACTAAATTTAGTCAACTCTTCTATCATGTCAAAATACAAACCA  
 AGATGTTTGAATACTAATAATTACCAGCAAAATCAACTTGGTGGGAGCACACAATGGCAACATCAAACACAATGCTCCCAACCAATGCAGC  
 TTGATAATTTCTATCCATGCCCTTCCAACCAACCAGGTCAATGAAGAAAACCAATTGTAATCATCTAATCCATTGATATATTGGAACCAACCC  
 AGTCTATGAAAACCAACTTAGAGCATCAAATACTCCAATTGCTAGTCTTTTAAACCATCAAAACCAATGCAAAATTTGTTGAGTACAATG  
 GAGGTTTACATCGAATCGAAAACGGCCTGAACCATCATCAGCTACACAATCTTCTCTTTCGCTTTTATGTAATAGCGAGGGAATGCCGAATT  
 TCAATTTAAGCTCACTTTTATCTTCCACGCCTTCACTTCTAGCCCTAGTACCTTGAATTCATCATCTTCCACAACATTTGTCAAAGGAACCA  
 TGAAGATGAAAGAGACACTTACGGCAACATGTTATGATAAACATTTCAAATGGCTTGAATGACTCTGGACTTTTGTGA

>chr2.CM0124.1420.r2.m - phase: 0  
 ATGGGAAGATCTCCATGCTGTGATGAAAGTGGTTTGAAGAAAAGTCCCTGGACACCAGAAGAAGATCACAAGCTTGTAACTACATTCAAAA  
 ACATGGACATGCTAGCTGGAGAGCACTTCCAAAACCTGCAAGACTCAACAGGTGTGGCAAAGCTGCAGGTTAAGGTGGACAAACTACTTG  
 AGGCCTGACATTAAGAGAGGCAAGTTTCCCAAGAAGAAGAACAACAATTTTGACCTCCATGCCATCCTTGGGAACAAATGGTCCACGAT  
 TGCAAGCCACTTCCGGGGAGGACAGATAATGAGATAAAGAAATTTTGAACAACCTCATCTGAAGAAGAAGTTGATTCAAATGGGTTATGATC  
 CAATGACACACCAGCCTCGAACTGATATCTTCTCAGGCTTGTCCATCTCATAGCCTTGGCCAATTTGAAACAACCTTGAACCATCAGCTGC  
 CATGGGAACAAAATGCTCTGAGATTACAAGCAGAGGCCAATCAACACTTACAACAACAACAGCACCTCCTGCAGCCATTAATAAAGTGAAG  
 GCTGAGCCTAACACAACAAAAGCATAAACACTATTAATCATCTTTCAATTGATCACTACTTTGAAAACACCATCTCATCTTTTGAAGTGGGA  
 AATCTTCAATTTATGAATGATTTTCTATCCCTTCTCTCCAATGCCTGAATTGAAAACACCGCCTTGTCTTCTATGAACCGTCATTAAGTG  
 AGGACATGATCCAAGCCCTCATGATGAATGCAAAGCGTTTTGTGATGAAGATGGTCTCCCAATTTCTCAGTGGCTTCTTCTCATGCTCTGCCT  
 CATCTTCTCCATGTGGTTCCAGTACCTGTGACAGAGATTTCAATGACTAATAATAATATGGCTGATAATTGCAGTCTTCTTCTATTGGCC  
 TGAGCTCTGTAGAGGACCTATGTTCAATGGGATTGCTTTAGATTGA

Figura 3: Secuencias génicas de *L. japonicus*.

Para seleccionar las secuencias con mayor grado de similitud entre si se realizó un alineamiento múltiple en el CLUSTALW entre las secuencias de *L. japonicus*, una obtenida en el banco de *O. sativa*, y AT4G21440 de *A. thaliana*.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
AtMYB102ptn_AT4G21440.1_ MARSPCCE-KNGLKKG PWTSEEDQKLVVDYIQKHGYGNWRTLFPKNAGLQRC 49
chr3.CM0711.160.r2.d MGRAPCCDNKSGLKKGPWTPEEDNLLINYIQTHGPGNWRNLFPKNAGLQRC 50
chr3.CM0590.950.r2.m MAKSNSGE-KNGVKKGPWTPEEDQKLVVDYIQKHGHGKWRTLFPKNAGLKRC 49
OsMYB102like MGRAPCCE-KSGLKKG PWTPEEDEKLIAYIKEHGGQGNWRTLFPKNAGLSRC 49
chr2.CM0124.1420.r2.m MGRSPCCD-ESGLKKG PWTPEEDHKLVVNYIQKHGHASWRALPKLAGLNRC 49
*.:. : :.*:*****.***. *: **: ** ..** *** **.*

AtMYB102ptn_AT4G21440.1_ GKSCRLRWTNYLRPDIKRGFRSFEEETIIQLHSVFLGNKWSAIAARLPGR 99
chr3.CM0711.160.r2.d GKSCRLRWTNYLRPDIRRGRFSFEEETIIQLHSVFLGNKWSAIAARLPGR 100
chr3.CM0590.950.r2.m GKSCRLRWANYLRPDIKRGKFSLEEEETIIQLHSVFLGNKWSAIAANLQGR 99
OsMYB102like GKSCRLRWTNYLRPDIKRGFRSFEEETIIQLHSVFLGNKWSAIAARLPGR 99
chr2.CM0124.1420.r2.m GKSCRLRWTNYLRPDIKRGKFSQEEETIILDHAILGNKWSAIAARLPGR 99
*****:*****:*** ** *:** ** :*:*:*****:***:.* **

AtMYB102ptn_AT4G21440.1_ TDNEIKNFWNTHIRKLLRMGIDPVTHSPRLDLLDISSILA-SSLYNSS 148
chr3.CM0711.160.r2.d TDNEIKNYWNTHIRKLLRMGIDPVTHAPRLDLLDMSNVL-R-TALN--P 147
chr3.CM0590.950.r2.m TDNEIKNYWNTHIRKLLRMGIDPVTHPRLDVQLASILN-SSLYNN-S 147
OsMYB102like TDNEIKNYWNTHIRKLLRMGIDPVTHAPRLDLLDLSLKPAAAAAYP 149
chr2.CM0124.1420.r2.m TDNEIKNFWNTHLKKKLIQMGYDFMTHQPRTDIFSGLSHLI----- 140
*****:*****:***:*** ** *:** ** *:. . *

AtMYB102ptn_AT4G21440.1_ HHMNSRLMMDTNRHHQHPVNP---EILKLATSLFSQNNQNLVVDH 195
chr3.CM0711.160.r2.d AFLNLQGLFG-----AQSLVNP---ELLKLAATATLLSLKND---NT 183
chr3.CM0590.950.r2.m AQFNPNPGLFG-----MERVVNPSQLQLLNLTLLSCQNTNQDWWNT 189
OsMYB102like TQADLDTLRA-----LEPLAGYP--DLLRLASAILPAATTTG-AAAA 188
chr2.CM0124.1420.r2.m ALANLQQLN-----HQLPWEQ--NALRLQAEAIQHLQQQQLLQP 179
: * . : : ** :

AtMYB102ptn_AT4G21440.1_ DSRTQEKQ----IVYSQIGVNVQYQTNQ-----YFENITQE----- 227
chr3.CM0711.160.r2.d GLISQNPQ----QINGIMNCHQVQN-----QVVPPE----- 210
chr3.CM0590.950.r2.m NNYQQNLGGSTQWQHQTQCSQPMQLDNSIHAFQPNQVNEENHCTTSNPL 239
OsMYB102like AAAEQAQLFLPWLQAQMAQQQQVTFPP-PPPPQAAATEQFLQATSTAC 237
chr2.CM0124.1420.r2.m LLITEAEP-----NTTKSINTINHLS-----IDHYFEN----- 207
: :

AtMYB102ptn_AT4G21440.1_ --LQSSMPFPFNARQFNNDHDFNGFGE-QNLVSTSTTSVQDCYNPSFN 274
chr3.CM0711.160.r2.d --FTTSQLQTPIQS---NNMAMNMSSSSPENSNSINPSYFGDGLVP--Q 253
chr3.CM0590.950.r2.m HILEPPQLMKTNLEHQISPIASFNHNQNPQNLLQYNGGFTSNRKRPEPS 289
OsMYB102like HQMPGLVHASPQQLAQQPDHMAAATCHRRGAVQHPSYDNQLDYVPALM 287
chr2.CM0124.1420.r2.m -----TISSFGSGLQFMNDFSIFFSPMPELKTPPCSSYEPSSLEDMI 250
. .

AtMYB102ptn_AT4G21440.1_ DYSSSNFVLDPSY---SDQSFNFANSVLNTPSSSPSPT-TLNSSY-INSS 319
chr3.CM0711.160.r2.d QYQVDNLQQNLES---VYQNMVGYDVSVLSTPLSTPGTT-TLNSP--ANFA 297
chr3.CM0590.950.r2.m SATQSFSSLLCNS---EGMPNFNLSLLSSTPSSSPS-TLNSSSSTTFV 335
OsMYB102like QMASDASNLQQWSSTVSSSNHNHNVNSGVSTPLSSPAAAGQINSSFTTTT 337
chr2.CM0124.1420.r2.m QAPHDECKAFKDE---DGPPNSQWLPSCSASSSSHVVPVPTIEISLTNNN 297
. . . . . : : * : . : . .

AtMYB102ptn_AT4G21440.1_ SC--STEDEIESYCSNLMKFDIPDFLDVNGFII 350
chr3.CM0711.160.r2.d NS--SAEEERDTYCSDMFKFEIPESLDISDFL- 327
chr3.CM0590.950.r2.m KG--TNERDRTYG-NMFMYNISNGLNDSGLL- 364
OsMYB102like TYGLNASGDVDDAG-LLINMHSELLEDVSDYM- 368
chr2.CM0124.1420.r2.m MA--DNCTASSIWPELLEDPMFNGLD---- 324
. . . . . : : : : :

```

Figura 4: Alineamiento múltiple entre las secuencias de *L. japonicus*, *O. sativa* y *A. thaliana*

Se hicieron alineamientos múltiples y de a pares entre las secuencias y a partir de los resultados se seleccionaron las siguientes secuencias del banco de *L. japonicus* para el diseño de los oligonucleótidos: chr2.CM0124.1420.r2 y chr3.CM0590.950.r2.m.

A partir de los resultados del análisis bioinformático, fueron diseñados oligonucleótidos degenerados y específicos para amplificación de estas secuencias en *L. tenuis*. El oligonucleótido MYB102\_1F degenerado se diseñó con el objetivo de amplificar fragmentos tanto genómicos como transcritos de

MYB102\_1420 y MYB 102\_950r. Para el oligonucleótido MYB102\_2\_1420R el objetivo fue amplificar fragmento genómico del MYB102 like de *L. japonicus* en *L. tenuis* (fragmento esperado 810 pb), mientras que para MYB102\_3\_1420F la idea del diseño fue que amplifique el fragmento del transcrito del MYB102 like de *L. japonicus* en *L. tenuis* junto con MYB102\_2\_1420R (fragmento esperado 370 pb).

Para MYB102\_2\_950rR se siguieron los mismos criterios, en este caso amplificar fragmento genómico del MYB like de *L. japonicus* en *L. tenuis* (fragmento esperado 1095 pb), mientras que para MYB102\_3\_950rF el objetivo fue amplificar fragmento del transcrito del MYB like de *L. japonicus* en *L. tenuis* junto con MYB102\_2\_950rR (fragmento esperado 490 pb).

Tabla 7: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de genes MYB en *L. tenuis*.

NOMBRE	SECUENCIA	GENE ID
MYB102_1F	5' TCCWTGGACWCCAGARGAAGA 3'	chr3.CM0590.950.r2.m y chr2.CM0124.1420.r2.m
MYB102_2_1420R	5'GGAACCAATGGGAAGAAGA 3'	chr2.CM0124.1420.r2.m
MYB102_3_1420F	5' TACAAGCAGAGGCCATTCAAC 3'	chr2.CM0124.1420.r2.m
MYB102_2_950rR	5' GAAGATGAAGGCGTGGGAAGA 3'	chr3.CM0590.950.r2.m
MYB102_3_950rF	5' TGGAAAGGGTAGTGAATCCAAG 3'	chr3.CM0590.950.r2.m

b) *Extracción de ADN y amplificación de MYB en L. tenuis por PCR.*

Una vez confirmada la calidad del ADN mediante electroforesis y cuantificación en el Nanodrop, fueron realizadas PCRs para amplificar los fragmentos genómicos de MYB102\_1420 y MYB102\_950, utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1.



Figura 5: Calidad del ADN de *L. tenuis*.

Los resultados observados en el gel de agarosa muestran amplificación de un fragmento de aproximadamente 800 pb tanto en *L. tenuis* tolerante (T) como susceptible (S) utilizando los oligonucleótidos MYB102\_1F y MYB102\_2\_1420R (M1) amplificando a una temperatura de fijación de 55°C, mientras que a una

temperatura de fijación más alta 58°C, solo la muestra de ADN proveniente de la FMH tolerante presentó producto de amplificación.

Para el MYB\_102\_950 se observó amplificación de un fragmento de aproximadamente 1000 pb tanto en *L. tenuis* tolerante como susceptible utilizando los oligonucleótidos MYB102\_IF y MYB102\_2\_950R (M2) amplificando a una temperatura de fijación de 55°C, mientras que a una temperatura mayor no se observó amplificación.

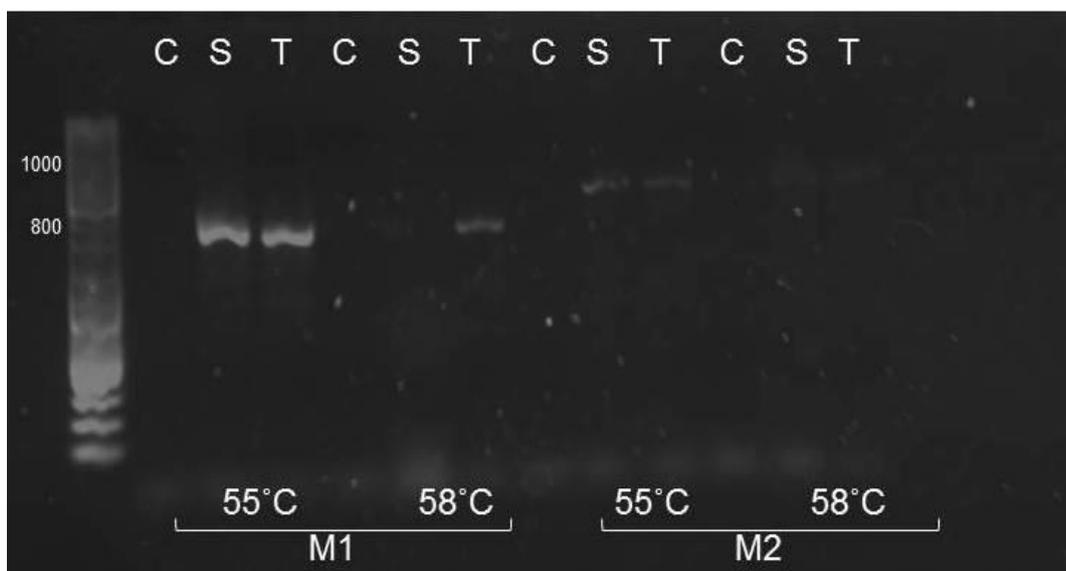
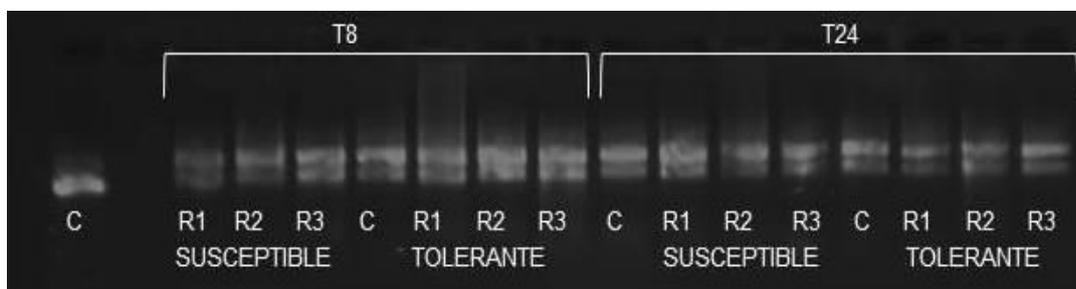


Figura 6: Amplificación de fragmentos genómicos de MYB en *L. tenuis*.

Considerando estos resultados, fue realizada una nueva reacción de PCR, con una mayor concentración de ADN molde, a una temperatura de fijación de 55°C, para purificación del producto amplificado y envió a secuenciación del mismo para análisis de la secuencia.

*c) Extracción de ARN y amplificación por RT-PCR.*

El ARN extraído de raíces de *L. tenuis* fue cuantificado mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000) y su integridad fue comprobada mediante gel de agarosa.



A partir del cADN sintetizado se realizaron RT-PCRs en distintas condiciones, variando el número de ciclos de la reacción (30 y 35 ciclos), y diferentes

concentraciones de cADN. Se utilizó el gen tubulina como gen de referencia para la cuantificación de la expresión relativa.

Se observó a los 30 ciclos amplificación en el tratamiento de 8 horas en *L. tenuis* tolerante y en el tratamiento de 24 horas en *L. tenuis* tolerante y susceptible, como también en los controles de ambos para MYB102\_1420.

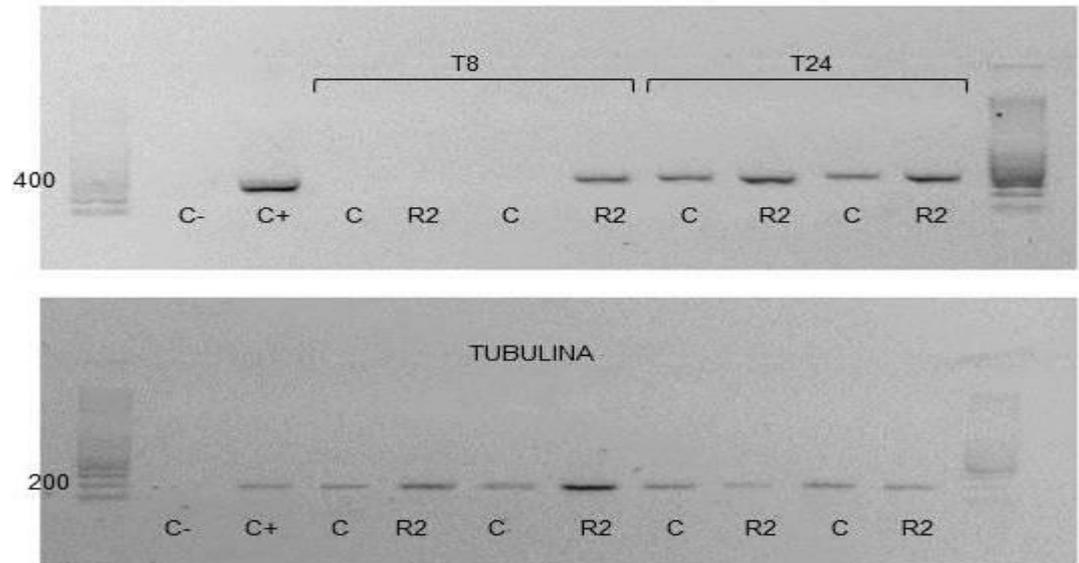


Figura 8: Amplificación por RT-PCR MYB 102-1420/TUBULINA

Mientras que a los 35 ciclos y manteniendo la misma concentración de cADN se observó para MYB102\_950r amplificación en el tratamiento de 8 horas en *L. tenuis* tolerante, tanto en el tratamiento como en el control, y en la susceptible sólo en el tratamiento. A las 24 horas se observó amplificación en ambas FMH tanto en el tratamiento como en el control.

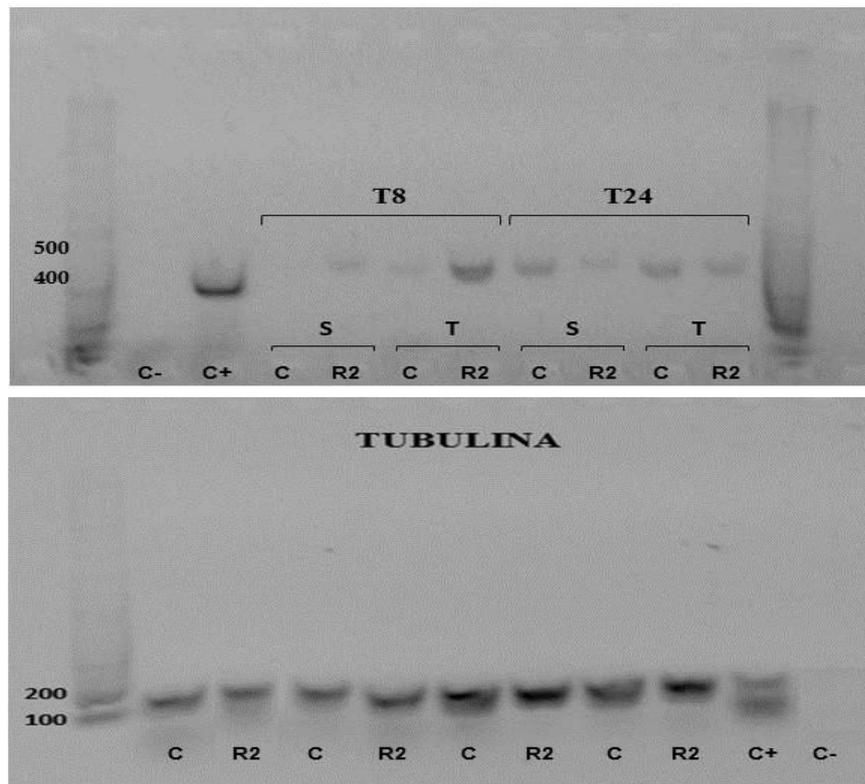


Figura 9: Amplificación por RT-PCR MYB 102 950r/TUBULINA

Para MYB102\_1420 se observó amplificación en el tratamiento de 8 horas solo de *L. tenuis* tolerante. Tanto a los 30 como 35 ciclos se observó amplificación de un fragmento de entre 300 y 400 pb coincidiendo con el tamaño de los fragmentos de la secuencia de *L. japonicus*.

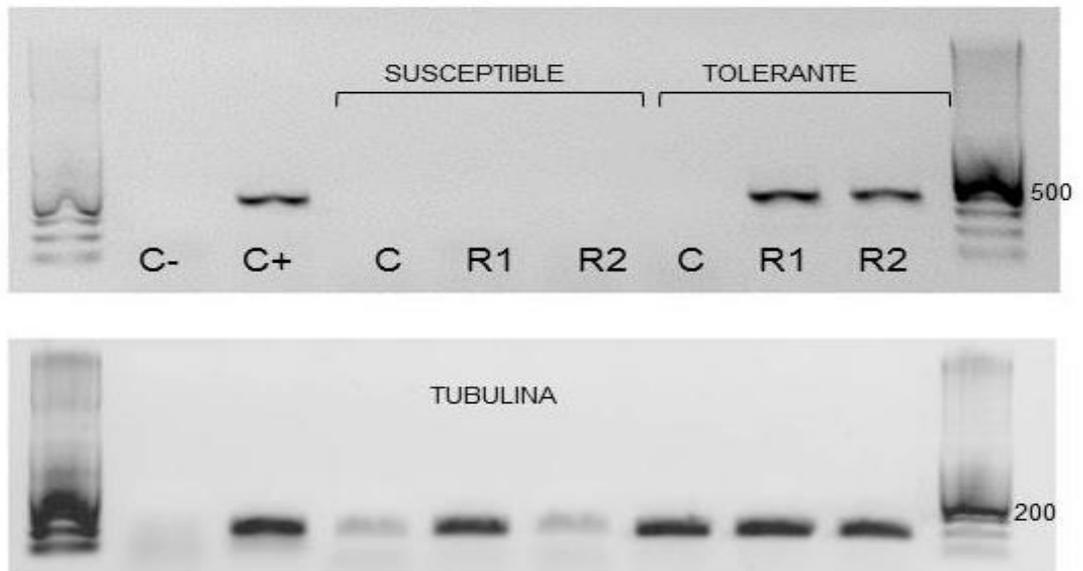


Figura 10: Amplificación por RT-PCR MYB 102 1420/TUB T8

Con respecto a la expresión relativa de estos genes en los distintos tratamientos y tiempos, en el gen MYB 102\_1420 se observó expresión en la FMH susceptible a las 24 horas tanto en el control como en los tratamientos con solución salina, presentando estas una sobreexpresión con respecto al control. A las 8 horas no se observó expresión en el control ni en los tratamientos. De acuerdo con lo observado, hay un aumento en la expresión de las 8 a las 24 horas. En la FMH tolerante se observó a las 24 horas una sobreexpresión del tratamiento con respecto al control. En cuanto a las 8 horas se observó expresión en el tratamiento no así en el control.

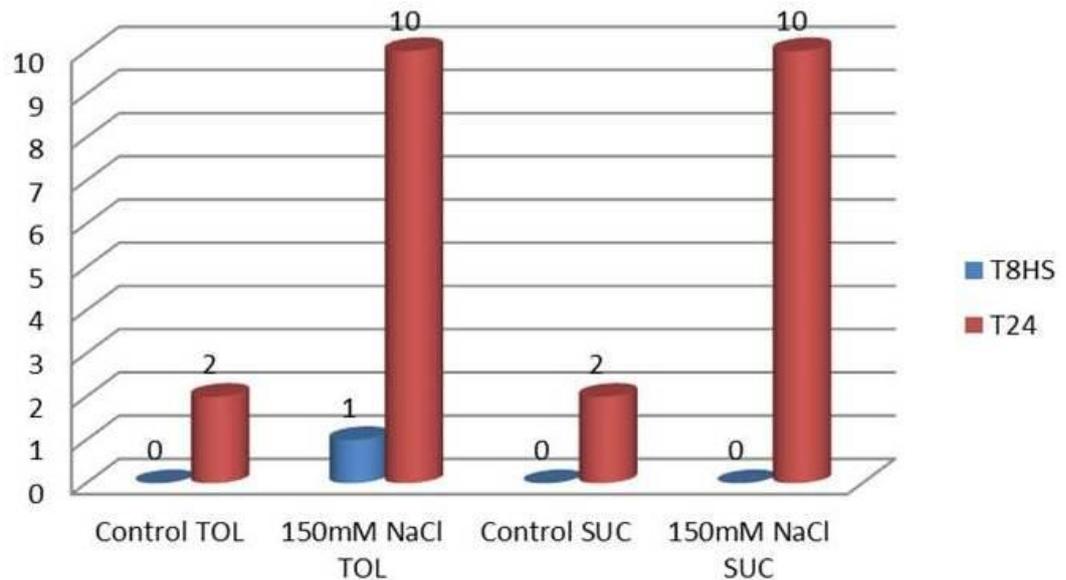


Figura 11: Expresión relativa de MYB102\_1420 en *L. tenuis*.

\*El 10 fue colocado arbitrariamente en la máxima expresión relativa del gen y los demás valores se calcularon en base a este. El 0 representa la nula expresión relativa.

Si comparamos ambas FMH la tendencia es la misma, es decir aumenta su expresión de 8 a 24 horas. En cuanto a los valores son prácticamente similares en ambas FMH y la diferencia radica que en el tratamiento de 8 horas las tolerantes si tuvieron expresión respecto de las susceptibles.

Analizando los resultados podemos decir que, en las condiciones de este experimento, hubo expresión del MYB 102\_1420 en condiciones de estrés salino. Se observó sobreexpresión del tratamiento a las 24 horas respecto al control y a las 8 horas casi no hubo expresión. Para poder confirmar si realmente hay una alteración de la expresión en distintas condiciones habría que repetir los experimentos, ya que los resultados son preliminares.

Para el MYB 102\_950r, se observó en la FMH susceptible expresión a las 24 horas, mostrando una leve sobreexpresión del control con respecto al tratamiento. En el tiempo 8 horas se observó lo inverso, mostrando una expresión mayor en plantas tratadas respecto al control. Con respecto a la FMH tolerante, se observó expresión a las 8 y a las 24 horas en plantas tratadas y en los controles. Dentro de las 24 horas se observa una sobreexpresión de las plantas tratadas con respecto al control, lo mismo sucede a las 8 horas.

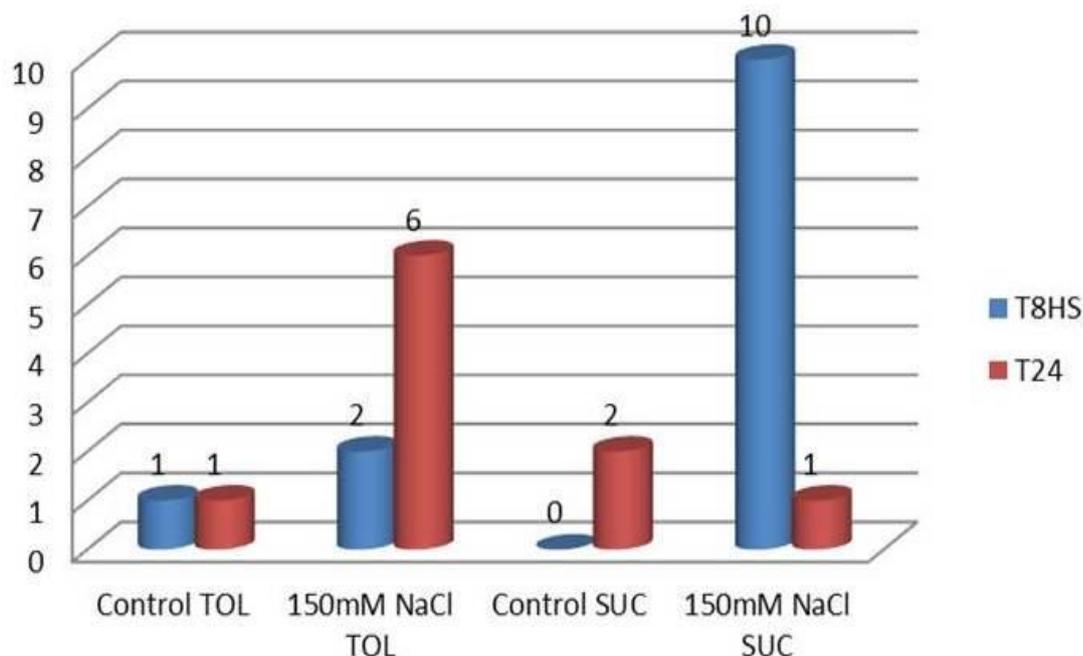


Figura 12: Expresión relativa de MYB102\_950r en *L. tenuis*.

\*El 10 fue colocado arbitrariamente en la máxima expresión relativa del gen y los demás valores se calcularon en base a este. El 0 representa la nula expresión relativa.

Al comparar ambas FMH, observamos las siguientes diferencias, en la FMH susceptible a las 24 horas, la expresión en el control es mayor que en las plantas tratadas mientras que para la FMH tolerantes la relación es inversa. A las 8 horas, en ambas FMH se observa una sobreexpresión de las plantas tratadas con respecto al control, pero en las susceptibles la diferencia es más marcada.

d) *Análisis de las secuencias.*

Para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados y evaluación de la secuencia amplificada por PCR y RT-PCR, fueron enviadas muestras a secuenciación. Las condiciones de las muestras y los oligonucleótidos enviados se describen en la siguiente tabla:

Tabla 8: Descripción de los fragmentos de PCR Y RT-PCR purificados y enviados a secuenciar.

TEMPLADOS				PRIMER	
Muestra	Tipo de muestra	Tamaño (pb)	Cuantificación	Primer	Tm
M1 ADN	PCR	810	20 ng/ul	1420 R	59,9
M2 ADN	PCR	1095	30 ng/ul	950 R	60,34
M1cADN TOL	RT-PCR	370	10 ng/ul	1420 F	60,26
M2 cADN TOL	RT-PCR	490	6,8 ng/ul	950 F	60,34

La muestra de PCR para el MYB 102\_1420 arrojó como resultado de la secuenciación un fragmento de 810 pb, que presentó similitud a un FT tipo MYB de *Populus trichocarpa* y de *Glycine max* cuando se realizó un tBLASTx contra el banco de secuencias del NCBI, lo cual indicaría que los oligonucleótidos son específicos y amplifican un fragmento en *L. tenuis* que presenta similitud al MYB 102\_1420 de *L. japonicus*.

Tabla 9: Resultado del tBLASTx realizado con la secuencia traducida contra el banco de proteínas del NCBI.

Origen	Descripción	E-value	ID (%)	Acceso en NCBI
<i>Populus trichocarpa</i>	<i>Populus trichocarpa</i> predicted protein (MYB032), mRNA	5e-18	31/39(79%) 11/23(48%)	<a href="#">XM_002310524.1</a>
<i>Glycine max</i>	<i>Glycine max</i> transcription factor MYB39-like(LOC 100781670), mRNA	5e-17	17/19(89%) 17/20(85%)	<a href="#">XM_003520090.1</a>

En cuanto a las muestras amplificadas por RT-PCR, para ambos genes, y la muestra amplificada por PCR para MYB102\_950r, la calidad de la secuencia no fue suficiente para su análisis.

#### **4- CONCLUSIONES**

A partir del gen AT4G21440, encontrado en *A. thaliana*, que codifica para el MYB 102 (Fujita *et al.*, 2011) y teniendo en cuenta el estudio de Sánchez *et al.*, (2008) en el que reporta la presencia de un FT tipo MYB en *L. japonicus* fue realizado un BLASTN contra el banco de genes de *L. japonicus*, especie más próxima a la especie que se desea estudiar, resultando en tres secuencias similares al MYB 102 de *A. thaliana*, de las cuales dos fueron elegidas para elaborar los oligonucleótidos utilizados para amplificación de los posibles MYB en *L. tenuis*. De las secuencias amplificadas enviadas a secuenciación, para el MYB 102\_1420 se obtuvo como resultado de la secuencia traducida una similitud con un FT tipo MYB en *Populus trichocarpa* y *Glycine max* pudiendo de esta manera concluir que los oligonucleótidos son específicos y corresponden a una secuencia tipo MYB en *L. tenuis*.

Para evaluar la posible relación de los FT tipo MYB con el estrés salino, se realizó un análisis de la expresión relativa de estos bajo condiciones de salinidad. Se pudo observar expresión en condiciones normales de crecimiento como en condiciones de estrés salino, por lo que podríamos inferir que el gen no solo está relacionado con la respuesta al estrés salino sino a otros factores. Bajo condiciones de estrés salino hubo expresión del gen tipo MYB en ambas FMH, observándose una mayor expresión en la tolerante, pudiendo de esta manera suponer una relación entre la expresión del gen y la respuesta adaptativa al estrés salino en *L. tenuis*.

## 5- BIBLIOGRAFIA

ARRATIA, J.; AGUIRRE, J. 2013. Los factores de transcripción tipo MYB, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes, Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 16 (2):98-108.

BARKLA, B.J.; VERA-ESTRELLA, R; BALDERAS, E.; PANTOJA, O. 2007. Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. En Arias, C. Una ventana al que hacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM, México, 399 p.

DUBOS, C.; STRAKE, R.; GROTEWOLD, E.; WEISSHAAR, B.; MARTIN, C.; LEPINIEC, L. 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis, Trends in Plant Science, 10(15): 573-581.

ESCARAY, F.J.; MENENDEZ, A.B.; GÁRRIZ, A., PIECKENSTAIN, F.L.; ESTRELLA, M.J.; CASTAGNO, L.N.; CARRASCO, P., SANJUÁN, J.; RUIZ, O. 2012. Ecological and agronomic importance of the plant genus Lotus. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. Plant science: an international journal of experimental plant biology, 182:121-33.

FUJITA Y.; FUJITA M.; SHINOSAKI K. Y YAMAGUCHU:SHINOSAKI K. 2011. ABA-mediated transcripcional regulation in response to osmotic stress in plants. Journal of Plant Reserch, 142 (4): 509-525.

FRANCO, M. 2011. Estudio de la variabilidad genética en familias de medios hermanos de *L. tenuis* sometido a estrés salino. Tesis M. Sc. (en elaboración). Rosario, Argentina, Universidad Nacional de Rosario.

LEIDI, E.O.; PARDO, J.M. 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino: que hay de nuevo, Revista de investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias, Rosario, Argentina, Universidad Nacional de Rosario, 2: 1-11.

LICHTENTHALER, H. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. J Plant Physiol, 148: 4-14.

PAZIN, M.J.; KADONAGA, J.T. 1997.What's up and down with histone deacetylation and transcription?. Cell, 89: 325-328.

RAHAIE, M.; XUE, G.; NAGHAVI, M.; ALIZADEH, H.; SCHENK, P. 2010. A MYB gene from wheat (*Triticum aestivum* L.) is up-regulated during salt and drought stresses and differentially regulated between salt-tolerant and sensitive genotypes, Plant Cell Rep, 29:835-844.

SANCHEZ, D.H.; LIPPOLD, F.; REDESTING, H.; HANNAH, M.A.; ERBAN, A.; KRAMER, U.; KOPKA, J.; UDVARDI, M. 2008. Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume lotus japonicas, The Plant Journal, 53: 973-987.

SCANDALIOS, J. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *J Med Biol Res* 38: 995-1014.

TEAKLE, N. L.; AMTMANN, A.; REAL, D.; COLMER, T. D. 2010. *Lotus tenuis* tolerates combined salinity and waterlogging: maintaining O<sub>2</sub> transport to roots and expression of an NHX1-like gene contribute to regulation of Na<sup>+</sup> transport. *Physiologia plantarum*. 4 (139): 358-374.

VIGNOLO, O.R.; FERNANDEZ, O.N; MACEIRA, N.O. 1999. Flooding tolerance in five populations of *Lotus glaber* Mill. (Syn. *Lotus tenuis* Waldst.et Kit.). *Australian. J. Agric. Res*, 50: 555-559.