

Pérez, Andrea S.

Identificación y análisis de factores de transcripción tipo DREB en Lotus spp. Y su relación con la respuesta al estrés salino

**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:

Pérez, A. S. 2014. Identificación y análisis de factores de transcripción tipo DREB en Lotus spp. y su relación con la respuesta al estrés salino [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/identificacion-analisis-factores-dreb.pdf> [Fecha de consulta:.....]

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA
ARGENTINA**

Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería en Producción Agropecuaria

Identificación y análisis de factores de transcripción tipo
DREB en *Lotus spp.* y su relación con la respuesta al estrés
salino

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

Autor: Pérez, Andrea S.

Profesores Tutor: Érica Duarte Silveira, MSc., Ph.D.
Profesor Co-Tutor: María Luz Zapiola, MSc., Ph.D.

Fecha: 2014

RESUMEN

En Argentina, una de las zonas de cría de ganado vacuno más importante es la Pampa Deprimida, la cual posee gran parte de los suelos con problemas de salinidad. Una de las especies naturalizada y mejor adaptada a condiciones de salinidad, importante por aumentar la productividad y calidad de los campos naturales, es *Lotus tenuis*.

La salinidad es uno de los factores abióticos que más afecta el crecimiento y productividad de los cultivos. Un mecanismo importante que poseen las plantas en respuesta a condiciones de estrés, es la regulación de la expresión génica vía factores de transcripción (FT). Los FT actúan controlando las respuestas adaptativas, y por esto es importante comprender los genes involucrados en estas respuestas. Una de las familias más importantes de FT relacionados con la respuesta a estrés abiótico es la AP2/ERF (Ethylene responsive factors). Dentro de esta familia, se encuentra la subfamilia DREB (Dehydration responsive element binding), la cual responde a estrés por salinidad, según estudios realizados en plantas modelo y en distintas especies de interés agronómico. El objetivo de este trabajo es identificar factores de transcripción tipo DREB en *L. tenuis* y evaluar su relación con la respuesta adaptativa al estrés salino en dicha especie, utilizando semillas de dos familias de medio hermanos (FMH) de *L. tenuis*, una susceptible y otra tolerante a la salinidad.

A partir de la extracción de ADN de hojas de plantas sanas y de ARN de raíces de plántulas expuestas a condiciones de salinidad por 8 y 24hs, de ambas FMH de *L. tenuis*, se realizaron varias reacciones de PCR y RT-PCR. Como resultado de dichas reacciones, se obtuvo amplificación, tanto del fragmento genómico como del transcripto, con el tamaño esperado. A partir de la secuenciación de dichas reacciones, se observó la posible presencia de FT tipo DREB en *L. tenuis*.

Según la evaluación de la expresión relativa de los genes bajo condiciones de salinidad, se observó que el gen se expresa no sólo bajo condiciones de estrés salino, sino que también lo hace bajo condiciones normales de crecimiento, por lo cual podríamos suponer que el gen no sólo responde a estrés salino sino también a otros factores distintos al estudiado. Además, se observó que el *L. tenuis* tolerante tendría mayor capacidad de adaptación al estrés salino que el susceptible.

Debido a la importancia de *L. tenuis* por su gran adaptación y tolerancia a los distintos estreses abióticos y la importancia de los FT en el control de las respuestas adaptativas a los distintos factores bióticos y abióticos, la comprensión de los mecanismos moleculares que generan dicha respuesta y el estudio de los genes que codifican para los distintos FT en especies de interés agronómico, como *L. tenuis*, será la clave para desarrollar variedades tolerantes o mejor adaptadas a los distintos factores bióticos y abióticos a través de la biotecnología.

INDICE

	Pág.
Introducción	3
Hipótesis	5
Importancia y justificación del tema	5
Materiales y Métodos	6
Resultados y discusión.....	12
Conclusiones.....	23
Bibliografía	24

1. INTRODUCCIÓN

Debido al rápido crecimiento de la población, se estima que la producción de alimentos deberá incrementarse un 38% antes de 2025 y un 57% antes de 2050 a nivel mundial (Wild, A., 2003). Esto requiere no sólo un aumento de la superficie cultivable, sino también un aumento en la productividad. La necesidad de una mayor superficie cultivable tiene como consecuencia la utilización de zonas marginales, con suelos de características desfavorables. Una de estas características desfavorables es la salinidad, que puede inhibir el crecimiento de las plantas y reducir la productividad, principalmente debido a tres factores: el déficit hídrico, la toxicidad por iones y el desbalance nutricional (Munns R., 2002). Se estima a nivel mundial que un 10% de los suelos están afectados por salinidad y que entre un 25 y 50% de las zonas de regadío están salinizadas (Leidi y Pardo, 2002). La superficie afectada por salinidad se ha ido incrementando debido a la utilización de aguas para riego con concentración de sales superiores a los límites aconsejados, entre otros factores. Si bien la mayoría de las especies de importancia agrícola son glicófitas (sensibles a la salinidad), existen especies capaces de adaptarse y desarrollarse bajo elevadas concentraciones de sales (halófitas). Según un estudio de la FAO, uno de los países más afectados por halomorfismo en el mundo, después de Rusia y Australia, es la Argentina. En este último, más de 13 millones de hectáreas se encuentran afectadas por este problema, y más de 3 millones se sitúan en la provincia de Buenos Aires, principalmente en la Pampa Deprimida (<http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/en/c/175478/>). Esta subregión abarca aproximadamente 9 millones de hectáreas, y el 60% de esta superficie está constituida por suelos hidro e hidrohalomórficos de distinta intensidad (Miaczynski *et al.*, 1988; Burkart *et al.*, 1990). Las características edáficas de la Pampa Deprimida, han determinado que la actividad principal que se desarrolla en esta subregión sea la cría bovina, sustentada sobre la productividad del campo natural. La vegetación que predomina en esta zona es la estepa gramínea, y se han instalado especies más adaptadas a pH neutro a alcalino, como el *Lotus tenuis* (Musto y Maddaloni, 2001; Stoffella *et al.*, 1998; Buján y Debelis, 2005). Esta especie contribuye a aumentar la calidad y productividad de los pastizales naturales de la zona, ya que colabora aportando mayor contenido de nitrógeno y mejora la digestibilidad de los mismos (Pesqueira, J., 2008).

L. tenuis (ex glaber) es una leguminosa herbácea, perenne, alógama y de crecimiento prostrado, originaria de Europa. Ha sido introducida hace más de 50 años en la Depresión del Río Salado, donde colonizó y se naturalizó en los bajos salinos-alcalinos (Pesqueira, J., 2008; Miñon *et al.*, 1990). El éxito de su propagación puede deberse, entre otras características, a la variabilidad genética de sus poblaciones, su tolerancia al anegamiento y a la salinidad y a la plasticidad fenotípica de las plantas (Franco, 2011). *L. tenuis* es considerada una especie halófila, tolerante a la salinidad en estado de germinación, plántula y planta. Aunque todavía no se conoce con exactitud los mecanismos involucrados en la respuesta a dicho estrés, Teakle *et al.*, (2007), han reportado recientemente, que la clave en la tolerancia a salinidad en *L. tenuis* es a través de la exclusión de Cl⁻ del

xilema. Con respecto a los genes involucrados en esta respuesta, todavía no hay estudios que describan dichos genes en *L. tenuis*.

El estrés ocurre cuando un agente estresante induce un cambio fisiológico y en respuesta al mismo se produce una reducción en el crecimiento, una respuesta fisiológica acliminatoria, adaptación o una combinación de todas ellas (Pesqueira, J., 2008). Los estreses abióticos como la sequía, la alta salinidad y el frío disparan distintos tipos de respuesta en la planta (Muñiz García y Capiati, 2011). Para diseñar estrategias que permitan mejorar la tolerancia al estrés de los cultivos es necesaria la comprensión de los mecanismos moleculares a través de los cuales las plantas perciben el estrés y transducen la señal que genera una respuesta adaptativa. Estas vías de transducción actúan sobre FT que controlan la expresión de genes cuyos productos contribuyen a proteger y reparar las células dañadas por el estrés o participan en la generación de moléculas regulatorias. La regulación de la expresión génica es un factor crucial en el control de las respuestas a cambios ambientales. Los maestros de dicha regulación son los FT (Gómez-Merino *et al.*, 2009). Los FT son proteínas que regulan la expresión génica en distintas etapas del desarrollo de la planta y también actúan controlando las respuestas adaptativas, como la respuesta al estrés biótico y abiótico (García-Morales *et al.*, 2013). Dentro de las familias de FT se encuentra la AP2/ERF (Ethylene responsive factors) y se ha reportado que FT de dicha familia regulan la respuesta al estrés biótico y abiótico (Zhao-Shi *et al.*, 2011). Una de las subfamilias más importantes de la AP2/ERF, relacionada con la tolerancia al estrés abiótico en plantas es la subfamilia DREB (Dehydration responsive element binding). Los DREBs contienen un dominio de unión al ADN AP2/ERF altamente conservado en todo el reino vegetal, y se une específicamente a la secuencia DRE en el promotor de los genes blanco. El DRE es un elemento de respuesta importante para la regulación de la expresión de genes (Nakashima *et al.*, 2009). El primer aislamiento de DREBs fue a partir del genoma de *A. thaliana* donde se encontraron el DREB1A y DREB2A y según estudios realizados se determinó que la expresión de los genes DREB2A junto con su homólogo DREB2B, son inducidos bajo condiciones de estrés por sequía y alta salinidad. Estudios recientes han aislado y estudiado numerosos DREBs en distintas especies y se han detectado que responden a estrés por salinidad en arroz (*Oriza sativa*), maíz (*Zea mays*), moha (*Setaria itálica*), cebada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), garbanzo (*Cicer arietinum*), mijo perla (*Pennisetum glaucum*) y pimiento (*Capsicum annuum*) (revisado por Agarwal *et al.*, 2006; Lata C. y Prasad M., 2011).

Estudios realizados por Sanchez *et al.*, (2008) en *Lotus japonicus*, reportaron que entre las familias de factores de transcripción involucradas en la tolerancia al estrés salino, las que se encuentran en mayor proporción son la AP2/ERF con un 24% y la MYB con un 20%. En el experimento realizado, se encontró un FT tipo DREB que presentó un aumento en la expresión génica tanto en condiciones de aclimatación gradual como en shock salino en hojas, pero no en condiciones de sequía. Esto sugiere un rol relacionado al estrés iónico (toxicidad iónica) pero no al osmótico (disponibilidad hídrica).

Debido a la importancia de *L. tenuis* en cuanto a adaptación y tolerancia a los distintos estreses abióticos, se posiciona como una de las especies de interés para la investigación de los genes involucrados con la tolerancia al estrés salino. A partir del descubrimiento de los genes que codifican para los distintos FT involucrados en el proceso de adaptación, se podrían producir plantas tolerantes o con un mayor grado de adaptación a los distintos tipos de estreses abióticos a través del uso de la biotecnología (Muñiz García y Capiati, 2011).

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo es identificar FT tipo DREB en *L. tenuis* y evaluar su relación con la respuesta adaptativa al estrés salino en dicha especie, utilizando dos familias de medio hermanos (FMH) de *L. tenuis*, una susceptible y otra tolerante a la salinidad.

Hipótesis

1. Hay factores de transcripción AP2/ERF en especies del género *Lotus*.
2. Por ser especies emparentadas, los factores de transcripción AP2/ERF presentes en *Lotus japonicus* también se encuentran en *Lotus tenuis*.
3. Hay relación entre la presencia y expresión de estos AP2/ERF con la respuesta al estrés salino en *L. tenuis*.

Importancia y justificación del tema

La principal zona de cría de ganado vacuno en Argentina es la Pampa Deprimida de la Provincia de Buenos Aires, donde en los bajos existen suelos con problemas de alcalinidad y salinidad. Su principal vegetación en el campo natural son especies gramíneas (Poaceae), de baja calidad nutricional (Batista *et al.*, 2005). Las bases de la alimentación del ganado bovino para carne en Argentina son las pasturas naturales, mayoritariamente, e implantadas. Debido a la escasa presencia de leguminosas naturales, *L. tenuis* es una especie muy importante para la zona ya que está bien adaptada y puede favorecer el incremento en la calidad y productividad de las pasturas naturales.

Con la identificación de los genes que codifican para los distintos factores de transcripción responsables de la tolerancia al estrés salino en *L. tenuis*, se podrían crear variedades más tolerantes a salinidad a través de la biotecnología (Muñiz García y Capiati, 2011).

2. MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Para este estudio, se utilizaron dos familias de medio hermanos (FMH) de *L. tenuis*, una susceptible (FMH 2241) y otra tolerante (FMH 490) a la salinidad, ambas obtenidas por el Programa de Mejoramiento Genético de Especies Forrajeras para Ambientes Diversos (PMGEFAD) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). El material vegetal pertenece a 2 de las 24 FMH de *L. tenuis* con distinta respuesta a salinidad, obtenidas de policruzamientos de 35 poblaciones provenientes de campos bajos de la Provincia de Buenos Aires, que previamente fueron colectadas y caracterizadas morfológica y productivamente por Rosso *et al.*, (2008) y Andrés y Rosso, (2007). Las semillas fueron cedidas por la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) - INTA Pergamino.

Análisis bioinformático y diseño de oligonucleótidos.

Para identificación de FT de la familia AP2/ERF potencialmente relacionados a estrés salino, se realizó una revisión bibliográfica de los trabajos científicos publicados hasta la fecha que relacionaban la tolerancia al estrés abiótico con la expresión de FT AP2/ERF. A partir de este análisis, y la búsqueda en la base de datos del NCBI - *National Center for Biotechnology Information* - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) se seleccionaron los FT tipo DREB. Fueron seleccionados DREBs de especies emparentadas, *Glycine max*, *Medicago trunculata*, *Caragana korshinskii*, y de especies modelo, *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*.

También fue utilizado una sonda de *L. japonicus* relativa a un FT tipo DREB, según fue descrito por Sanchez *et al.*, (2008). La secuencia fue utilizada para realizar comparaciones a través de un BLASTn, contra el banco de datos de *A. thaliana* (www.arabidopsis.org) y contra el de *L. japonicus* (www.kazusa.org.jp/lotus/). Basándose en el e-value y el % de ID, se seleccionaron genes con mayor similitud en ambas bases de datos.

A partir de las secuencias, tanto proteicas como génicas de las especies supra citadas, se realizaron distintos alineamientos múltiples con el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) para identificar una secuencia consenso y las regiones conservadas.

Para el diseño de los oligonucleótidos, se ingresó la secuencia nucleotídica del gen LjT35E05.90.r2.d en formato FASTA, en el programa en línea Primer 3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>). Fueron diseñados 3 oligonucleótidos para amplificar el fragmento genómico y también para el estudio de la expresión del mismo. Los parámetros utilizados fueron: tamaño entre 19 y 22 pb, Tm entre 58° y 65°C con una diferencia máxima de 1°C, contenido de bases GC entre 45 y 65% y con una máxima complementariedad local de 4 y global (3') de 2. Tamaño de secuencia amplificada entre 400 y 630 pb.

Una vez obtenidas las secuencias de los 3 oligonucleótidos, se utilizó el algoritmo BLAST para comprobar la especificidad de los mismos. La síntesis de los oligonucleótidos fue realizada por IDT, Estados Unidos.

Extracción y cuantificación de ADN

Para amplificación del DREB de *L. tenuis* a partir de los oligonucleótidos diseñados, fue realizada una extracción de ADN a partir de 2 muestras de 100mg de hojas sanas, derivadas de plantas adultas de *L. tenuis* susceptible (FMH 2241) y tolerante (FMH 490) a salinidad.

Las muestras fueron maceradas con nitrógeno líquido en mortero, y para la extracción fue utilizado el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. Para evitar contaminación de ARN a la muestra resultante de la extracción, fue realizado tratamiento con ARNasa, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una vez obtenido el ADN, se midió su concentración con el espectrofotómetro NANODROP 2000 y se almacenó a -80°C hasta su utilización para la amplificación por PCR de los fragmentos deseados.

Amplificación del fragmento genómico de DREB mediante PCR

Para la amplificación de los fragmentos del gene DREB, la concentración de ADN utilizada por reacción fue de 14 ng/μL del ADN aislado de *L. tenuis* tolerante, y de 10 ng/μL del ADN susceptible. Se utilizaron 2 pares de oligonucleótidos: 1: DREB1 F y DREB2 R (Fragmento esperado de 642 pb) y la 2: DREB3 F y DREB2 R (Fragmento esperado de 259 pb). La reacción de PCR se realizó con un volumen final de 25μL (ver componentes de la reacción en Tabla 1) mediante las condiciones detalladas en la Tabla 2. Para la amplificación del producto deseado se probaron dos temperaturas de fijación: 55° y 58°C. Además de las muestras de ADN, para evitar resultados falsos positivos, se realizó una reacción sin ADN como control negativo. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador MyCycler de Biorad.

Tabla 1: Componentes de la reacción de PCR para la amplificación de los fragmentos génicos de DREB en *L. tenuis*.

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

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

Procedimiento	Temperatura (°C)	Tiempo (m)	Número de Ciclos
E. Desnaturalización	94	1	1
E. Desnaturalización	94	00:30	30
Primer Annealing	55-58	00:30	30
Primer Extensión	72	00:45	30
Elongación final	72	5	1

Los resultados de la amplificación se observaron mediante electroforesis con gel de agarosa al 0,8% teñido con Gel Red, a 90 volts, por 1 hora.

Para determinar que el tamaño de las bandas obtenidas coincidiera con el tamaño esperado de los fragmentos, se incluyó GeneRuler (Fermentas) como marcador de peso molecular. Los fragmentos obtenidos por amplificación fueron purificados utilizando el kit GenJET PCR Purification Kit (Fermentas), siguiendo el protocolo del fabricante. Se midió su concentración en el NANODROP 2000 y se lo conservó a -20°C hasta el envío de las muestras a secuenciación.

Tratamiento de plántulas de *L. tenuis* en condiciones de estrés salino para estudio de expresión del gen DREB.

Para la germinación, se escarificaron 90 semillas aproximadamente de *L. tenuis* (FMH 490 y FMH 2241) por abrasión con papel de lija, y se colocaron sobre filtros humedecidos con agua, en placas de petri. Las placas fueron colocadas en cámaras de germinación a 25°C. Transcurridos tres días, se agregaron 2mL de agua, para mantenerlas en condiciones de alta humedad.

Siete días posteriores a la siembra, se trasplantaron las plántulas a bandejas multipots que contenían compost orgánico Bertinat (Materia orgánica: 20-25%, pH: 5-5.5%, relación C/N: 19.8%, cenizas: 20-25%, humedad: 45-50%).

Las bandejas permanecieron en cámaras de crecimiento bajo las siguientes condiciones: T°: 25°C, 12 horas luz / 12 horas oscuridad y Luz: 360 micromoles/m² por segundo (PAR: photosynthetic active radiation) y se mantuvieron con el mismo nivel de agua destilada por una semana (Figura 1).

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

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

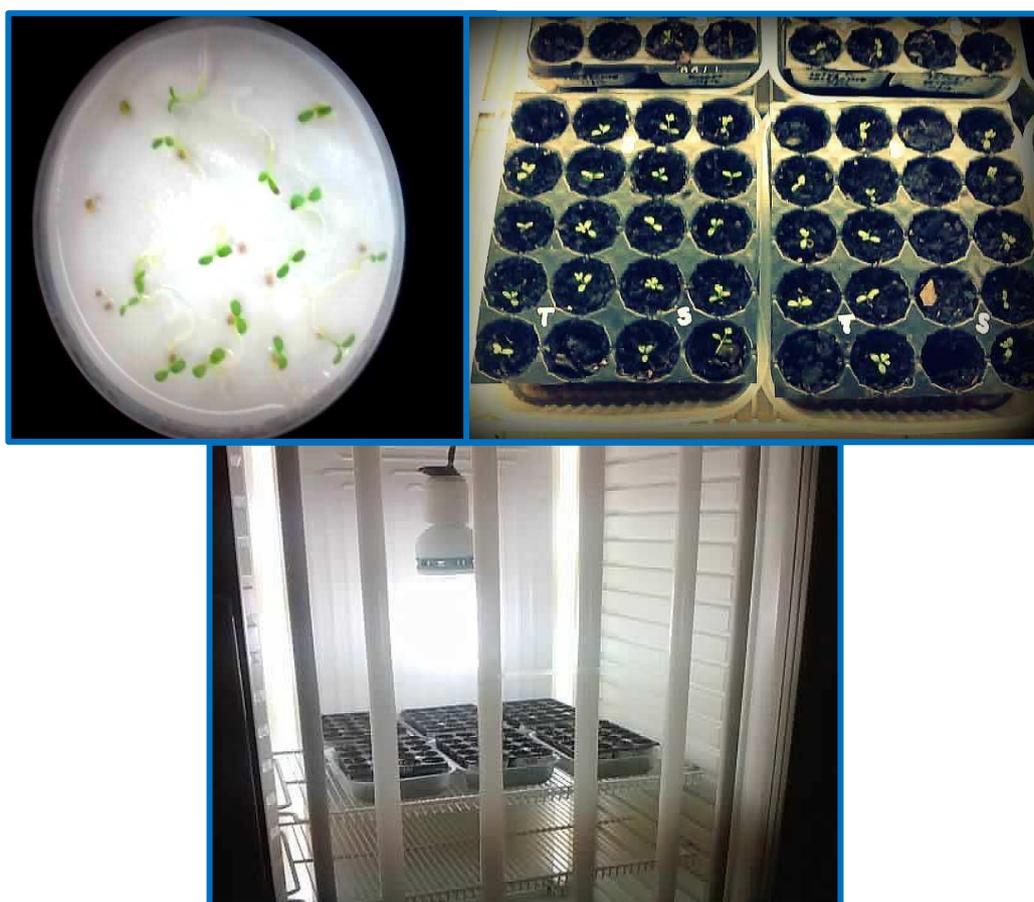
Bloque 2 (Tratamiento 8 horas): Plántulas sometidas a una solución de 150 mM de NaCl por 8 horas.

Bloque 3 (Tratamiento 24 horas): Plántulas sometidas a una solución de 150 mM de NaCl por 24 horas.

Se realizaron tres repeticiones por bloque con cinco plántulas por repetición para cada FMH. Luego de transcurrida la semana se reemplazó el agua de los tratamientos de 8 y 24 hs por una solución de NaCl 150 mM, mientras q el control se mantuvo con agua.

A las 8 y 24 hs de aplicada la solución, se cortaron las raíces de cada una de las plántulas en condiciones libre de ARNasas, y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido. Las muestras se conservaron a -80°C hasta la extracción del ARN.

Figura 1: Proceso de germinación y crecimiento de semillas de *L. tenuis*



Extracción y cuantificación de ARN

Se molieron las cinco raíces de cada repetición para cada FMH en nitrógeno líquido con varilla de vidrio. La extracción de ARN fue realizada utilizando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. Durante la extracción, fue realizada la etapa de tratamiento con DNasa para evitar contaminación de las muestras de ARN con ADN.

Luego de la extracción de ARN, se midió la concentración con NANODROP 2000, y se verificó la integridad en gel de agarosa al 1%. Para asegurar la confiabilidad del resultado se utilizó un ARN control, proveniente del Kit de síntesis de cADN RevertAid First Strand cDNA kit (Fermentas).

Síntesis de cADN

A partir de las concentraciones medidas anteriormente se llevaron todos los ARN a 500ng/reacción para realizar la síntesis del ADN complementario según lo especificado por el protocolo para RT-PCR del RevertAid First Strand cADN Synthesis Kit (Fermentas).

Amplificación por RT- PCR y análisis de expresión relativa

Para la amplificación del fragmento transcrito a partir del cADN obtenido fue utilizado el par de oligonucleótidos DREB3 F y DREB2 R (fragmento esperado de 259 pb). Como referencia de la expresión relativa de los DREB fue utilizado el gen tubulina de *L. japonicus* con el par de oligonucleótidos LjTUB Forward (5'AGGAAGGCTTTCTTGCATTG3') y LjTUB Reverso (5'TCCTCCTGAACTTCATCCTCA3') (fragmento esperado de 170 pb), (Teakle *et al.*, 2010). La reacción de RT-PCR se realizó con un volumen final de 25µL. Para la amplificación se probaron tres concentraciones de cADN: 2,5, 5 y 12,5 ng/reacción, con dos temperaturas de fijación: 52°C y 55°C y dos ciclos: 30 y 35. Los componentes y condiciones de la reacción se observan en la Tabla 3 y 4, respectivamente. Las reacciones de RT-PCR se realizaron en el termociclador MyCycler de Biorad.

Tabla 3: Componentes de la reacción de RT-PCR para amplificación de los fragmentos transcritos de DREB en *L. tenuis*.

Componentes	Concentración en cada reacción
Buffer taq	1X
Mgcl2	1.5 Mm
dNTPs	0.2 mM
Primer forward	0.2 mM
Primer reverso	0.2 mM
Taq Polimerasa (Fermentas)	1U

Tabla 4: Condiciones de la RT-PCR para la amplificación de los fragmentos transcritos de DREB en *L. tenuis*.

Procedimiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Número de Ciclos
E. Desnaturalización	94	1	1
E. 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

Para observar los resultados se realizó electroforesis con gel de agarosa al 0,8% teñido con Gel Red 10000x (4µL/100mL) a 110 volt por 1hora.

Para evitar resultados falsos, además de las muestras de cADN, se realizó un control negativo y un control positivo interno con ADN de *L. tenuis* tolerante.

Expresión relativa de genes DREB en *L. tenuis*.

Se realizó el análisis de la expresión relativa de DREB utilizando como gen de referencia a la Tubulina. Para la medición de la expresión de ambos se utilizó el programa GelQuantNET, el cual se basa para la medición en los pixeles del área seleccionada en las fotos de los geles de las RT-PCR. Dichas fotos tenían similar tamaño y calidad para que la comparación fuera efectiva.

Con los datos obtenidos del GelQuantNET, se realizó un gráfico de columnas agrupadas en el Excel para comparar las FMH, tanto en el control como en el tratamiento con la solución salina 150 mM y en ambos tiempos, 8 y 24 hs. Para esto se tomó como categoría el control y el tratamiento para ambas FMH y como series los tiempos 8 y 24 hs. El valor de la serie representa la expresión relativa DREB/TUB.

Secuenciación

Para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos seleccionados y evaluar la secuencia amplificada por PCR y RT-PCR, se enviaron a secuenciar muestras de ADN como de cADN amplificado por PCR, previamente purificadas siguiendo el protocolo del GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas), a la Unidad de Secuenciación del Departamento de Ecología, Genética y Evolución en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

A partir de las secuencias resultantes se realizó una comparación contra el banco de genes del NCBI- *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a través del programa tBLASTx de este sitio, para conocer el porcentaje de identidad genética con otras secuencias ya existentes en el banco.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación *in silico* de genes de la subfamilia DREB y diseño de oligonucleótidos.

Los factores de transcripción juegan un papel fundamental en la regulación de la expresión de los genes de respuesta al estrés, cuyos productos contribuyen directa o indirectamente a aumentar la adaptación al mismo. Se ha demostrado que los FT tipo DREB pertenecientes a la familia AP2/ERF están involucrados en la respuesta al estrés salino (Agarwal *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2011). Los DREB, además de estar presentes en el genoma de especies modelo como *A. thaliana* y *O. sativa* (arroz), también fueron descritos en otras especies. En un estudio de análisis de expresión global por microarreglos, Sanchez *et al.*, (2008) detectaron un FT tipo DREB en *L. japonicus* (sonda TM07515.25) que presentó expresión aumentada en hojas bajo estrés salino. Debido al parentesco de esta especie con *L. tenuis*, se utilizó la secuencia génica correspondiente a esta sonda para identificar el gen correspondiente en el banco de datos de *L. japonicus* (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>), donde se encontraron similitudes con las secuencias LjT35E05 y CM1976 (Tabla 5). Se seleccionó el gen LjT35E05 y se hizo una comparación a través de un BLASTn contra el banco de datos de *A. thaliana* (www.arabidopsis.org), la cual arrojó como resultado una mayor similitud con los genes At1g44830 y At1g21910 (Tabla 6). Las similitudes observadas en todas las comparaciones se basaron en los valores del e-value y del % de ID.

Tabla 5. Resultados del BLASTn realizado con los oligonucleótidos de la sonda TM07515.25 contra el banco de datos de *L. japonicus*.

Origen	Descripción	e-value	ID (%)	Acceso a secuencia
<i>Lotus japonicus</i>	LjT35E05	1e-05	23/23(100%) 23/23(100%)	LjT35E05.90.r2.d
<i>Lotus japonicus</i>	CM1976	1e-05	23/23(100%) 23/23(100%)	chr1.CM1976.210.r2.m

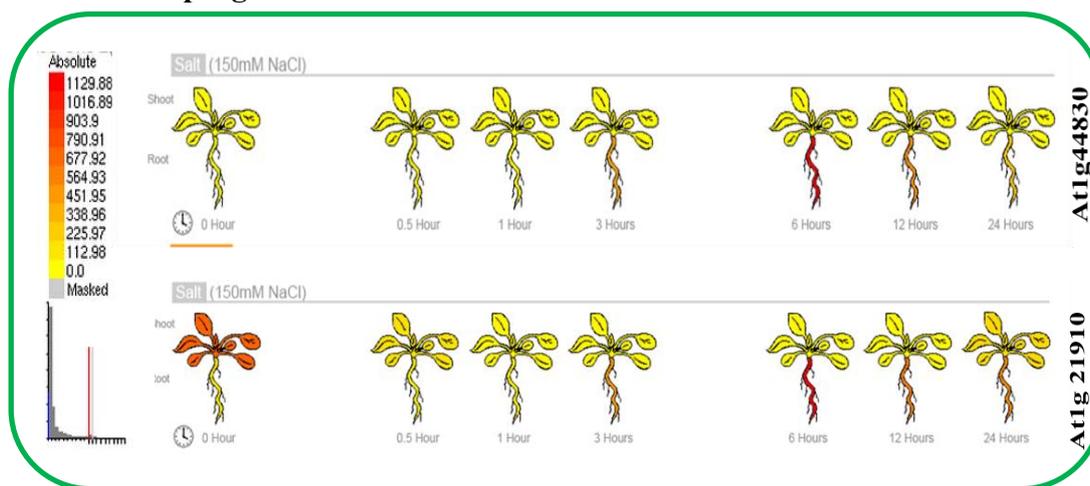
Tabla 6. Resultados del BLASTn realizado con el gen LjT35E05 contra el banco de datos de *A. thaliana*.

Origen	Descripción	e-value	ID (%)	Acceso a secuencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g21910	1e-23	128/152 (84%)	AT1G21910
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g44830	7e-25	136/162 (83%)	AT1G44830

Para corroborar si los genes At1g44830 y At1g21910 de *A. thaliana* están relacionados al estrés salino se realizó un análisis de expresión *in silico* a través del programa en línea eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), donde se observó que los 2 genes presentan expresión

aumentada en raíces bajo condiciones de estrés salino. En la Figura 2 podemos observar que ambos genes presentan un aumento en la expresión en raíz a las 3 horas, alcanzando su máximo a las 6 horas de aplicada la solución salina. La diferencia radica en que a las 24hs la expresión en raíz en el gen At1g21910 es mayor, además este gen posee alta expresión a las 0hs en la parte aérea, mientras que el gen At1g44830 no presenta expresión en ningún órgano.

Figura 2. Análisis de expresión relativa en raíces de *A. thaliana* bajo estrés salino en el programa eFP Browser.



A partir de las secuencias tanto génicas como proteicas de los genes antes mencionados (At1g21910, At1g44830, LjT35E05.90.r2.d) y de las obtenidas de la búsqueda en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) como se describió en Materiales y Métodos (Tabla 7), se realizaron distintos alineamientos múltiples a través del CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) con el objetivo de identificar una posible similitud entre estas (Figura 3 y 4), para el diseño de oligonucleótidos en zonas conservadas de la secuencia, para amplificación de genes similares en *L. tenuis*.

Tabla 7. Secuencias proteicas y génicas de FT tipo DREB utilizadas.

Origen	Nombre	Tamaño	Acceso a secuencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g44830	211 aa	ABF19023.1
	At1g44830 mRNA, complete cds	636 pb	BT025270.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g21910	230aa	ABD43014.1
	At1g21910 mRNA, complete cds	693 pb	BT024616.1
<i>Glycine max</i>	AP2 domain - containing transcription factor 6	232aa	ACJ37440.1
	Glycine max AP2 domain-containing transcription factor 6 (AP2-6) mRNA, complete cds	699 pb	FJ228458.1

<i>Medicago truncatula</i>	AP2 domain - containing transcription factor	220aa	XP_003601066.1
	Medicago truncatula AP2 domain-containing transcription factor (MTR_3g072610) mRNA, complete cds	742 pb	XM_003601018.1
<i>Oryza sativa</i>	OsDREB2A	214aa	UniProtKB/Swiss-Prot:Q0JQF7.1
	Oryza sativa Indica Group cultivar Pokkali dehydration responsive element binding protein 2a (DREB2A) mRNA, complete cds	846 pb	JQ341059.1
<i>Caragana korshinskii</i>	DREB2	323aa	ADD69957.1
	Caragana korshinskii DREB2 mRNA, complete cds	1379 pb	GU573848.1
<i>Lotus japonicus</i>	LjT35E05.90.r2.d	213aa	LjT35E05.90.r2.d
	LjT35E05.90.r2.d	642 pb	LjT35E05.90.r2.d

Figura 3. Alineamiento múltiple entre secuencias génicas de *A. thaliana*, *L. japonicus*, *M. truncatula* y *G. max* a través del programa CLUSTALW.

```

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6          -----ATGGTTAAGTTAGAGCACAA-- 20
LjT35E05.90.r2.d                       -----ATGGTTAAGTCAGAGCACAA 22
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_       ATTTAATTTGCACTTACATCTACCTATTATGGTTAAGTCAGAGACTAACA 50
gi|94442470|_At1g44830                -----ATGGTGAAA--ACAATCAA-A 19
gi|88196742|_At1g21910                -----ATGGTGAAACAAGAACGCAAGA 22
                                         ***** ** * * **

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6          ----GAT-----CAAAACAGAA-----CCATCATCAAAGGAAATG 51
LjT35E05.90.r2.d                       ---AGAT-----CAAAACAGGA-----CAAAAATCAAAGCCAGTT 54
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_       ---AGAT-----CAAAAAGAA-----CC---ATCAA----- 72
gi|94442470|_At1g44830                ---AGACA-----CCAAAGAGAA-----T---GTCTCTCCATCA 48
gi|88196742|_At1g21910                TCCAAACCAGCAGCACAAAAGGAAATGCCTTTGTCTATCATCACCATCT 72
                                         *          * * * * *          ***

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6          CGGTTATCTTCACTCTCATCATCAGCATCAACATCATCAGATTGCAAGAA 101
LjT35E05.90.r2.d                       TCATCATCTTTATCTCATCAT---CATCAGCATCATCAGAAAGCATGAA 101
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_       -----TTCA-----ATC-TCAGATAGTAGCAA 93
gi|94442470|_At1g44830                TCATCATCTTTCATCTCTCAT---CAACATCATCATCCATAAGGAT 95
gi|88196742|_At1g21910                TCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTCGTCTTCTCGTGTGAAGAACA 122
                                         **          * * * * *          * *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6          GAA-----GAAGTACAAGGGAGTGAGAATGAGGAGCT 133
LjT35E05.90.r2.d                       GAA-----GAAGTACAAGGAGTCAGAATGAGAACAT 133
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_       GAA-----GAAGTACAAGGAGTAAGAATGAGGAGTT 125
gi|94442470|_At1g44830                GAA-----GAAGTACAAGGGAGTGAGAATGAGAAGTT 127
gi|88196742|_At1g21910                GAACAAGAAGAGTAAGATTAAGAAGTACAAGGAGTGAGGATGAGAAGTT 172
                                         ***          ***** ** * * * * *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6          GGGGATCATGGGTGCTGAGATTAGAGCACCAAACCAGAAAACAAGAATA 183
LjT35E05.90.r2.d                       GGGGTTCAATTTGTTTCAGAGATTAGAGCACCAAATCAGAAAACAAGGATA 183
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_       GGGGTTTCATGGGTATCAGAGATTAGAGCACCAAATCAAAAACAAGAATT 175
gi|94442470|_At1g44830                GGGGTTTCATGGGTTTCAGAGATCAGAGCTCCTAATCAAAAGACAAGGATC 177
gi|88196742|_At1g21910                GGGGATCATGGGTCTCTGAGATTAGGGCACCAAATCAAAAGACAAGGATT 222
                                         **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6          TGGTTAGGCTCTTATTCAACCCCGGAGGCTGCAGCTAGAGCCTATGATGC 233
LjT35E05.90.r2.d                       TGGCTAGGATCTTCTCAACACCAGAAGCAGCAGCAAGAGCCTATGATGC 233
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_       TGGTTAGGTTCTTATTCAACTGCAGAAGCTGCAGCTAGAGCTTATGATGC 225
gi|94442470|_At1g44830                TGGCTTGGTTCTTACTCAACTGCTGAAGCCGCGGCTAGAGCCTACGACGC 227
gi|88196742|_At1g21910                TGGTTAGGTTCTTACTCAACAGCTGAAGCAGCTGCTAGAGCTTACGATGC 272
                                         *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      TGCACCTTCTATGCCTTAAAGGATCCTCAGC-----AAATCTCAATTTCC 277
LjT35E05.90.r2.d                  TGCACCTTCTATGTCTCAAAGGGTCTCAGC-----AAGTTTCAATTTCC 277
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    TGCACITTTATGCCTTAAAGGTTCAATCATCTGCTTCAAATCTCAATTTCC 275
gi|94442470|_At1g44830              AGCACTCCTATGTCTTAAAGGATCCTCAGCTAAT---AATCTCAACTTCC 274
gi|88196742|_At1g21910              TGCACCTTATGTCTCAAAGGCCCTCAAGCC-----AATCTCAACTTCC 316
*****  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      C-----TTTAA-GC-----TCTTCACAACAATAC-----AT--TCCAG- 307
LjT35E05.90.r2.d                  C-----TTCAA-GT-----TCTTCACTT---TTC-----AT--TCCTC- 304
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    C-----TTTAAACATCATCATCTTACATTACAAT-----AT--TCCTC- 311
gi|94442470|_At1g44830              CAGAGATCTCAACTTC---TCTCTACCATATTATCAACAATGGTGATA- 319
gi|88196742|_At1g21910              CT---ACTTCTTCTTC---TTCTCATCATCTTCTTGATAATC--TCTTAG 358
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      ---GAGAGGCTGTCATGTCCCCCAAATCAATCCAAAGAGTTGC---TGCG 351
LjT35E05.90.r2.d                  ---AAGACTGCGCATGTCCCCAAAATCAATCCAAAGAGTTGC---TGCA 348
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    ---AAGA-----TATGTCTCCAAAATCAATCCAAAGAGTAGC---TGCA 349
gi|94442470|_At1g44830              ---ACAACAATGACATGTCCCCTAAGTCTATACAAGAGTAGCAGCTGCA 366
gi|88196742|_At1g21910              ATGAAAATACCCCTTTTGTCCCCCAAATCCATCCAAAGAGTAGC---TGCT 405
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      GCCGCTGCAAATAGTTTTCATTGACAA---TGCCAACACTCCCCCT--TCCC 397
LjT35E05.90.r2.d                  GCTGCTGCAAATAGCTTTCATTGACAACAA[GCCAGCACCACCCT--TCAA 397
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    GCTGCCGCGAATAGTTTTCATCGACAACAATAATAATAATGTTAATGTTAA 399
gi|94442470|_At1g44830              GCTGCTGC-----TGCCAACACAGATCCT--TCCT 394
gi|88196742|_At1g21910              CAAGCTGCCAAC---TCATT-----TAACCATTTTGCCCT----A 439
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      CACC--TCTGCTTCTAACCCATCATCATTGGCCTCATCCCCCTC--ATT 443
LjT35E05.90.r2.d                  CTCC--TCCTCTCTCT-----TCAACCTCAT---CATC--ATT 428
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    TGTCATGATAATGCTAACAC-----TC--CCTCTTTCATCATC--ATT 438
gi|94442470|_At1g44830              CATC---ATCAGTCT-----CTACTTCAT---CTCC--ATT 422
gi|88196742|_At1g21910              CTTC---ATCAGCC-----GTCICGTCACCGICCGATC 469
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      GGTCTCTTCTCCCTCGGATCAAATCG-----ACGACAACGCATCGC 484
LjT35E05.90.r2.d                  GGTCTCTTCCCCATC-----AATGG-----ATGA---TGTCTCAC 460
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    GGTATCATCTCCATCA---TCAATGGTTTCTTCTGACGATGTTTCTTCCAC 485
gi|94442470|_At1g44830              GCTTTCCTCTCCATCTGA--AGATCTCT-----ATGATGTTGTCTC-- 461
gi|88196742|_At1g21910              ATGATCATCACCATGA---TGATGG-----GATGCAATCTT-- 502
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      TGATATCGTCTTTCGAAGCCTTACTAGTTGTGACCAAGCAAATCAACCA 534
LjT35E05.90.r2.d                  TTGAATCATCTTTTGAA-----TCA 480
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    TTATGTCACTTTTCGAT---CAAGTTAAT-----GATGAATCG 520
gi|94442470|_At1g44830              -CATGTCCAGTATGAC-----CAACAA 483
gi|88196742|_At1g21910              TGATGGGATCTTTTGTG-----GACAATCA 527
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      -ATGACTATGAATGTGATGGA-----ACCT---TGGTACACCTTTGCTG 574
LjT35E05.90.r2.d                  -ATGGCTATGA-----TGGGA-----ACCT---TGGTACAGCCTG---G 511
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    -ATGGCTATGA---TATCGGA-----AACTAATTGGTATGGAATTA---G 557
gi|94442470|_At1g44830              -GTCTCCTTGT-----CTGAAT---CATCATCATGGTACAACCTGCTTTG 523
gi|88196742|_At1g21910              TGTGTCTTTGA-----TGGATTCAACATCTTCATGGTAT-----G 562
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

```

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      ATGGTCTTCAATCCCCTAAGTATGTTGATCAGATGCT---AAGTGG---- 617
LjT35E05.90.r2.d                   ATGATCTGCAATCCACTAAGTATGTTGATCAGATGCT---AAGTGC---- 554
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    AAGGTTTACAAATCACCTAAATATGTTGATCAGATGTTGTTAAGTGC--- 603
gi|94442470|_Atlg44830             ATGGTG-ATGATCAGTT---CATGTTCAATTA-ATG-----GAGT-C---- 558
gi|88196742|_Atlg21910             ATGATC-ATAATGGGATGTTCTTGTGTTGATA-ATG-----GAGTCCATT 605
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      ----TGCTTTCTTC---GATTTCGATTGCTG-TCATC---TGTTTG---A 653
LjT35E05.90.r2.d                   ----TTCTTCTTTCTATGATATTGATTCAAC-CCACCACCTGTTTA---A 596
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    ----TTCTTCTTT---GATATTGATTCAATCA-CATTGCTTGGTGA 645
gi|94442470|_Atlg44830             ----TCCGCGCCGT---AT-TTGA--CAACATCA----CTTTCTG---A 590
gi|88196742|_Atlg21910             CAATTACTCTCCTC----AACTAAACTCGACGACG----ATGCTCG---A 644
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      TGA---TCTATACGAAGAAAGTACATTGCTTTGTGGAGCTTCTGCTGA- 699
LjT35E05.90.r2.d                   TGA---TGTTGATGAAGAGAGTGACAT|CGTTTGTGGAACTTTTGTGTA- 642
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    TGA---TCTATATGAAGAAAGTATGATTTCCITTTGTGGAACTTCTGCTGAA 692
gi|94442470|_Atlg44830             TGA---TTTCTTTGAGGAAGGAGATATCAGATTATGGAACTTCTGCTGA- 636
gi|88196742|_Atlg21910             TGAATACTTCTACGAAGATGCTGACATTCCGCTTTGGAGTTTCAATTA- 693
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|212717197|_GmAP2domain-TF6      -----
LjT35E05.90.r2.d                   -----
gi|357461568|_Mt_MTR_3g072610_    GAAACGATCAAATACTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTACAAAATTCAA 742
gi|94442470|_Atlg44830             -----
gi|88196742|_Atlg21910             -----

```

*En verde están los oligonucleotidos diseñados para amplificación en *L. tenuis*

Figura 4. Alineamiento múltiple entre secuencias proteicas de FT tipo DREB de *A. thaliana*, *L. japonicus*, *M. trunculata* y *G. max* a través del programa CLUSTALW.

```

gi|212717198|_GmAP2domain-TF      MVKLEH-KIKTEPSSKEMRLSSLSASSASTSSDC-----KMKK 36
LjT35E05.90.r2.d                   MVKSEHNKIKTKGQSKPVS-SSLSSSSASSES-----MKKK 36
gi|357461569|_MtAP2domain-TF      MVKSETNKIKKEPS-----NSISDSS-----KMK 24
gi|94442471|_Atlg44830             MVKTLQKTPKRMSSPSS--SSSSSSSTSSSI-----RMKK 34
gi|88196743|_Atlg21910             MVKQER-KIQTSSTKKEMLSSSPSSSSSSSSSSSSCKNKNKSKIKK 49
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|212717198|_GmAP2domain-TF      YKGVMRWSGWSVSEIRAPNQKTRIWLGYSYTPAAAARAYDAALLCLKGS 86
LjT35E05.90.r2.d                   YKGVMRTWGSFVSEIRAPNQKTRIWLGYSYTPAAAARAYDAALLCLKGS 86
gi|357461569|_MtAP2domain-TF      YKGVMRWSGWSVSEIRAPNQKTRIWLGYSYTPAAAARAYDAALLCLKGS 74
gi|94442471|_Atlg44830             YKGVMRWSGWSVSEIRAPNQKTRIWLGYSYTPAAAARAYDAALLCLKGS 84
gi|88196743|_Atlg21910             YKGVMRWSGWSVSEIRAPNQKTRIWLGYSYTPAAAARAYDVALLCLKGP 99
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

gi|212717198|_GmAP2domain-TF      S--ANLNFPLSSSQYIPGE----AVMSPKSIQVAAAAANSFIDN-AN 128
LjT35E05.90.r2.d                   S--ASFNFPSSSS-LFIPQD----TAMSPKSIQVAAAAANSFIDNNS 128
gi|357461569|_MtAP2domain-TF      SSANLNFPLTSSSSHYNIP----QDMSPKSIQVAAAAANSFIDNNSN 119
gi|94442471|_Atlg44830             S--ANLNFPEISTSLYHIINNGDNNNDMSPKSIQVAAAAAANDPSSS 133
gi|88196743|_Atlg21910             Q--ANLNFPTSSSHLLDNLLENTLLSPKSIQVAAQAANSFNHFAP- 146
. . : * * * * * : . . : * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|212717198|_GmAP2domain-TF      TPPSPPPANPSSLASSPVLVSSPSDQ--IDDN--ASLISSFEAYTSCDQ 174
LjT35E05.90.r2.d                   TTITSTPP--P--TSSSLVSSP--MDD--VLESSEFES----- 160
gi|357461569|_MtAP2domain-TF      NVNVNVNDNANTP--SSSLVSSPSSMVSSDDV--SSLMSFDQVND 162
gi|94442471|_Atlg44830             SVS-----TSSPLLSSPED--LYDV--VSMQYDQD----- 161
gi|88196743|_Atlg21910             -----TSSAVSSPSDHDHDDGMQSLMGSFVDN----- 175
. . . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|212717198|_GmAP2domain-TF      ANQPMTNVMEP---WYTFADGLQSPKYVDQMLSG-AFFDFDSS-HLFD- 218
LjT35E05.90.r2.d                   -----MAMEP---WYSLDD-LQSTKYVDQMLSSAFYDIDSTHHLFN 199
gi|357461569|_MtAP2domain-TF      -----ESMAMISETN-WYGLEG-LQSPKYVDQMLLSAFYDIDSSSHLLGD 206
gi|94442471|_Atlg44830             -----VLSSESS-WYNCFD-----GDDQFMFINGVSAPYLITSLSD- 197
gi|88196743|_Atlg21910             -----HVSIMDSTSSWYDDHN---GMFLFDNGAPFNYSPLNSTMLDE 216
. . : * * * * * : . . : * * * * * * * * * * * * *

gi|212717198|_GmAP2domain-TF      DLYEESDIRLWSFC 232
LjT35E05.90.r2.d                   DVYEESDIRLWNFC 213
gi|357461569|_MtAP2domain-TF      DLYEESDIPLWNFS 220
gi|94442471|_Atlg44830             DFFEEDIRLWNFC 211
gi|88196743|_Atlg21910             YFYEDADIPLWSFN 230
. : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

* Indica posiciones que tienen residuos idénticos; : Indica residuos fuertemente conservados; • Indica residuos débilmente conservados.

Finalmente, después de los análisis de similitud entre secuencias y la verificación de la expresión en condiciones de salinidad de los genes de *A. thaliana*, se diseñaron los oligonucleótidos para amplificación en *L. tenuis*. De los resultados arrojados por el programa Primer 3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>), se seleccionaron 3 oligonucleótidos, 2 para amplificar y 1 para transcribir el gen. El criterio utilizado para la selección fue la mayor especificidad al realizar el algoritmo BLAST contra el banco de genes de *L. japonicus* (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>). Las características de los oligonucleótidos seleccionados se detallan a continuación:

Características de los oligonucleótidos diseñados.

Condiciones: Amplificar fragmento genómico de 642 pb en PCR convencional y fragmento transcrito en RT-PCR de 259 pb, junto con DREB2 R.

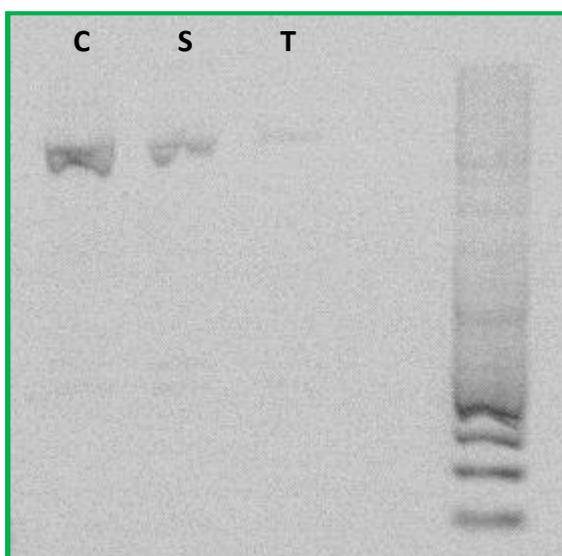
Nombre del oligo	Secuencia 5'→3'	Longitud	Tm	%GC	Tamaño ampliación
DREB1 F	CTCAACACCAGAAGCAGCAG	20pb	59.77	55.00	642pb
DREB2 R	CAGCAAAAGTTCCACAAACG	20pb	59.36	45.00	
DREB3 F	GCACCACCACTTCAACTCCT	20pb	60.16	55.00	259pb

(Los oligonucleótidos se encuentran localizados en la Figura 3).

Amplificación del fragmento genómico del gen DREB en *L. tenuis*

En estudios moleculares, es necesario verificar la calidad del ADN para garantizar la confiabilidad de los resultados. En este estudio, la calidad del ADN se verificó a través de espectrofotometría con el NANODROP 2000, obteniéndose concentraciones entre 14 a 3,7 ng/μL, como así también se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% que demuestra la integridad del ADN (Figura 5).

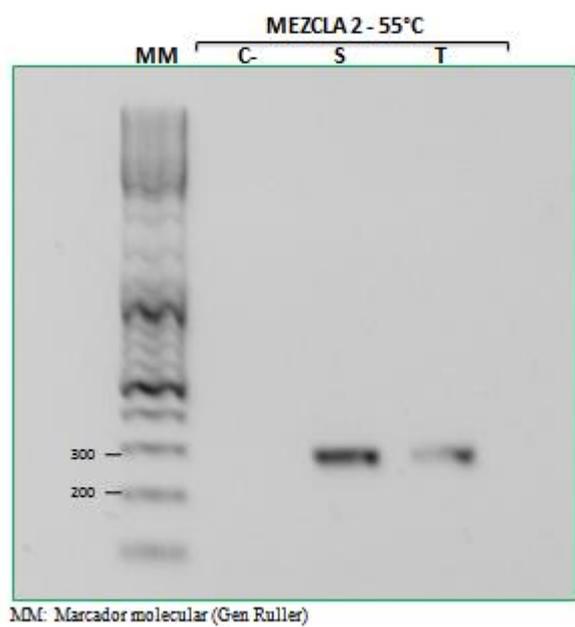
Figura 5. Calidad del ADN de *L. tenuis*.



Se realizó una PCR utilizando ADN de *L. tenuis* susceptible y tolerante, con los oligonucleótidos: M1: DREB1 Forward y DREB2 Reverso (Fragmento esperado de 642pb) y la M2: DREB3 Forward y DREB2 Reverso (fragmento esperado de 259pb). El producto resultante de la PCR fue visualizado con electroforesis en gel de agarosa. En la lectura del mismo se observó amplificación de la M2 susceptible (S) y tolerante (T), tanto a 55° como a 58°C, con el tamaño esperado.

Para secuenciación del fragmento resultante, se realizó una nueva PCR con la temperatura de hibridación a 55°C como se describió en Materiales y Métodos, arrojando como resultado la amplificación de la M2 susceptible y tolerante con una banda del tamaño esperado del fragmento, entre 200 y 300 pb (Figura 6).

Figura 6. Amplificación fragmento genómico de 259pb en *L. tenuis* para enviar a secuenciación.



Análisis de expresión de DREB en raíces de *L. tenuis*

Luego de la extracción de ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar la calidad del ARN. Como se puede observar en la Figura 7 el ARN posee buena calidad, ya que las dos bandas que se encuentran presentes aseguran la integridad del ribosoma. Además, para síntesis del cADN, se realizó una cuantificación a través del NANODROP 2000.

Figura 7. Electroforesis para determinación de la calidad del ARN.



Para determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para las proteínas tipo DREB, se realizaron RT-PCR (Reverse Transcription - PCR) con distintas concentraciones de cADN y distintos números de ciclos (30-35). Se utilizó el gen tubulina como gen de referencia para la cuantificación relativa de la expresión.

Como resultado de estas se observó amplificación tanto con 30 como con 35 ciclos, de un fragmento entre 200 y 300 pb coincidiendo con el control positivo (ADN *L. tenuis* TOL).

En el caso de los 30 ciclos, con una concentración de cADN de 6,25 ng/μL, se observó amplificación en el tratamiento de 8 hs en *L. tenuis* susceptible (S) y tolerante (T) y en el tratamiento de 24 hs en *L. tenuis* tolerante (T) como también en el control tanto del susceptible (S) como del tolerante (T) (Figura 8). En 35 ciclos, con una concentración de 2,5 ng/μL, se observó amplificación en el tratamiento, tanto a las 8 como a las 24 hs en *L. tenuis* susceptible y tolerante y en los controles sólo hubo amplificación a las 24 hs en ambas FMH (Figura 9).

Figura 8. Amplificación del fragmento transcripto en RT-PCR con 30 ciclos.

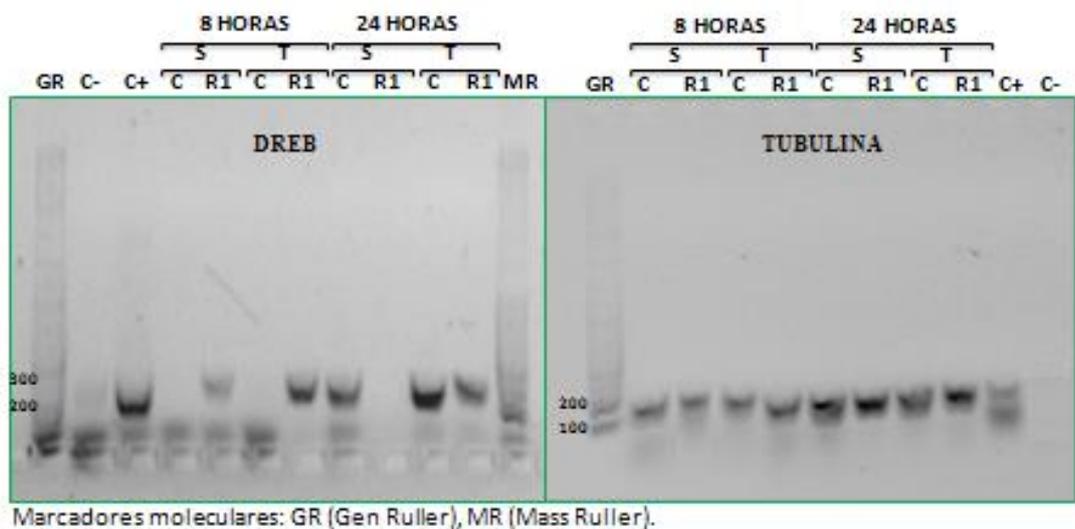
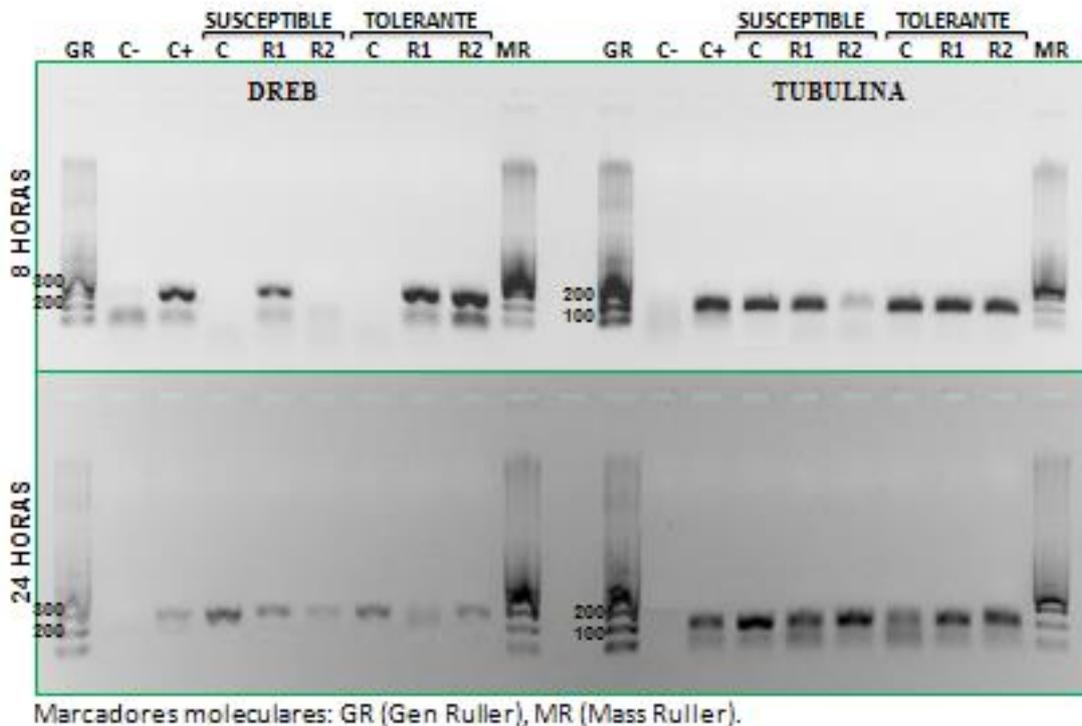


Figura 9. Amplificación del fragmento transcrito en RT-PCR con 35 ciclos.



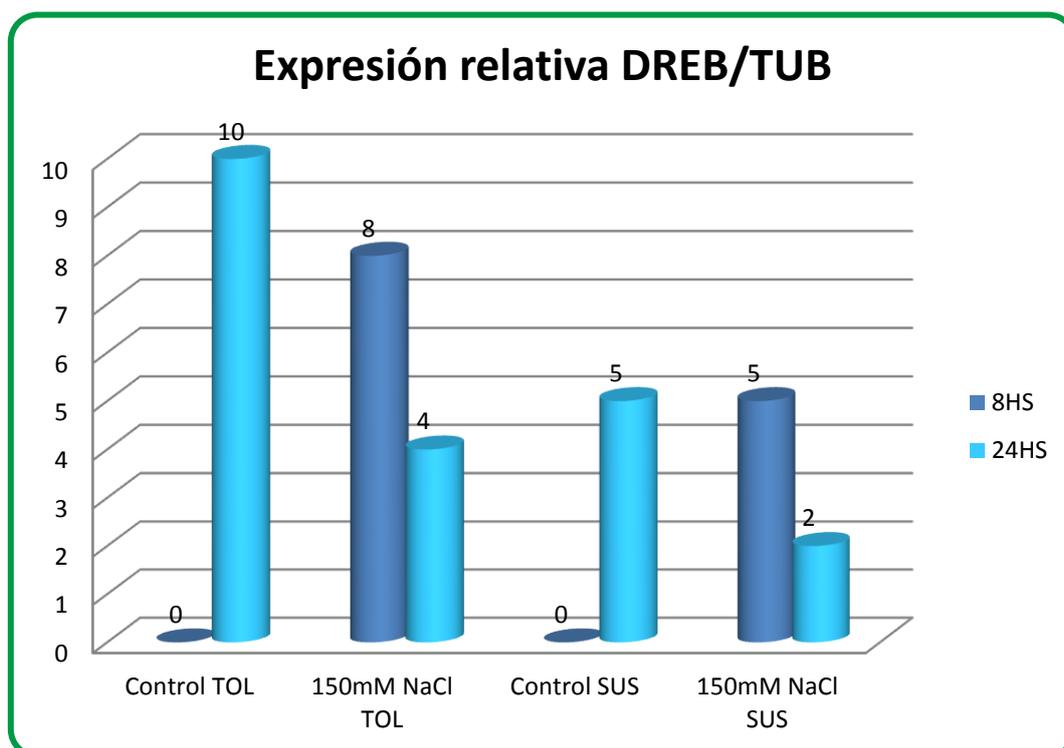
Medición de la expresión relativa DREB/TUB

Con respecto al análisis estadístico realizado en el Excel que compara la expresión relativa del gen en *L. tenuis* entre las FMH tolerantes y susceptible, tanto en el control como en el tratamiento con solución salina, y en ambos tiempos (8 y 24 hs), se puede observar (Figuras 10) que a las 8 hs no hay expresión en los controles en ninguna de las FMH, pero respecto de éste, sí presentan una sobreexpresión en el tratamiento con solución salina. En cambio, para las 24 hs se observa una sobreexpresión en el control de ambas FMH, respecto del tratamiento.

Si bien hubo expresión del gen en condiciones de estrés salino, se observó una sobreexpresión del control a las 24 hs respecto del tratamiento y a las 8 hs se observa a la inversa, es decir, una sobreexpresión del tratamiento respecto del control. Para comprobar estos resultados, es necesario repetir los experimentos en las mismas condiciones. Si comparamos entre ambas FMH observamos que la tolerante posee mayor expresión relativa que la susceptible. A su vez, como la expresión relativa del gen se da, tanto bajo condiciones de salinidad como en condiciones normales de crecimiento, podríamos suponer que la expresión del gen que codifica para un FT tipo DREB en *L. tenuis* no sólo podría estar relacionado a la salinidad, sino a otros factores distintos al estudiado.

Para confirmar el perfil de expresión sería necesario repetir el experimento bajo las mismas condiciones y realizar más experimentos de expresión relativa del gen.

Figura 10. Expresión relativa del supuesto DREB 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 (no hubo expresión del supuesto DREB).

Secuenciación y análisis *in silico*

Las condiciones de las muestras y los oligonucleótidos enviados a secuenciar como se describió en materiales y métodos se describen a continuación en la Tabla 8:

Tabla 8: Descripción de los fragmentos de PCR y RT-PCR purificados y enviados para secuenciación.

TEMPLADOS				PRIMER	
Muestra	Tipo de Muestra	Tamaño(pb)	Cuantificación	Primer	Tm
M1 ADN	PCR	259	10 ng/μL	DREB2 R	59,36
M2 ARN	RT-PCR	259	7,5 ng/μL	DREB2 R	59,36

Con el fragmento resultante de la amplificación por PCR enviado a secuenciación, se obtuvo un fragmento de 238 pb. El tBLASTx de la secuencia traducida resultó en similitud de la secuencia con factores de transcripción tipo DREB de otras especies de plantas (Tabla 11), lo cual indicaría que los oligonucleótidos son específicos y corresponden a una secuencia tipo DREB en *L. tenuis*.

En el caso del cADN, no se obtuvieron resultados. Esto creemos que se debió a una falla técnica en la preparación del fragmento para enviar a secuenciar, pero como los oligonucleótidos utilizados para amplificar el ADN por PCR fueron los mismos que para la amplificación por RT-PCR, podríamos inferir que el fragmento que amplifican es un DREB.

LOCUS AND TOL_DREB2R 238 pb
 DEFINITION AND TOL_DREB2R 238 pb

```

1          TCAT CATTGGTCTC TTCCCCATCA ATGGANGATG TCTCACTTGA
61  ATCATCTTTT GAATCAATGG CTATGATGGA ACCTTGGTAC AGCCTTGATG ATCTGCAATC
121 TTCTAAGTAT GTTGATCAGA TGCTAAGTGC TTCTTCTTTC TATGATATTG ATTCAACCCA
181 CCACCTGTTT GATGATGTGT ATGAAGAAAG TGACATTCGT TTGTGGAACT TTTGCTGA
  
```

Tabla 11. Comparación del resultado de la secuencia traducida contra el banco de proteínas del NCBI.

Origen	Descripción	e-value	ID (%)	Accesión en NCBI
Populus trichocarpa	Populus trichocarpa AP2/ERF domain-containing transcription factor (DREB41), mRNA	2e-05	17/36(47%) 8/13(62%)	XM_002300961.1
Populus trichocarpa	Populus trichocarpa AP2/ERF domain-containing transcription factor (DREB40), mRNA	2e-05	17/36(47%) 8/13(62%)	XM_002337011.1
Populus trichocarpa	Populus trichocarpa AP2/ERF domain-containing transcription factor (DREB39), mRNA	3.1	13/28(46%)	XM_002307391.1

4. CONCLUSIÓN

Luego de una amplia revisión bibliográfica acerca de las familias de FT relacionadas con la tolerancia a la salinidad, se seleccionó a la familia AP2/ERF, subfamilia DREB, ya que distintos estudios científicos realizados demostraron que los DREBs tienen una importante participación en la tolerancia al estrés salino en distintas especies de plantas (Agarwal *et al.*, 2006; Lata C. y Prasad M., 2011, Nakashima *et al.*, 2009; Fujita *et al.*, 2011), incluidas las especies del género *Lotus* (Sanchez *et al.*, 2008).

Según el estudio realizado por Sanchez *et al.*, (2008) en *L. japonicus*, que reporta la presencia de FT AP2/ERF, y a partir del experimento que detectó un FT tipo DREB (sonda TM07515.25) que presentó expresión aumentada en hojas bajo estrés salino, se utilizó la secuencia génica correspondiente a dicha sonda contra el banco de datos de *L. japonicus*, donde se encontró y seleccionó por su mayor grado de similitud el gen LjT35E05. Debido al parentesco entre *L. japonicus* y *L. tenuis*, se utilizó dicho gen para elaborar los oligonucleótidos para amplificación de posibles DREB en *L. tenuis*. Con los resultados de las muestras amplificadas enviadas a secuenciación, la secuencia traducida arrojó una similitud con un FT tipo DREB en *Populus trichocarpa*, por lo que podríamos concluir que los oligonucleótidos son específicos y corresponden a una secuencia tipo DREB en *L. tenuis*.

Con respecto al análisis de la expresión relativa de los FT tipo DREB bajo condiciones de salinidad, se observó expresión bajo estrés salino para ambas FMH, y en mayor grado en la tolerante. Así podríamos suponer que hay una relación entre la expresión del gen que codifica para un FT tipo DREB y la respuesta adaptativa al estrés salino en *L. tenuis*. No obstante, como también se observó expresión en condiciones normales de crecimiento, el gen no sólo podría estar relacionado con la respuesta al estrés salino sino a otros factores distintos al estudiado.

5. BIBLIOGRAFÍA.

- Agarwal, P.K.; Agarwal, P.; Reddy, M.K. y Sopory, S.K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25 (12): 1263-1274.
- Andrés, A. y Rosso, B. (2007). Characterization of *Lotus glaber* germplasm from Buenos Aires province – Argentina. *Lotus Newsletter*, 37 (1): 24.
- Batista, W.B.; Taboada, M.A.; Lavado, R.S.; Perelman, S.B. y León, R.J.C. Asociación entre comunidades vegetales y suelos en el pastizal de la Pampa Deprimida. En: M. Oesterheld, M. Aguiar, C. Ghera y J.M. Paruelo (eds.). *La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas. Un homenaje a Rolando.J.C León*. Buenos Aires, Argentina, Editorial Facultad de Agronomía, 2005, pág. 113-129.
- Buján, A. y Debelis, S. (2005). Los suelos de la Pampa Deprimida y su aptitud para la producción forrajera. In *Seminario Técnico Forrajes*, INTA Buenos Aires, Argentina. Marzo. 29-30. pág. 17-33.
- Burkart, S.E.; León, R.J.C. y Movia, C.P. (1990). Inventario fitosociológico del pastizal de la Depresión del Salado (Pcia. Buenos Aires) en un área representativa de sus principales ambientes. *Darwiniana* 30: 27-69.
- Franco, M.E. Estudio de la variabilidad genética en familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* sometido a estrés salino (Magister en Genética Vegetal). Universidad Nacional de Rosario-INTA Pergamino (2001).
- Fujita Y.; Fujita M.; Shinozaki K. y Yamaguchi:Shinosaki K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Reserch* 124 (4): 509-525.
- Gómez-Merino, F.C.; Trejo-Téllez, L.I. y Tiessen, A.. Factores de transcripción. En: Tiessen, A. (ed). *Fundamentos y Metodologías Innovadoras para el Mejoramiento Genético de Maíz*. Bogotá, Colombia, Fundación Ciencia Activa, 2009, pág. 151-188.
- García-Morales, S.; Gómez-Merino, F.C.; Trejo-Téllez, L.I. y Herrera-Cabrera, É.B. (2013). Factores de transcripción involucrados en respuestas moleculares de las plantas al estrés osmótico. *Revista Fitotécnia Mexicana*, 36 (2): 105-115.
- Lata, C. y Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62 (14): 4731-4748.
- Leidi, E.O. y Pardo, J.M. (2002). Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. *Revista de Investigación de la Facultad de Ciencias Agrarias, Rosario*. 2: pág. 70-91.

- Miaczynski, C.; Kade, M.; Collantes, M.B. y Santanatoglia, O.J. (1988). Distribución de especies en función de factores edáficos en un pastizal natural de la Depresión del Río Salado (Buenos Aires, Argentina). *Studia oecológica*. 5: 77-94.
- Miñon, D.; Sevilla, G.H.; Montes, L. y Fernández, O.N. (1990). *Lotus tenuis*: Leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. Cs. Agrarias-INTA Balcarce. Boletín Técnico n° 98: 16.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*. 25: 239-250.
- Muñiz García, Ma.N. y Capiati, D.A. (2011). Utilización de factores de transcripción como herramienta biotecnológica para incrementar la tolerancia a la sequía en plantas. *Revista Química Viva* (Buenos Aires, Argentina). 3: 1-13.
- Musto, J.C. y Maddaloni, J. Características y descripción de las principales áreas del ecosistema Templado Húmedo. En: Maddaloni J. y Ferrari L. (eds.). *Forrajeras y Pasturas del Ecosistema Templado Húmedo de la Argentina*. Buenos Aires, UNLZ-INTA, 2001. pág 24-36.
- Nakashima, K.; Ito, Y. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology*. 149: 88-95.
- Pesqueira, J. Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género *Lotus* bajo estrés salino (Tesis de Doctorado). Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Biología Vegetal (2008).
- Rosso, B.; Andrés, A. y Lavandera, J., (2008). Colecciones de germoplasma de dos especies forrajeras para suelos marginales. *Revista Argentina de Producción Animal*. 1 (28): 421.
- Sánchez, D.H.; Lippold, F.; Redestig, H.; Hannah, M.A.; Erban, A.; Krämer, U.; Kopka, J. y Udvardi, M.K. (2008). Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*. 53 (6): 973-987.
- Stoffella, S.; Posse, G. y Collantes, M., (1998). Variabilidad fenotípica y genotípica de poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH. *Ecología Austral*. 8 (1): 57-63.
- Teakle, N.L.; Flowers, T.J.; Real, D. y Colmer, T.D. (2007). *Lotus tenuis* tolerates the interactive effects of salinity and waterlogging by “excluding” Na⁺ and Cl⁻ from the xylem. *Journal of Experimental Botany*. 8 (58): 2169-2180.

- Teakle, N. L., Amtmann, A., Real, D., & Colmer, T. D. (2010). Lotus tenuis tolerates combined salinity and waterlogging: maintaining O₂ transport to roots and expression of an NHX1-like gene contribute to regulation of Na⁺ transport. *Physiologia plantarum*. 4 (139): 358-374.
- Wild, A., 2003. Soils, Land and Food: Managing the Land During the Twenty-First Century. Cambridge, Cambridge University Press, 2003, pág. 247.
- Zhao-Shi, Xu; Ming, Chen; Lian-Cheng, Li y You-Zhi, Ma. (2011). Functions and Application of the AP2/ERF Transcription Factor Family in Crop Improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*. 53 (7): 570-585