



XXIII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CA-029 (ID: 885)

Autor: Guidalevich, Verónica

Título: Análisis estructural de dos isoformas de la enzima NCED expresadas durante sequía en Yerba Mate

Director:

Palabras clave: Ilex paraguariensis, déficit hídrico, biosíntesis de ácido abscísico, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa

Área de Beca: Cs. Agropecuarias

Tipo Beca: Cyt - Pregrado

Periodo: 01/03/2016 al 28/02/2017

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Agrarias

Proyecto: (14A001) Caracterización y análisis de la expresión de genes asociados con la tolerancia a estrés osmótico y generación de procedimientos aplicables a la clonación masiva de genotipos tolerantes.

Resumen:

El cultivo de Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) es de gran importancia comercial en nuestro país, específicamente en las provincias de Corrientes y Misiones. Durante primavera y verano estas plantaciones sufren estrés por la escasez de precipitaciones acompañada de altas temperaturas, provocando una merma en el rendimiento potencial. El Ácido Abscísico (ABA) es una fitohormona que participa activamente en la respuesta adaptativa al estrés hídrico. Durante un episodio de sequía, los niveles de ABA se incrementan varias veces en sólo horas y luego decrecen durante la rehidratación. Con respecto a su biosíntesis, se ha propuesto que la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) sería la enzima reguladora más importante ya que su expresión se correlaciona muy bien con el contenido endógeno de ABA y su sobreexpresión confiere una acumulación significativa de ABA. La enzima NCED se encuentra codificada por una familia multigénica con diferentes isoformas, y estos se transcriben diferencialmente según el tipo de estrés y de forma específica para cada órgano de la planta. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente a dos transcritos de NCED expresados en hojas de Yerba Mate, y cuantificar sus variaciones de expresión a medida que avanza el estrés por sequía. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de estrés por sequía en plantas de Yerba Mate, dentro de una cámara con condiciones ambientales controladas. Se extrajeron muestras foliares de plantas en potencial agua del suelo igual a -0,04 y a -2 MPa, a partir de las cuales se extrajo ADN genómico y ARN total, este último utilizado para la síntesis de ADN copia por retrotranscripción. Mediante PCR y utilizando cebadores específicos diseñados sobre la región codificante del gen NCED, se logró amplificar dos variantes de este gen, tanto a partir de ADN genómico, como de ADN copia. Estas moléculas fueron clonadas en *Escherichia coli* cepa DH5 alfa, y fueron secuenciadas por el método de Sanger. Las regiones codificantes de ambas isoformas presentaron un 83% de similitud aminoacídica, y un 84% de similitud nucleotídica. Mediante Real-Time PCR se comprobó que, en hojas de plantas estresadas, la expresión total de NCED se incrementa a expensas de la sobreexpresión de la isoforma 2, pues la isoforma 1, predominante en condiciones adecuadas de hidratación, presenta una represión durante el estrés. La estructura 3D de ambas isoformas se modeló por homología con el programa MODELLER empleando como molde la estructura resuelta de la NCED de *Zea mays*, con alta homología de secuencia por ambas isoformas (~ 69%). Los modelos 3D resultantes fueron refinados mediante Simulaciones Largas de Dinámica Molecular (0.2 mseg por triplicado para cada isoforma) empleando el paquete Amber14. Finalmente, pudo observarse que la estructura consenso de la enzima NCED presenta un dominio de hélice enrollada de 7 láminas b dispuestas alrededor de un eje central donde se encuentra el sitio activo. Entre ambas isoformas no se encontraron diferencias estructurales en sus sitios activos, ni diferencias sustanciales en regiones cercanas a ellos. Sin embargo, la sustitución A459E sobre un loop cercano al sitio activo, podría estar implicada en un cambio conformacional, que podría influir sobre el modo y afinidad de unión del sustrato en el sitio activo.