



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Modalidad: Tesina

Título:

Caracterización del gen *NCED* en yerba mate, y análisis de la expresión de sus variantes en respuesta a déficit hídrico

Alumno: Verónica Guidalevich

Asesor:
Bioq. (Dr.) Raúl Maximiliano Acevedo

Año 2017

Lugar de Trabajo:

Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE. Química Orgánica y Biológica.
Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional. Sargent Cabral
231, Corrientes, Argentina.

RESUMEN:

El cultivo de yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) es de gran importancia comercial en nuestro país. En las plantaciones, tanto el aumento de la densidad, como el aumento de la radiación a la que la planta se ve sometida, facilita que en períodos ocasionales de escasas precipitaciones padezcan estrés por déficit hídrico, y su consecuente limitación en productividad. Los vegetales responden al estrés ambiental mediante diversos y complejos procesos fisiológicos y celulares que ocurren como consecuencia de cambios bioquímicos y de la expresión génica. Ante un déficit hídrico, se produce la inducción de genes que activan diferentes mecanismos y provocan una respuesta adaptativa al estrés. El Ácido Abscísico (ABA), es una fitohormona que participa activamente en la respuesta adaptativa al estrés hídrico. Su biosíntesis es regulada por numerosos genes, muchos de los cuales han sido estudiados y caracterizados en distintas especies. La enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), codificada por una familia multigénica, cataliza la reacción regulatoria más importante en la biosíntesis del ABA. A partir del secuenciamiento masivo del transcriptoma (RNA-seq) de *I. paraguariensis* se identificaron fragmentos de dos secuencias con alta homología al gen *NCED*. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente a ambas variantes del gen expresadas en hojas y analizar su respuesta al estrés por sequía. Para ello se llevaron a cabo reacciones de PCR con cebadores específicos para cada una, tanto en ADN genómico, como en ADN complementario, y sus amplicones resultantes fueron secuenciados (por el método de Sanger) y analizados con diversas herramientas bioinformáticas. Como resultado, se obtuvo la secuencia completa de ambas variantes (*NCED1* y *NCED2*), y se determinó que ambos genes no poseen intrones en su región codificante. Además, en la región promotora se identificaron elementos *cis* directamente relacionados con la regulación de su expresión. Finalmente, mediante Real-Time PCR se comprobó que la expresión total de *NCED* se ve incrementada por sequía, principalmente por un gran aumento en la transcripción de *NCED2*. Este trabajo presenta evidencia para la caracterización de ambas variantes del gen *NCED* expresadas en hojas de *I. paraguariensis*, y a su participación en la respuesta a estrés por déficit hídrico.

INTRODUCCIÓN:

El cultivo de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) es económicamente importante en la región NE de nuestro país debido a que sus hojas y tallos jóvenes son empleados en la elaboración de infusiones. La yerba mate es un árbol nativo del estrato medio de la Selva Paranaense que actualmente se cultiva de manera extensiva, este cambio de hábitat provoca que cada planta se vea expuesta a una mayor radiación solar, en contraste con el ambiente sombreado y húmedo del sotobosque, en el cual evolucionó. En la actualidad, este cultivo se maneja tanto de manera tradicional, como de manera sistematizada, con tendencia creciente hacia este último sistema de producción. A diferencia del manejo tradicional, las plantaciones con manejo sistematizado se llevan a cabo en marcos de plantación reducidos que resultan en densidades elevadas (3.000 a 4.000 plantas/hectárea) (Prat Kricun, 2011) y el consecuente aumento de la competencia entre plantas por los recursos disponibles. Por otra parte, cuando las altas temperaturas en primavera y verano coinciden con eventos de bajas precipitaciones, se reduce la disponibilidad hídrica del suelo y aumenta la demanda evaporativa de la atmósfera, provocando estrés por déficit hídrico al cultivo. En conjunto, estos factores disminuyen marcadamente la producción cuando coinciden con el período de crecimiento de la planta (Sansberro, 2000).

En general, las plantas responden al déficit hídrico y se aclimatan a las condiciones de sequía mediante una variedad de mecanismos fisiológicos, que se relacionan a cambios en la expresión génica (Chaves et al., 2003; Dubos y Plomion, 2003; Shinozaki et al., 2007). En las plantas superiores, el gen *NCED* codifica a la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (EC:1.13.11.51) la que cataliza el primer paso directamente comprometido en la biosíntesis de ácido abscísico (ABA) a partir de epoxicarotenoides, en respuesta a estrés por sequía (Qin y Zeevaart, 1999). El ABA es una fitohormona que se sintetiza en casi cualquier célula del vegetal (Jordán y Casaretto, 2006) y se encuentra involucrada en la regulación de diversos procesos del desarrollo, tal como la dormancia y germinación de semillas, el crecimiento vegetativo y la respuesta adaptativa al estrés ambiental (Xiong y Zhu, 2003). Esta hormona señala de manera temprana la situación de déficit hídrico y activa un gran número de mecanismos protectores aumentando la tolerancia de la planta a dicho estrés (Iuchi et al., 2001; Sansberro et al., 2004; Mehrotra et al., 2014).

El metabolismo del ABA se encuentra regulado por numerosos genes. Estos se transcriben diferencialmente según el tipo de estrés y de forma específica para cada órgano de la planta, reprimiéndose su expresión o promoviéndose en distintos niveles de acuerdo al estímulo recibido. En *Arabidopsis*, la mayor parte de los genes que codifican las enzimas participantes en la ruta biosintética del ABA ya han sido clonados, y/o sus funciones fueron caracterizadas gracias a estudios sobre mutantes deficientes en ABA. La biosíntesis de esta fitohormona ocurre en los plástidos, con excepción de los últimos dos pasos en que la xantoxina es convertida en ABA en el citosol (Seiler et. al, 2010). El primer paso en la ruta biosintética indirecta, correspondiente a vegetales, es la conversión de zeaxantina a trans-violaxantina mediante una epoxiodación en dos pasos (vía anteraxantina) catalizada por la enzima zeaxantina epoxidasa. En el siguiente paso, la trans-violaxantina es convertida en 9-cis-violaxantina o 9-cis-neoxantina, mediante una enzima isomerasa aún no caracterizada. En hojas de *Phaseolus vulgaris*, la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), ha sido localizada en cloroplastos, asociada a la membrana de los tilacoides (Qin y Zeevaart, 1999). La NCED cataliza la rotura oxidativa de la 9-cis-violaxantina o de la 9-cis-neoxantina para producir xantoxina, precursor directo del ABA. La xantoxina es exportada al citosol donde se transforma a aldehído abscísico el cual es luego oxidado a ABA. (Seiler et. al, 2010). En tejidos vegetativos sometidos a sequía, los niveles de ABA se incrementan varias veces en sólo horas (incremento causado por síntesis *de novo*) y luego decrecen durante la rehidratación. Con respecto a la biosíntesis, se ha propuesto que la NCED, identificada y clonada por primera vez en estudios realizados sobre mutantes *viviparous* de maíz deficientes en ABA (Nambara, 2017; Qin y Zeevaart, 1999), 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 (Jordán y Casaretto, 2006). Bajo tratamiento de deshidratación se detecta un aumento en los niveles de transcripción del gen NCED dentro de los 15 a 30 minutos, lo que indica que la activación de este gen puede ser casi inmediata en caso de estrés hídrico (Xiong y Zhu, 2003).

La expresión de esta enzima en diferentes tejidos y órganos durante diferentes estadios de crecimiento y desarrollo o como consecuencia de estímulos externos, es regulada a nivel transcripcional, postranscripcional y postraduccional. Se ha demostrado que la rotura oxidativa catalizada por la NCED es un paso determinante en la biosíntesis de ABA inducida por estrés hídrico tanto en hojas como raíces de poroto (*Phaseolus*

vulgaris) (Qin y Zeevaart, 1999). En general la regulación transcripcional desempeña el papel más importante en la activación y supresión de la expresión, y está controlado en gran parte a través de los promotores y sus elementos contribuyentes que actúan en *cis*. El interés biotecnológico de los promotores, se debe a que ofrecen la posibilidad de controlar la expresión génica con un buen grado de previsibilidad (Jin y Liu, 2008; Shah et al. 2013; Hernandez-García y Finer, 2014). Con los recientes avances en la tecnología transgénica, es posible diseñar plantas que expresan transgenes bajo el control de un promotor inducible por estrés, potenciando su capacidad para soportar condiciones adversas (Mehrotra et al., 2014; Cabello et al., 2014).

En el marco de la tesis doctoral del Dr. Raúl M. Acevedo se construyó una librería de ADN complementario con fragmentos de transcriptos sobreexpresados en hojas maduras como respuesta a sequía, entre los cuales se detectó el aumento de expresión de una variante del gen *NCED*. Posteriormente por datos obtenidos en el secuenciamiento masivo del transcriptoma (RNA-seq) se identificaron fragmentos de dos secuencias con alta homología al gen *NCED*, una de ellas disminuye su expresión durante la aclimatación de la planta a sequía, mientras que la otra aumenta de manera significativa. Esta evidencia previa sustenta el presente trabajo. Para convalidar y ampliar estos datos, se utilizarán tecnologías y métodos que actualmente son considerados “confirmatorios.”

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar molecularmente al gen *NCED* y analizar su respuesta al déficit hídrico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Secuenciar la región codificante del gen y su región 5' cercana a partir de ADN genómico.
2. Identificar en su región 5' cercana, factores *cis* involucrados en la regulación de la expresión del gen, y en particular los de respuesta a déficit hídrico.
3. Secuenciar los transcriptos de las variantes del gen a partir de ADN complementario obtenido por retrotranscripción del ARN mensajero.
4. Identificar los exones e intrones de cada variante del gen.
5. Cuantificar la expresión de cada variante del gen *NCED* en hojas de plantas sometidas a estrés por déficit hídrico y compararlas con plantas irrigadas adecuadamente.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Material vegetal y ensayo de estrés por sequía:

Se trabajó con plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) del cultivar San Isidro 49 de dos años de edad, crecidas en macetas de 4 L de capacidad contenido suelo rojo laterítico y bajo condiciones de invernáculo. Dichas plantas fueron irrigadas hasta capacidad de campo (CC), donde el potencial agua del suelo (Ψ_{suelo}) es aproximadamente -0,04 MPa. Luego fueron introducidas en una cámara climatizada bajo condiciones controladas (Temperatura: 27±1 / 22±2°C, día/noche; Humedad Relativa: 48-50 / 60-65%, día/noche; Luz: 420 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR, con un fotoperíodo de 14 h). Cada maceta fue sellada con papel aluminio después de la irrigación con el fin de evitar la pérdida de agua por evaporación de la superficie del suelo y provocar una disminución lenta del potencial agua edáfico, imitando un proceso gradual que la planta experimentaría en condiciones de campo. El riego se suspendió hasta que el Ψ_{suelo} alcanzó -2 MPa. Se tomaron muestras foliares de plantas en $\Psi_{suelo} = -0,04$ y -2 MPa, que fueron congeladas en N₂ líquido y posteriormente conservadas a -80 °C hasta su utilización.

Extracción de ADN genómico:

El ADN genómico (ADNg) se obtuvo a partir de muestras de hojas conservadas a -80 °C. Para ello se utilizó el kit comercial “DNeasy® Plant Mini Kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN se analizó en un gel de agarosa 1,5 % (p/v) TBE 0,5 X teñido con “GelGreen” (Biotium). Las muestras de ADN fueron cuantificadas por absorción a 260 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) considerando 1 unidad de absorbancia a 260 nm de longitud de onda, equivalente a 50 μg de ADN de cadena doble/mL.

Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario:

A partir de las muestras foliares tomadas del ensayo de estrés por sequía, se extrajo ARN total haciendo uso del kit comercial “SV Total RNA Isolation System” (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit incluye el tratamiento con DNase I, para eliminar la posible presencia de ADN genómico en la muestra. El eluido resultante, contenido el ARN total, se almacenó a -20°C. La concentración del ARN

total se determinó por absorción a 260 nm utilizando un espectrofotómetro, considerando 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivalente a 40 µg de ARN de cadena simple/ml. Su pureza fue estimada por las relaciones de absorción a 230, 260 y 280 nm (A260/A280 y A260/A230). La integridad del ARN total aislado fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) con solución buffer TAE 1X; y tinción con “GelGreen” (Biotium).

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó con el kit “SuperScript™ II” (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando un oligo (dT)₂₀ como cebador. Las soluciones resultantes de la retrotranscripción se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Amplificación de la región codificante de dos isoformas, en ADNc y ADNg:

Se llevaron a cabo reacciones de PCR empleándose para ello un volumen final de 25 µL, conteniendo 2,5 µL de Buffer BD, 2 µL de MgCl₂ 2 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM de cada uno, 1U de la enzima ADN polimerasa “Firepol Hotstart”, 2,5 µL de cada uno de los cebadores (Forward y Reverse) diseñados para abarcar la región codificante de dos variantes de *NCED* (obtenidas previamente por el Dr. Acevedo mediante RNA-seq.). Los cebadores “CDS” abarcan completamente la región codificante del gen *NCED* (Tabla 1) y los cebadores “Fragmentos” abarcan la región codificante del gen en forma parcial, de tal manera que al solaparse sus amplicones, se cubre la región codificante completa de cada isoforma. (Tabla 2). Se utilizaron como molde 2 µL de ADN genómico (dilución 1/40) y ADNc (dilución 1/20) obtenidos previamente. El ciclo de las reacciones consistió en una etapa inicial de activación de la ADN polimerasa (Hotstart) de 12 minutos a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 40 segundos a 62°C, y 2 minutos a 72°C, seguidos de una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Tabla 1. Cebadores “CDS”.

| Gen | Cebador | Sentido | Secuencia | Longitud (Bases) | Inicio | Amplicón (pb) |
|--------------|---------|---------|-----------------------------|------------------|--------|---------------|
| <i>NCED1</i> | CC1 | F | CAATTAAAGCAACCCATCTCAGTGA | 25 | -46 | 1950 |
| | CC2 | R | GAAGATGATGGTCATAATGTTGATAG | 28 | 1905 | |
| | CC3 | F | ATGGCTCTGCAACACCACCTTC | 23 | 1 | 1873 |
| | CC4 | R | AACCCAAGCCTGATTTGGATAAAAGG | 26 | 1873 | |
| <i>NCED2</i> | CC5 | F | CACTACACACAAGAACCTATCCTAGTA | 27 | -49 | 1920 |
| | CC6 | R | ATTGCTTGAAGATTGTGGGTATGAT | 26 | 1872 | |
| | CC7 | F | CATGGCTGCTTCAACTACTATTGTT | 25 | -1 | 1836 |
| | CC8 | R | CAAAAGATTTGGAAAATCAGGCCTA | 25 | 1835 | |

Tabla 2. Cebadores “Fragmentos”.

| Gen | Cebador | Sentido | Secuencia | Largo (Bases) | Inicio | Largo del Amplicón |
|--------------|---------|---------|-----------------------|---------------|--------|--------------------|
| <i>NCED1</i> | CF1 | F | CTCCCTCCGTCTCTCCTCAA | 20 | -147 | 1317 pb. |
| | CF2 | R | GATTTCGAAATGGTCCGCG | 20 | 1171 | |
| | CF3 | F | CCACCTCCATCTCACCTCCA | 21 | 256 | 537 pb. |
| | CF4 | R | GATCACAATCACGGCACCGGA | 21 | 792 | |
| | CF5 | F | GAAGCTGACCCAGTTCCG | 20 | 951 | 1034 pb. |
| | CF6 | R | CCGGAGTCTCCTAGCTGGTT | 20 | 1984 | |
| <i>NCED2</i> | CF7 | F | TTCCCCACTCTCGTTCTCT | 20 | -150 | 812 pb. |
| | CF8 | R | TGTTAGGCCGTCCCTGTGTT | 20 | 663 | |
| | CF9 | F | AGTCCAAATGCCGGAAACT | 20 | 393 | 554 pb. |
| | CF10 | R | GAAGCTGACCCAGTTCCA | 20 | 946 | |
| | CF11 | F | CGAGTGTAGGCCGTCCGTG | 21 | 640 | 1328 pb. |
| | CF12 | R | CCCCGGAATCTCCTAGCTGGT | 21 | 1967 | |
| | CF2 | R | GATTTCGAAATGGTCCGCG | 20 | 1147 | |

Separación de moléculas de ADN por electroforesis y tinción:

La muestra de ADN se sembró, en un gel de agarosa al 2,5% (p/v) en buffer TAE 1X. La electroforesis se realizó utilizando una diferencia de potencial constante de 5 V.cm⁻¹ durante aproximadamente 40 minutos. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con el buffer de siembra en una proporción 5+1. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb para poder estimar los tamaños de los fragmentos. Una vez finalizada la electroforesis, se sumergió el gel en una solución de tinción con “GelGreen”, durante 30 minutos y se utilizó un transluminador de luz azul ($\lambda=465$ nm) para visualizar las bandas.

Extracción de ADN de los geles de agarosa:

Se empleó el kit “AccuPrep® GEL Purification” (Bioneer) para extraer los amplicones seleccionados del gel de agarosa. A tal fin, las porciones de gel con bandas del tamaño esperado se recortaron cuidadosamente con un bisturí estéril y se introdujeron en tubos de 1,5 mL. Por cada 100 mg de gel, se agregaron 300 μ L del *Gel Binding Buffer* (Buffer 1) y se incubó a 60°C agitando con vortex cada 3 minutos hasta la disolución completa del gel. La solución resultante se transfirió a una columna conteniendo una membrana de silice (*DNA binding column tube*) incluida en el kit, incubada por no menos de 1 minuto a temperatura ambiente y luego separada por centrifugación (13.000 rcf por 1 minuto), descartándose el eluido. A continuación, la membrana se lavó dos veces con 500 μ L de *Washing Buffer* (Buffer 2) forzando su paso por centrifugado a 13.000 rcf durante 1 minuto, y se descartó la solución eluida en

ambos casos. Finalmente, el ADN fue eluido de la membrana en un tubo limpio de 1,5 mL por agregado de 30 μ L del *Elution buffer* (Buffer 3) en el centro de la membrana y centrifugación a 13.000 rcf durante 1 minuto. El ADN eluido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

RAGE (Random Amplification of Genomic Ends):

Para secuenciar la región promotora del gen se utilizó la técnica de RAGE (Kuriakose et al., 2009). Inicialmente, se realizaron 5 digestiones independientes de ADNg utilizando enzimas de restricción de corte romo (Tabla 3).

Tabla 3. Enzimas de restricción utilizadas para RAGE. La barra vertical indica el sitio del corte.

| Enzimas | Secuencias Reconocidas |
|---------|--|
| EcoRV | 5' ... GAT ATC ... 3' 3' ... CTA TAG ... 5' |
| DraI | 5' ... TTT AAA ... 3' 3' ... AAA TTT ... 5' |
| ScaI | 5' ... AGT ACT ... 3' 3' ... TCA TGA ... 5' |
| SspI | 5' ... AAT ATT ... 3' 3' ... TTA TAA ... 5' |
| SnaBI | 5' ... TAC GTA ... 3' 3' ... ATG CAT ... 5' |

Se utilizó un volumen final de 50 μ L por reacción, conteniendo: 37,5 μ L de agua ultra pura, 5 μ L de solución buffer, 5 μ g de ADNg, y 5 μ L de una de las enzimas de restricción. Las reacciones se llevaron al termociclador a 37°C durante 30 minutos. Para la ligación de adaptadores se trabajó con un volumen final de 20 μ L conteniendo 11 μ L de agua ultra pura, 2 μ L de solución buffer 10X, 2 μ L de 50% PEG 4000, 2 μ L de adaptadores 50 μ M, 2U de T4 ADN Ligasa y 1 μ L del ADNg digerido. Las reacciones se llevaron nuevamente a termociclador durante 60 minutos a 22°C y 10 minutos a 65°C para inactivación de las enzimas.

El kit “AccuPrep® PCR Purification” (Bioneer) se utilizó para purificar los productos de las ligaciones según las instrucciones del fabricante. Para ello se añadió 100 μ L de *PCR Binding Buffer* (Buffer 1) a cada reacción de 20 μ L y se homogeneizó con vórtex. La solución resultante se transfirió a una columna conteniendo una

membrana de silice (*DNA binding column tube*) incluida en el kit, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente, y luego se separó por centrifugación (13.000 rcf, durante 1 minuto), descartándose el eluido. A continuación, la membrana se lavó dos veces con 500 µL de *Washing Buffer* (Buffer 2) forzando su paso por centrifugado a 13.000 rcf por 1 minuto, y se descartó el eluido en ambos casos. Finalmente, el ADN fue eluido de la membrana en un tubo limpio de 1,5 mL por agregado de 30 µL de agua ultra pura en el centro de la membrana y centrifugación a 13.000 rcf durante 1 minuto.

Para la amplificación por PCR en el método de RAGE, se utilizó un volumen final de 25 µL conteniendo 1U de la enzima ADN polimerasa “Firepol Hotstart”, 2,5 µL de 10x Buffer BD, 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µL de dNTP mix (10 mM c/u), 2,5 µL de Cebador Forward (ADAPrimer1) 2 µM, 2,5 µL de Cebador Reverse (gen específico para cada isoforma) 2 µM (Tabla 4), y 2 µL de Molde (ADNg digerido con adaptadores ligados).

El ciclo de las reacciones consistió en una etapa inicial de 12 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 64°C, y 4 minutos a 72°C. El producto de PCR se utilizó como molde para una segunda reacción PCR anidada con un volumen final de 25 µL y para la cual se utilizaron como cebadores ADAPrimer2 (Forward) y cebadores específicos para cada isoforma (Reverse) (Tabla 5). Se utilizó el mismo protocolo que en la primer PCR de RAGE. Finalizada la reacción se llevó a cabo la separación de fragmentos de ADN por electroforesis. Aquellos fragmentos que superaron las 700 pb en todos los casos fueron recortados cuidadosamente del gel de agarosa para purificarlos. A tal fin se utilizó el kit “AccuPrep® Gel Purification” (Bioneer) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 4. Cebadores Reverse de RAGE utilizados para cada isoforma y ADAPrimer1:

| | Sentido | Secuencia | Longitud | Inicio |
|-------------------|----------------|-----------------------------|-----------------|---------------|
| Isoforma 1 | R | ATCTCCACCTCCATCTCCACCTCCA | 25 bases | 276 |
| Isoforma 2 | R | TGGAGAGCGCATTAACGGAGCGCGA | 25 bases | 356 |
| ADAPrimer1 | F | GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC | 27 bases | - |

Tabla 5...Cebadores Reverse de RAGE anidada utilizados para cada isoforma y ADAPrimer2:

| | Sentido | Secuencia | Longitud | Inicio |
|-------------------|----------------|------------------------|-----------------|---------------|
| Isoforma 1 | R | CATATGGCAAGGTGCTTGA | 20 bases | 214 |
| Isoforma 2 | R | GTAAATGCGCTCTCCACTGC | 20 bases | 347 |
| | R | TGGTGGCGATAACTGGACTAGA | 22 bases | 229 |
| ADAPrimer2 | F | ATAGGGCTCGAGCGGC | 16 bases | - |

Ligación de fragmentos de ADN en un plásmido vector:

Los fragmentos de ADN purificados fueron ligados en el plásmido “pGEM[®]-T Easy Vector” (Promega). Para ello, en un tubo de reacción de 0,2 mL se mezclaron 2,5 µL de la solución *2X Rapid Ligation Buffer*, 0,5 µL del plásmido linealizado (25 ng), 1,5 µL del producto de PCR purificado, 0,5 µL de la enzima *T4 ADN Ligasa* (3 Unidades Weiss/µL), y se incubó 1 hora a temperatura ambiente y finalmente por el lapso de una noche a 4°C. Por último, el plásmido recircularizado contenido el inserto de ADN ligado, se conservó a -20°C hasta su utilización.

Obtención de Bacterias competentes para transformación:

Las bacterias competentes para transformación fueron obtenidas siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001), mediante el uso de cloruro de calcio. Brevemente, 100 mL de medio LB sin antibiótico fueron inoculados con un cultivo fresco saturado de bacterias *Escherichia coli* DH5 α e incubados a 37°C con agitación (190 - 200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm, igual a 0,5. Posteriormente, el cultivo fue enfriado en agua helada durante 15 a 30 minutos y centrifugado a 2700 rcf durante 10 minutos a 4°C. Una vez eliminado totalmente el medio, las bacterias precipitadas fueron resuspendidas suavemente en 30 mL de una solución fría de MgCl₂ 80 mM, CaCl₂ 20 mM y nuevamente centrifugadas. Finalmente, fueron resuspendidas en 4 mL de una solución fría de CaCl₂ 100 mM, glicerol 30% y congeladas a -80°C hasta su uso.

Transformación de Bacterias competentes:

Las transformaciones de bacterias con los productos de ligación fueron realizadas mediante el procedimiento de *shock térmico* (Sambrook y Russell, 2001). Para tal fin, se diluyeron 5 µL de la reacción de ligación almacenada en un tubo de reacción de 2 mL con 100 µL de bacterias competentes. Esta solución fue mezclada suavemente, se incubó en hielo por 10 minutos, luego en baño de agua a 42°C por 45 segundos y finalmente en hielo por otros 5 minutos. Luego del shock térmico, a la suspensión de bacterias se le adicionaron 500 mL de medio de cultivo LB sin antibiótico, se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por 1 hora en agitación. A continuación, se sembraron 100 µL de la suspensión en placas con medio LB/agar con ampicilina 100 µg/mL, y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-gal) 50 µg/mL. Las placas sembradas fueron incubadas en estufa por 16-20 horas a 37°C.

Posteriormente se tomaron colonias blancas de las placas sembradas y se subcultivaron en nuevas placas de medio LB/agar con ampicilina y X-gal, se las almacenó a 37°C durante 16-20 horas. Las colonias blancas obtenidas se consideran transformadas y fueron utilizadas más adelante como molde para una *Colony PCR*.

Colony PCR para amplificación de fragmentos clonados:

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L. La mezcla de reacción consistió en: 2,5 μ L de *Buffer BD*, 2 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0,5 μ L de dNTP Mix (10 mM c/u), 2,5 μ L de los cebadores Forward y Reverse específicos (2 μ M c/u), 1U de la enzima ADN polimerasa “Firepol Hotstart” y como molde de amplificación se utilizó una pequeña porción de las colonias transformadas con los insertos de interés. El protocolo de PCR consistió en una primera etapa de activación de la polimerasa de 12 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de amplificación de 40 segundos a 95°C, 2 minutos a 60°C y 2 minutos 30 segundos a 72°C. Tras el último ciclo se finalizó la reacción con una etapa de extensión de 5 minutos a 72°C. Se realizó la siembra de los productos de PCR en gel de agarosa para corroborar el tamaño de los insertos. Por último, se purificaron las reacciones haciendo uso del kit comercial “AccuPrep® PCR Purification” (Bioneer) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las purificaciones fueron enviadas al servicio de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA (Hurlingam, Bs. As.) para su secuenciación.

Análisis comparativo de las NCED aisladas:

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de los fragmentos aislados fueron alineadas de manera global, siguiendo el algoritmo de Needleman-Wunsch, tal como está implementado en la herramienta (en línea) EMBOSS Needle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) utilizando los parámetros definidos por defecto.

Análisis de similitud con otras NCED de especies vegetales:

A partir de las secuencias aminoacídicas deducidas para ambas variantes del gen NCED se realizó una búsqueda por similitud en las bases datos pública *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). Paralelamente se realizó una búsqueda por anotación en *UniProt* (<http://www.uniprot.org/>) para secuencias reconocidas como NCED. Las secuencias aminoacídicas obtenidas fueron alineadas con el programa

ClustalX 2.1, y con la matriz generada en el alineamiento se construyó un árbol de distancias, mediante el método de Neighbor-Joining utilizando el programa *MEGA6*.

PCR en Tiempo Real:

Los niveles de expresión de ambas isoformas se cuantificaron por PCR en Tiempo Real en tres plantas en condiciones control ($\Psi_{suelo} \sim -0,04$ MPa) y en tres plantas estresadas por déficit hídrico ($\Psi_{suelo} = -2$ MPa, utilizando un equipo *ABI 7500* (Applied Biosystems). Se trabajó con cebadores específicos para cada gen (Tabla 6) y como referencia interna se utilizó el gen *RTF* que codifica la “proteína RTF1 asociada a la ARN polimerasa.” En reacciones con un volumen final de 15 μ L, cada combinación muestra/gen se analizó por triplicado. Para ello se mezclaron 7,5 μ L de Master Mix SYBR Select (Applied Biosystems), 10 ng de ADNc y cebadores en una concentración final de 300 nM.

Tabla 6. Cebadores utilizados en la PCR en Tiempo Real.

| Gen | Sentido | Secuencia del cebador | Longitud | Inicio | Producto de PCR |
|---------------|---------|------------------------|----------|--------|-----------------|
| <i>NCED 1</i> | F | TGGAGGCAGGAATGGTGAACA | 21 bases | 1484 | 106 pb. |
| | R | ATCGGGTTTGCTAAAGTGGA | 21 bases | 1589 | |
| <i>NCED 2</i> | F | GGTCATGTATGACTCCACCGGA | 22 bases | 1316 | 139 pb. |
| | R | TCACAAATCCGGCCGATCAAGT | 22 bases | 1454 | |
| <i>RTF</i> | F | AGAGGGCTGCTCTGAAATGC | 20 bases | - | 85 pb. |
| | R | TGAACTCGAACCTCGTCGTC | 20 bases | - | |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Secuenciar la región codificante del gen y su región 5' cercana a partir de ADN genómico.

Se obtuvo ADNg de buena calidad a partir de brotes de hojas de *Ilex paraguariensis*, y su integridad fue corroborada en un gel de agarosa (Fig. 1).

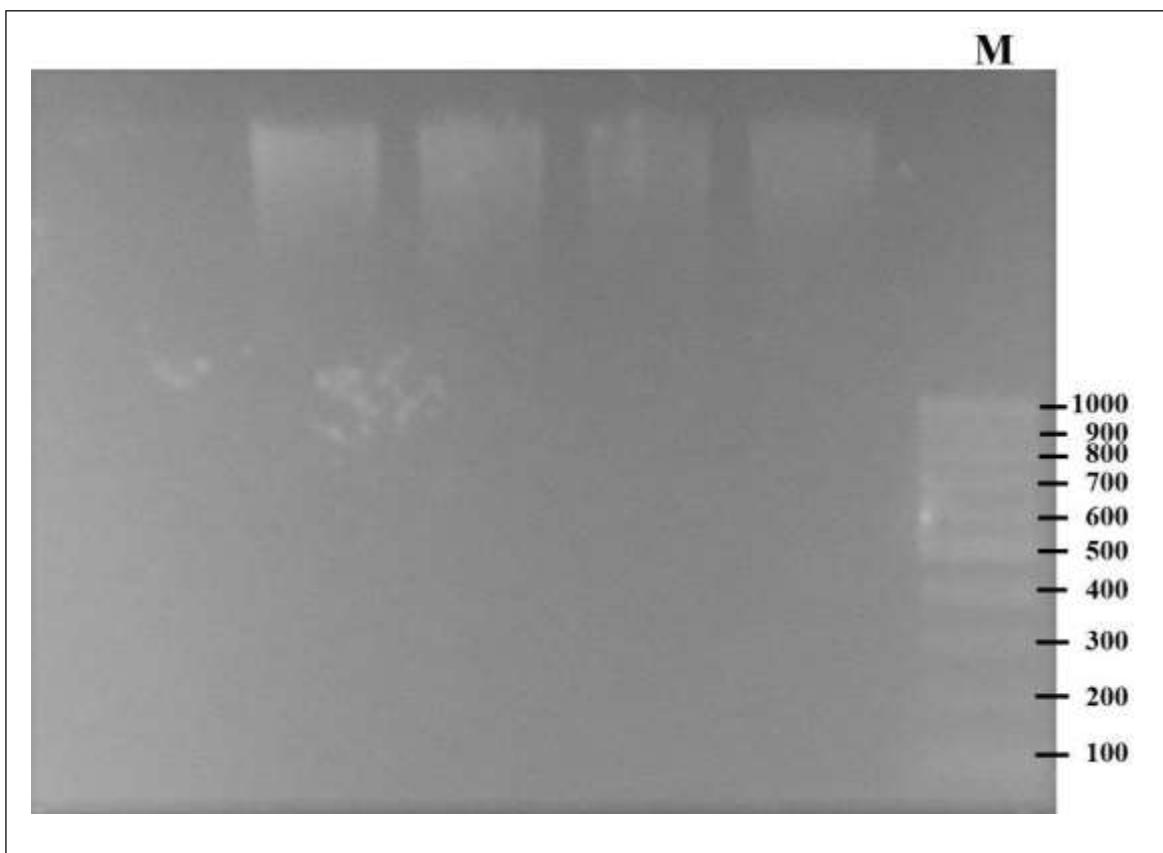


Figura 1. Bandas de ADNg en gel de agarosa 1,5 % (p/v) TBE 0,5 X teñido con GelGreen.

Se utilizó este ADNg como molde y los cebadores diseñados para las dos variantes del gen *NCED* (Tabla 1 y 2) en reacciones de PCR. Se lograron amplificar 5 fragmentos para la *NCED1* y 4 para la *NCED2* (Fig. 2) que cubren por completo las regiones codificantes de cada una.

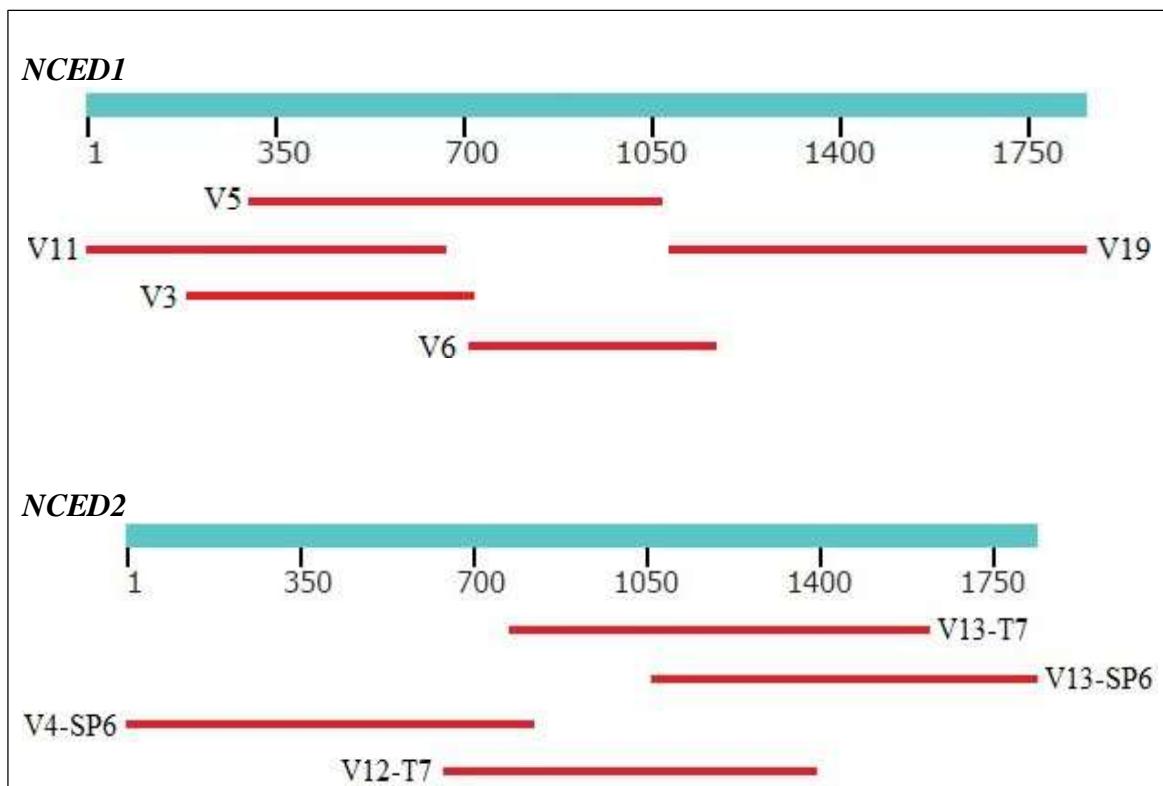


Figura 2. Esquema de los fragmentos de ambas variantes del gen *NCED*, secuenciados a partir de ADNg.

Los fragmentos secuenciados fueron alineados y ensamblados (Tabla 7), así se verificó que la región codificante de *NCED1* cuenta con 1.860 pares de bases y codifica una cadena polipeptídica de 619 aminoácidos. De la misma manera, la región codificante de *NCED2* cuenta con 1.836 nucleótidos, que se traducen en una proteína de 611 aminoácidos. Las proteínas resultantes de la traducción de ambas variantes de *NCED* tienen una longitud similar a la NCED3 de *Arabidopsis thaliana* (Q9LRR7) de 599 aminoácidos (Iuchi et al., 2001), NCED1 de *Solanum lycopersicum* (O24023) con 605 aminoácidos, NCED2 de *Vitis vinifera* (Q5SGD0) de 605 aminoácidos, VP14 de *Zea mays* (O24592) de 604 aminoácidos y a la NCED3 de *Nicotiana tabacum* (A0A0N7CTG4) de 609 aminoácidos, todas ellas fueron obtenidas de la base de datos de *UniProt* (<http://www.uniprot.org/>).

Tabla 7. Detalles de los fragmentos de ambas variantes del gen *NCED*, secuenciados a partir de ADNg.

| Gen | Secuencia | Longitud (bases) | Inicio | Final | Cobertura(%) |
|--------------|--------------------|------------------|--------|-------|--------------|
| <i>NCED1</i> | Región codificante | 1.860 | 1 | 1.860 | 100,00 |
| | V5-T7-ADNg | 771 | 301 | 1.071 | 41,45 |
| | V19-SP6-ADNg | 789 | 1.085 | 1.860 | 42,42 |
| | V11-T7-ADNg | 670 | 1 | 670 | 36,02 |
| | V3-T7-ADNg | 538 | 186 | 723 | 28,92 |
| | V6-SP6-ADNg | 460 | 711 | 1.170 | 24,73 |
| <i>NCED2</i> | Región codificante | 1.836 | 1 | 1.836 | 100,00 |
| | V13-T7-ADNg | 847 | 773 | 1.619 | 46,13 |
| | V4-SP6-ADNg | 870 | 1 | 822 | 47,39 |
| | V13-SP6-ADNg | 911 | 1.057 | 1.836 | 49,62 |
| | V12-T7-ADNg | 751 | 640 | 1.390 | 40,91 |

Al comparar las regiones codificantes de ambas variantes de NCED se determinó un 84,3% de identidad nucleotídica (Fig. 3 y 4); y un 82,6% de identidad aminoacídica (Fig. 5 y 6) entre ellas.

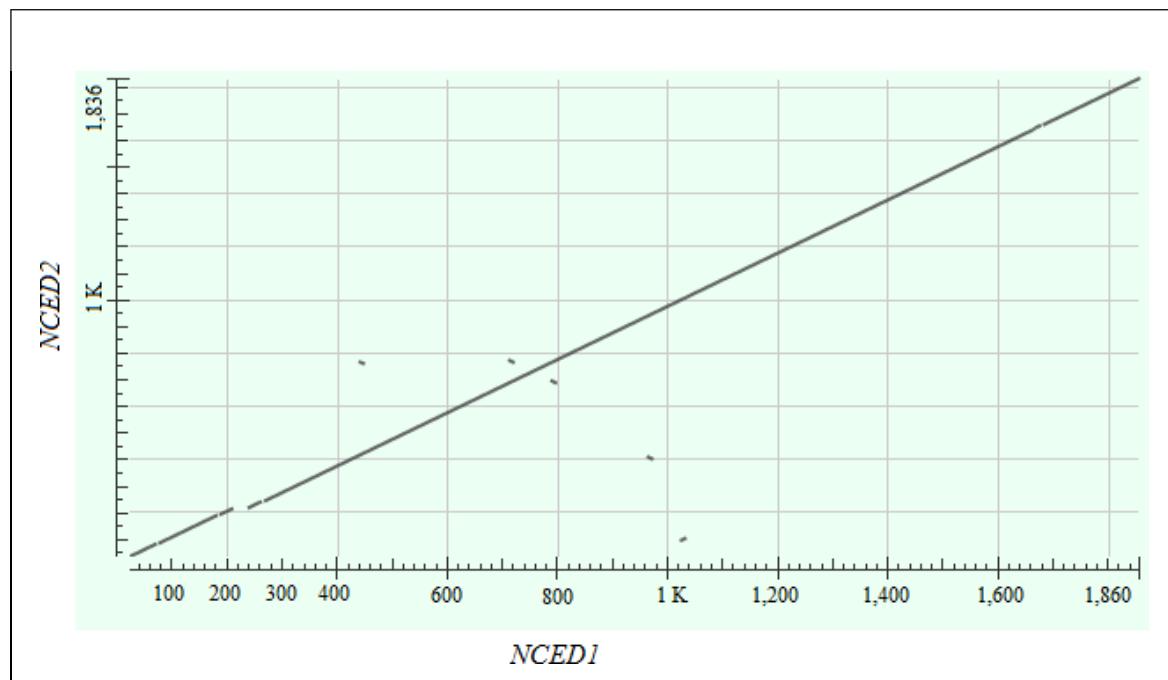


Figura 3. Comparación de las regiones codificantes de *NCED1* y *NCED2*, mediante un diagrama de puntos.

| | | | | | |
|--------------|-----|---|-----------------------------|----------------------|-----|
| <i>NCED1</i> | 1 | ATGGCTCTGCAAC | -----ACCAC | ---CTTCTTCAAGTACTTGG | 36 |
| <i>NCED2</i> | 1 | ATGGCTCTCAACTACTATTGTTACTACTACACT | --TTCAAGTTCATGG | | 48 |
| <i>NCED1</i> | 37 | TTGAAGCCAAAATCTCCATTCTTCAAGAGAACTGTTGGGTTCTTC | | | 86 |
| <i>NCED2</i> | 49 | GTAAGCCAAAATCTACACTTCATCATCAA | --AATACTTGGGCTCTTC | | 95 |
| <i>NCED1</i> | 87 | ATCCAGTTCAGTCTCTTCAACAAACCCAAATAAAGAACATACAGCATTAAATT | | | 136 |
| <i>NCED2</i> | 96 | TTCAAATTCTCTCTTCAACAAACCCAAATAGACAAACACTCCATTGATT | | | 145 |
| <i>NCED1</i> | 137 | GCTCTCTCCAAAACCTCTCAATTCTCCATTCCAAAACAGTCTTCTTCG | | | 186 |
| <i>NCED2</i> | 146 | TCTCTCTCCAAAACCTCTCAATCCCCATTGCCAAAGCA | --ATCTTCA | | 192 |
| <i>NCED1</i> | 187 | ACAATTATCAAGCACCTGCCATATGAAAGCTCTTCTCATCTCCTTC | | | 236 |
| <i>NCED2</i> | 193 | AAAACCTATCAAACATCTAGTCCA | ----- | | 216 |
| <i>NCED1</i> | 237 | CTTATCTCAATCTCATCTCACCTCCATCTCACCTCCATCTCCATCTT | | | 286 |
| <i>NCED2</i> | 217 | GTATGCCACCACCATCCCA | ---CATACCCAAATCAAACCTCTTCTT | | 262 |
| <i>NCED1</i> | 287 | CATCTTCATCTTCTCAAGCCACAATGGAATT | -TACTACAGAGAGCAGC | | 335 |
| <i>NCED2</i> | 263 | CATCTTCATCTCGTCAATCCAACAATGGAATTATA | -TTCAGAAAGCGGC | | 311 |
| <i>NCED1</i> | 336 | ATCAATGGCGTAAACGCACTGGAGAGCGCGTTAACGGCACCGAGCTTG | | | 385 |
| <i>NCED2</i> | 312 | AGCAATGGCCCTAGACGCAGTGGAGAGCGCATTAACGGAGCGCAGCTTG | | | 361 |
| <i>NCED1</i> | 386 | AGCAACCTTGGCGAAAACAGCGAACCCGGAGTCAAATTGAGGCAAC | | | 435 |
| <i>NCED2</i> | 362 | AGCACCCCTTGCCTAAACAGCTGACCCCTCGAGTCAAATGCCGGAAAC | | | 411 |
| <i>NCED1</i> | 436 | TTTGCTCCGGTGCCTAACAGCCGCTGTGTTACTCACTTCCGGTACCGG | | | 485 |
| <i>NCED2</i> | 412 | TTCGCTCCAGTACCAAGAACACAACAGCTCCGGCAGTCACTTCCGGTCAACGG | | | 461 |
| <i>NCED1</i> | 486 | AAAAATACCGAATGCGTACAAGGTGTTATGTCGGAACGGCGCAACC | | | 535 |
| <i>NCED2</i> | 462 | AACAATACCGAATGCGTACAAGGCGTATGTCGGAACGGCGCAACC | | | 511 |
| <i>NCED1</i> | 536 | CTTATTTGAACCCGTCGCCGGACACCACTTCTCGACGGCAGGGCATG | | | 585 |
| <i>NCED2</i> | 512 | CTTATGTGAACCGAGTCGCCGGCACCACTTCTTGTGGCACGGCATG | | | 561 |
| <i>NCED1</i> | 586 | GTCACGCCGTCAATTCAAGAACGGGTCAGCAAGCTACGCTTGGCGTT | | | 635 |
| <i>NCED2</i> | 562 | GTCACGCCGTCCAATTCAAGAACGGTTAGCCAGCTACGCTTGTGATT | | | 611 |
| <i>NCED1</i> | 636 | CACGGAGACTCAAAGACTCGTCCAAGAACGAAGCTAGGCGGCCAGTT | | | 685 |
| <i>NCED2</i> | 612 | CACCGAGACCCAAAGACTCGTCCAAGAACGAGTGTAGGCCGTCTGTGT | | | 661 |
| <i>NCED1</i> | 686 | TCCCCAAAGCCATTGGTGAACCTCCATGCCACTCCGCATAGCTAGGCTT | | | 735 |
| <i>NCED2</i> | 662 | TCCCCAAAGCCATTGGTGAACCTCCAATGCCACTCCGAATAGCTAGACTT | | | 711 |
| <i>NCED1</i> | 736 | CTACTGTTCTATGCTCGTGGACTCTTAGGCCTCGTGTGATACAATCACGG | | | 785 |
| <i>NCED2</i> | 712 | CTACTCTTCTATGCTCGTGGACTGTTGGCCTTGTGATCACAGTCACGG | | | 761 |
| <i>NCED1</i> | 786 | CACCGGAGTGGCCAACGCTGGTGGTTACTCAACAATCGATTACTCG | | | 835 |
| <i>NCED2</i> | 762 | CACCGGAGTGGCCAACGCCGGCTGGTTACTCAACAACCGCTTGTGCG | | | 811 |
| <i>NCED1</i> | 836 | CCATGTCGAAGATGACTGCCGTACCATGTCAGTAAAGTTACTCCCTCCGC | | | 885 |
| <i>NCED2</i> | 812 | CCATGTCGAAGACGACTTGCCATACCATGTTGAGTCACCTCCCTCCGC | | | 861 |
| <i>NCED1</i> | 886 | GACCTCCGTACAGTGGAAAGATACAACACTTGTGATGGTCAACTCAAGTCCAC | | | 935 |
| <i>NCED2</i> | 862 | GACCTTCGAACTGTGGAAAGGTACAACACTTGTGATGGTCAACTCAAGTCCAC | | | 911 |
| <i>NCED1</i> | 936 | CATGATAGCTACCCGAAGCTCGACCCAGTTCCGGCAGCTATTGCTC | | | 985 |
| <i>NCED2</i> | 912 | CATGATAGCTACCCGAAGCTCGACCCAGTTCCAGCGAACTCTTGCTC | | | 961 |

Figura 4. Comparación global de las cadenas nucleotídicas de ambas variantes del gen *NCED* (continúa).

| | | | |
|-------|------|--|------|
| NCED1 | 986 | TGAGCTACGACGTTATTCAAGAACCTTACCTCAAGTACTTCAAATTCTCA | 1035 |
| NCED2 | 962 | TGAGCTACGACGTAATCCAGAACCTTACCTCAAATACTTCAAATTCTCT | 1011 |
| NCED1 | 1036 | CAAGATGGAAATAAATCACCGATAATTGAAATACCAAGTTCTGAGCCAAC | 1085 |
| NCED2 | 1012 | GAAAACGGAAACAAATCACCAAGACATTGAATTCCAGTTCTGAGCCAAC | 1061 |
| NCED1 | 1086 | TATGATGCATGACTTTGCAATTACAGAAAATTGTGGTTGTCCTGATC | 1135 |
| NCED2 | 1062 | TATGATTGATGACTTTGCGATCACTGAGAATTGTGGTTGTCCTGATC | 1111 |
| NCED1 | 1136 | AGCAAGTTGTGTTCAAGATTCCGAAATGGTCCGCGGTGGCTCTCCGGTG | 1185 |
| NCED2 | 1112 | AGCAAGTTGTGTTCAAGATTCCGAAATGGTCCGCGGTGGCTCTCCGGTG | 1161 |
| NCED1 | 1186 | GTGTATGACAAGAACAAAGGTGCCAAGATTGGGTTCTTGAGAAAATATGC | 1235 |
| NCED2 | 1162 | GTGTATGACAAGAACAAAGGTGGCTAGATTGGTGTCTTGACAAAAATGC | 1211 |
| NCED1 | 1236 | TAAAGATGGTCTGAGATCAAATGGATTGAGTGTCTGATTGCTTTGTT | 1285 |
| NCED2 | 1212 | TAAAGACTCTCTGGATCAAATGGTTGATTGTCTGATTGCTTTGTT | 1261 |
| NCED1 | 1286 | TTCATCTTGGATGCTGGAAAGAGCCAGAGACTGATGAGATTGTTGTT | 1335 |
| NCED2 | 1262 | TTCATCTTGGATGCTGGAAAGAGCCTGAAACTAATGAGATTGTTGTT | 1311 |
| NCED1 | 1336 | ATTGGGTCATGTATGACCCCTCCAGACTCCATTTCACGCATGTGACGA | 1385 |
| NCED2 | 1312 | ATTGGGTCATGTATGACTCCACCGACTCCATTTCACGAAATGTGAAGA | 1361 |
| NCED1 | 1386 | AGGATTACAGAGTGTATTATCAGAAATTGCCCTCAATTGAAGACCGGAA | 1435 |
| NCED2 | 1362 | AGGTTTACAGAGTATTATCAGAAATTGACTCAATTGAACACCGGAA | 1411 |
| NCED1 | 1436 | AGTCCACTGCCGCCAATTATCAAATTCCGACGATCAAGTGAACCTG | 1485 |
| NCED2 | 1412 | AGTCCACTGCCGCCAATTATCAAATTCCGACGATCAAGTGAACCTG | 1461 |
| NCED1 | 1486 | GAGGCAGGAATGGTAAACAGAAACAAGCTAGGACGAAAAACCCAGTTG | 1535 |
| NCED2 | 1462 | GAAGCAGGGATGGTGAATAGAAAACAAGCTCGGAAGACAAACAAGTATGC | 1511 |
| NCED1 | 1536 | ATATCTAGCCATAGCTGAGCCATGGCTAAAGTATGGGTTTGCTAAAG | 1585 |
| NCED2 | 1512 | ATATCTGCCATAGCTGAGCCATGGCTAAAGTCTGGTTTGCTAAAG | 1561 |
| NCED1 | 1586 | TGGACCTTCAAATGGTGAAGTCAGAACAGTATATCTATGGAGATCAAAAA | 1635 |
| NCED2 | 1562 | TAGACCTTCAGATGGTGAAGTAAAGTATATCTATGGAGATGAAAAA | 1611 |
| NCED1 | 1636 | TATGGTGGTGAGCCTCTGTTCTTCAA-AAAC--CCCCAATTCTGAGAA | 1682 |
| NCED2 | 1612 | TATGGGGGTGAGCCTCTGTTCTTCAAAGAGACCCCCAATTGTG---A | 1658 |
| NCED1 | 1683 | AGAAGATGATGGGTATATTCTAGCTTCGTTACGACGAAAGGCATGGA | 1732 |
| NCED2 | 1659 | AGAAGATGATGGGTATATTCTCGCGTCTCGCACGACGAAAGGCATGGA | 1708 |
| NCED1 | 1733 | AATCAGAGCTACAGATGTTAATGCAATGACATTGGAGATAAGGGC--- | 1778 |
| NCED2 | 1709 | AATCCGAGTACAGATGTTAATGCCATGAATTGAAGCTAGAGGCATCG | 1758 |
| NCED1 | 1779 | -TTGTGTGAAGCTTCCAAGCAGAGTACCATATGGTTTCATGGTACTTT | 1827 |
| NCED2 | 1759 | ATTG ----AGCTTCCAAGTAGAGTACCATATGGTTCATGGCACATT | 1803 |
| NCED1 | 1828 | ATCAGTGCCAAAGATTAGCAACCCAAGCCTGA | 1860 |
| NCED2 | 1804 | ATAAGTGCAAAGATTGGAAAATCAGGCCTAA | 1836 |

Figura 4. Comparación global de las cadenas nucleotídicas de ambas variantes del gen *NCED* (continuación).

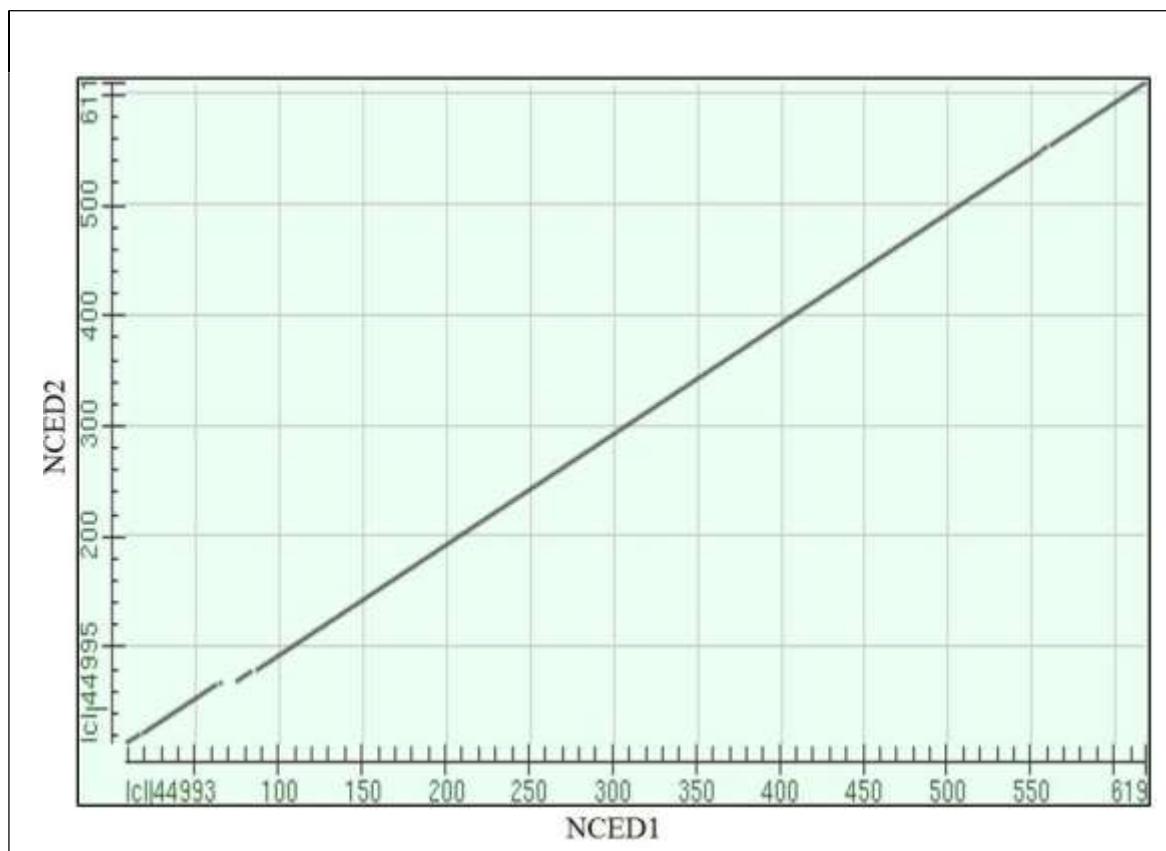


Figura 5. Comparación de las proteínas deducidas de *NCED1* y *NCED2*, mediante un diagrama de puntos.

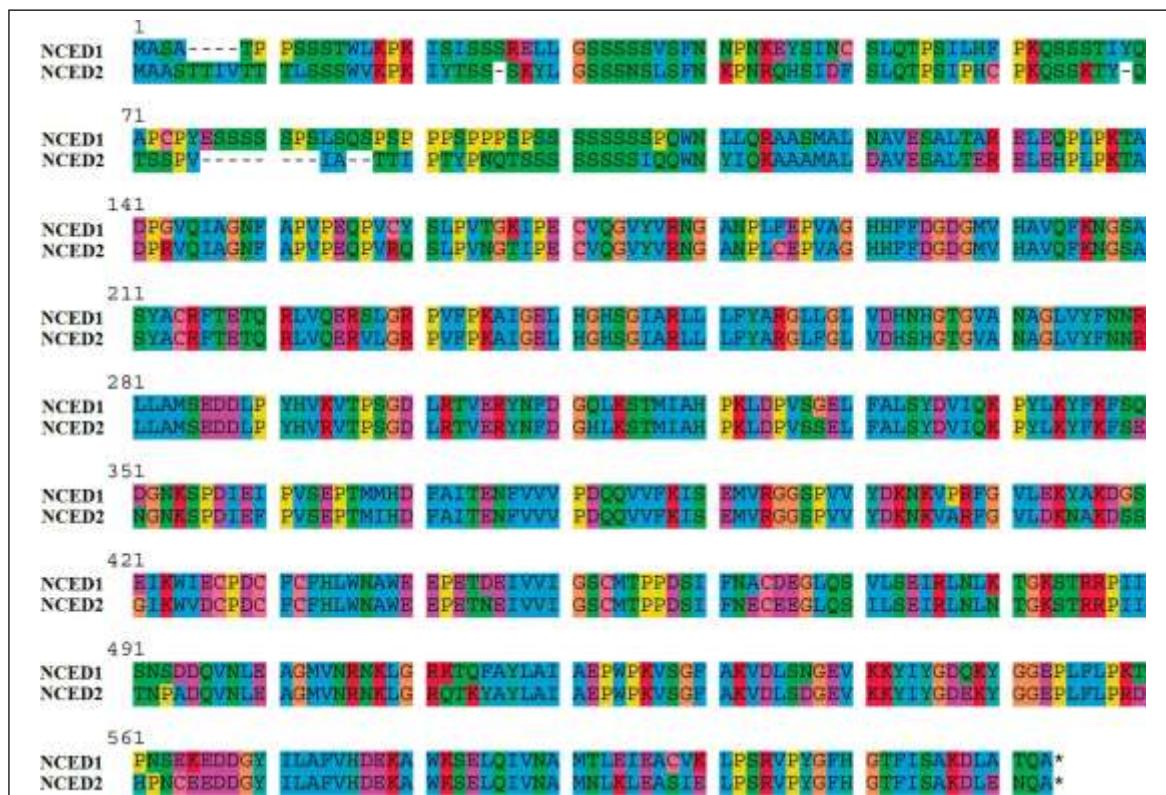


Figura 6. Alineamiento de las cadenas aminoacídicas deducidas de *NCED1* y *NCED2*.

A partir de la búsqueda de genes ortólogos en bases de datos públicas, se seleccionaron 24 secuencias para confeccionar el árbol filogenético. Las secuencias utilizadas corresponden a 10 especies diferentes: *Arabidopsis thaliana* (7), *Coffea canephora* (1), *Nicotiana tabacum* (1), *Solanum chilense* (1), *Phaseolus vulgaris* (2), *Vitis vinifera* (2), *Populus trichocarpa* (2), *Oncidium* cultivar híbrido (1), *Oryza sativa* (6), *Zea mays* (1).

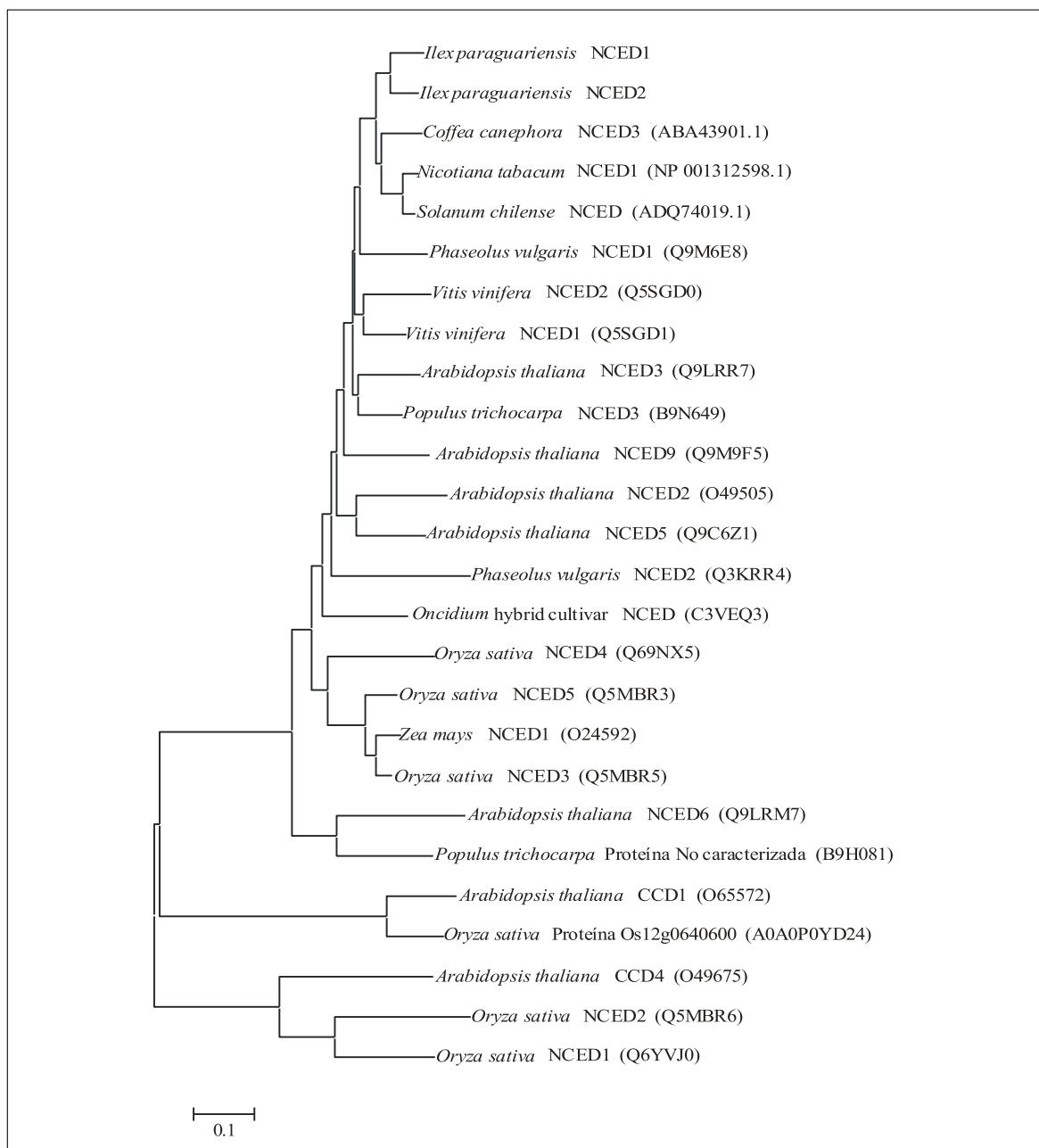


Figura 7. Árbol de distancias construido con el algoritmo Neighbor-Joining. Permite la comparación del grado de similitud de la secuencia aminoacídica de las variantes de *NCED* identificadas en *I. paraguariensis*, con las pertenecientes a otras 10 especies vegetales. Barra: 0,1 sustituciones por residuo aminoacídico.

Se utilizó ADNg y cebadores de RAGE diseñados específicamente para cada variante para llevar a cabo reacciones de PCR con la finalidad de avanzar sobre el extremo 5' de la región codificante. Se logró secuenciar 338 pares de bases corriente arriba, a partir del codón de inicio de la traducción de *NCED1* (Fig. 8).

OBJETIVO ESPECÍFICO 2: *Identificar en su región 5' cercana, factores cis involucrados en la regulación de la expresión del gen, y en particular los de respuesta a déficit hídrico.*

Se identificaron 15 secuencias involucradas en la regulación de la expresión de *NCED1*, utilizando la base de datos de elementos *cis* y la herramienta de reconocimiento de dichas secuencias disponible en el sitio web PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). En la Figura 8 se indica la localización de las mismas en la secuencia del extremo 5' cercano a la región codificante del gen *NCED1*, y sus funciones conocidas se detallan en la Tabla 8.

| <i>NCED1</i> | |
|--|---|
| -338 | |
| ↓ | |
| + CGCCCCGGCA GG | TATAATAC CGAAAAATAG TGTGCCTGAT ATTATTATT TT |
| - GCGGGGCCGT CCATATTATG GCTTTTATC ACACGGACTA TAA | TAATAAAA AAAAATCGA TGTCACTGG |
| + CCTCCACATC GTTTATTACG AGTCTTGAG CCCCCATTTC CACATCAAAC | ACGTGGTCTC TTCTACAAG |
| - GGAGGTGTAG CAAATAATGC TCAGAAACTC GGGGGTAAAG GTGTAGTTG TGCACCAGAG AAGGATGTTG | |
| + TTTGAAGTGG ACCTCCATGC GTCACTTCTC CCCCTATATA TACCTTTCT | CTCTCCCTCC GTCTCTCCTC |
| - AAACCTCACC TGGAGGTACG CAGTGAAGAG GGGGATATAT ATGGAAAGGA GAGAGGGAGG CAGAGAGGAG | |
| + AAACCTCATT CCCCTCTCTC TCTTCATTT ACCACTTGT CTCTCCTCTC AACACTCTTC CAAACACAC | |
| - TTTGGAGTAA GGGGAGAGAG AGAAAGTAAA TGGTAAACA GAGAGGAGAG TTGTGAGAAG GTTTGTGTG | |
| | -1+1 |
| ↓↓ | |
| + ACTCCCTAGC AAA | CAATTAA AGCAACCCAT CTCAGTGACA GCATCAAAT AGACAGCTAT G... |
| - TGAGGGATCG TTTGTTAATT TCGTTGGTA GAGTCAGTGT CGTAGTTTA TCTGTCGATA C... | |

Figura 8. Secuencia del extremo 5' cercano a la región codificante del gen *NCED1*. Se resaltan en colores los elementos *cis* identificados.

Tabla 8. Descripción de los elementos *cis* identificados.

| Elemento <i>cis</i> | Organismo en el cual se aisló | Posición | Hebra | Secuencia | Función |
|---------------------|--------------------------------|-------------|-------|-----------|---|
| ATG | - | +1 | + | ATG | Codón de inicio de la traducción. |
| ABRE | <i>Arabidopsis thaliana</i> | -214 a -219 | + | CACGTG | Respuesta a ácido abscísico y a deshidratación. |
| G-Box | <i>Arabidopsis thaliana</i> | -214 a -219 | + | CACGTG | Respuesta a luz. |
| CAAT-box | <i>Glycine max</i> | -41 a -45 | + | CAATT | Común en regiones promotoras y potenciadoras. |
| CGTCA-motif | <i>Hordeum vulgare</i> | -175 a -179 | + | CGTCA | Respuesta a metil jasmonato. |
| LTR | <i>Hordeum vulgare</i> | -314 a -319 | + | CCGAAA | Respuesta a bajas temperaturas |
| TGACG-motif | <i>Hordeum vulgare</i> | -175 a -179 | - | TGACG | Respuesta a metil jasmonato. |
| TCCC-motif | <i>Spinacia oleracea</i> | -141 a -147 | + | TCTCCCT | Parte de un elemento de respuesta a la luz. |
| TATA-box | <i>Arabidopsis thaliana</i> | -323 a -326 | + | TATA | Implicada en el proceso de transcripción por la ARN polimerasa. |
| TATA-box | <i>Lycopersicon esculentum</i> | -282 a -286 | + | TTTTA | Implicada en el proceso de transcripción por la ARN polimerasa. |
| TATA-box | <i>Arabidopsis thaliana</i> | -160 a -163 | - | TATA | Implicada en el proceso de transcripción por la ARN polimerasa. |
| TATA-box | <i>Brassica napus</i> | -157 a -162 | - | ATATAT | Implicada en el proceso de transcripción por la ARN polimerasa. |
| TATA-box | <i>Glycine max</i> | -320 a -324 | + | TAATA | Implicada en el proceso de transcripción por la ARN polimerasa. |
| TATA-box | <i>Arabidopsis thaliana</i> | -158 a -161 | - | TATA | Implicada en el proceso de transcripción por la ARN polimerasa. |
| TATA-box | <i>Glycine max</i> | -291 a -295 | - | TAATA | Implicada en el proceso de transcripción por la ARN polimerasa. |

La secuencia 5'-CACGTG-3' a -214 pares de base del codón de inicio de la traducción, funciona tanto como un elemento *cis* de respuesta a ABA por lo que recibe el nombre ABRE del inglés “ABA-responsive element” (ACGTGG/TC); como así también un elemento G-box que participa en la inducción de respuesta a deshidratación. Concordantemente, Behnam et al. (2013) en un análisis de la región promotora del gen *NCED3* en *Arabidopsis thaliana*, han identificado la secuencia G-box a -84 pares de base del sitio de inicio de la transcripción, y han sugerido que cumple un papel sumamente importante en la regulación de la expresión de este gen en respuesta a deshidratación.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Secuenciar los transcriptos de las variantes del gen a partir de ADN complementario obtenido por retrotranscripción del ARN mensajero.

Utilizando el ADNc obtenido de la retrotranscripción, y cebadores diseñados para las dos variantes del gen *NCED* (Tabla 1 y 2) se amplificaron 5 fragmentos para la *NCED1* y 4 para la *NCED2* (Fig. 9) que cubren completamente el Marco Abierto de Lectura, de cada uno de ellos.

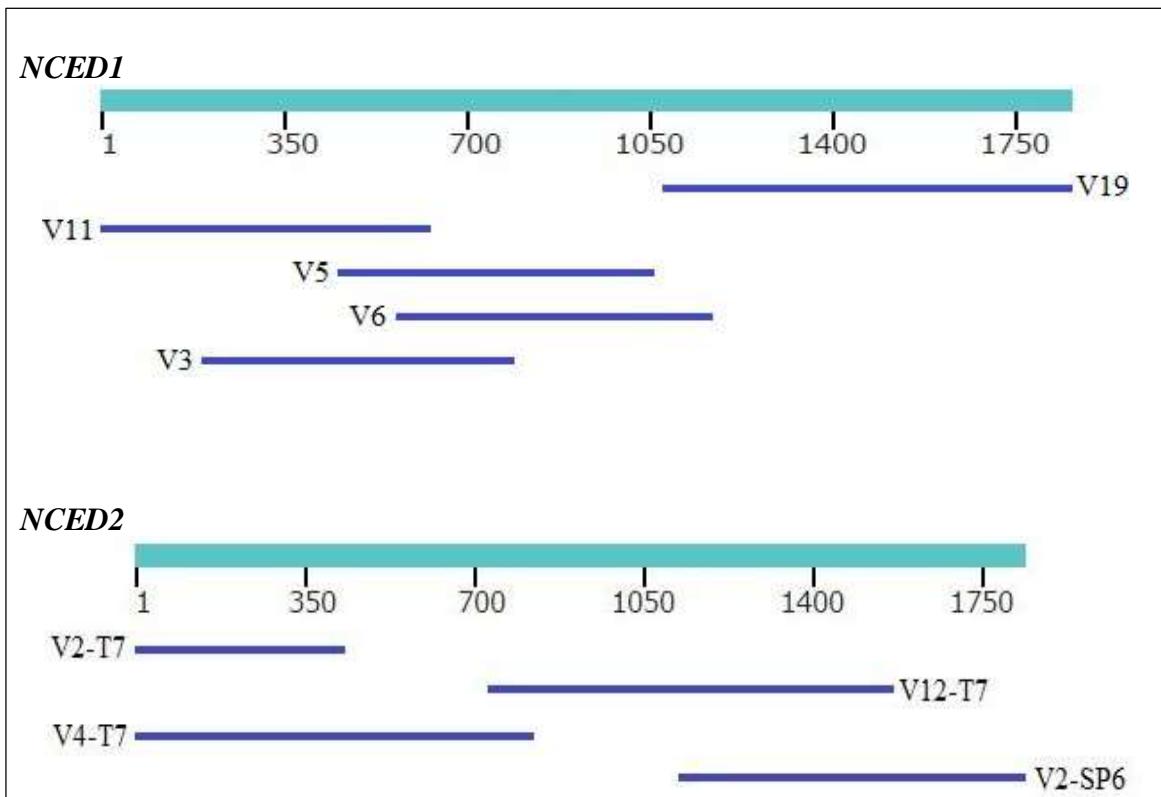


Figura 9. Esquema de los fragmentos de ambas variantes del gen *NCED*, secuenciados a partir de ADNc (ARNm).

Se alinearon los fragmentos obtenidos por secuenciación (Tabla 9) y se verificó que la *NCED1* cuenta con 1.860 pares de bases que codifican una cadena polipeptídica de 619 aminoácidos. Por otro lado, el Marco Abierto de Lectura de *NCED2* cuenta con 1.836 nucleótidos que se traducen a una proteína de 611 aminoácidos.

Tabla 9. Esquema de los fragmentos de ambas variantes del gen *NCED*, secuenciados a partir de ADNc (ARNm).

| Gen | Secuencia | Longitud (bases) | Inicio | Final | Cobertura(%) |
|--------------|--------------------------|------------------|--------|-------|--------------|
| <i>NCED1</i> | Marco Abierto de Lectura | 1.860 | 1 | 1860 | 100 |
| | V19-SP6-ADNc | 898 | 976 | 1860 | 48,28 |
| | V11-SP6-ADNc | 774 | 1 | 633 | 41,61 |
| | V5-T7-ADNc | 605 | 455 | 1059 | 32,53 |
| | V6-T7-ADNc | 610 | 568 | 1171 | 32,80 |
| | V3-T7-ADNc | 605 | 194 | 792 | 32,53 |
| <i>NCED2</i> | Marco Abierto de Lectura | 1.836 | 1 | 1836 | 100 |
| | V12-T7-ADNc | 839 | 727 | 1565 | 45,70 |
| | V4-T7-ADNc | 870 | 1 | 822 | 47,39 |
| | V2-SP6-ADNc | 753 | 1.120 | 1836 | 41,01 |
| | V2-T7-ADNc | 481 | 1 | 435 | 26,20 |

La secuenciación de los amplicones resultantes de la amplificación tanto de ADNg, como de ADNc con los mismos pares de cebadores, permitió corroborar que para ambas variantes del gen NCED, las secuencias nucleotídicas fueron idénticas (100% de identidad respectivamente).

OBJETIVO ESPECÍFICO 4: Identificar los exones e intrones de cada variante del gen.

Para comparar las longitudes de la región codificante y su correspondiente transcripto en cada variante, se realizaron amplificaciones por PCR con un cebador diseñado sobre el codón de inicio de la transcripción (ATG) y el cebador complementario diseñado sobre el codón de stop (Tabla 1). Estos pares de cebadores permitieron amplificar para ambas variantes, la región codificante completa utilizando ADNg como molde, y su correspondiente Marco de Lectura Abierto utilizando ADNc como molde. Luego, se visualizó en un gel de agarosa que los amplicones del mismo gen correspondientes a la región codificante (ADNg) y al Marco de Lectura Abierto (ADNc) presentaron tamaños similares (Fig. 10). Esto permitió descartar la presencia de

intrones extensos, en ambas variantes. La misma comparación se realizó utilizando pares de cebadores que amplifican fragmentos de estos genes (Tabla 2), y los amplicones resultantes fueron similares en todos los casos (Fig. 11).

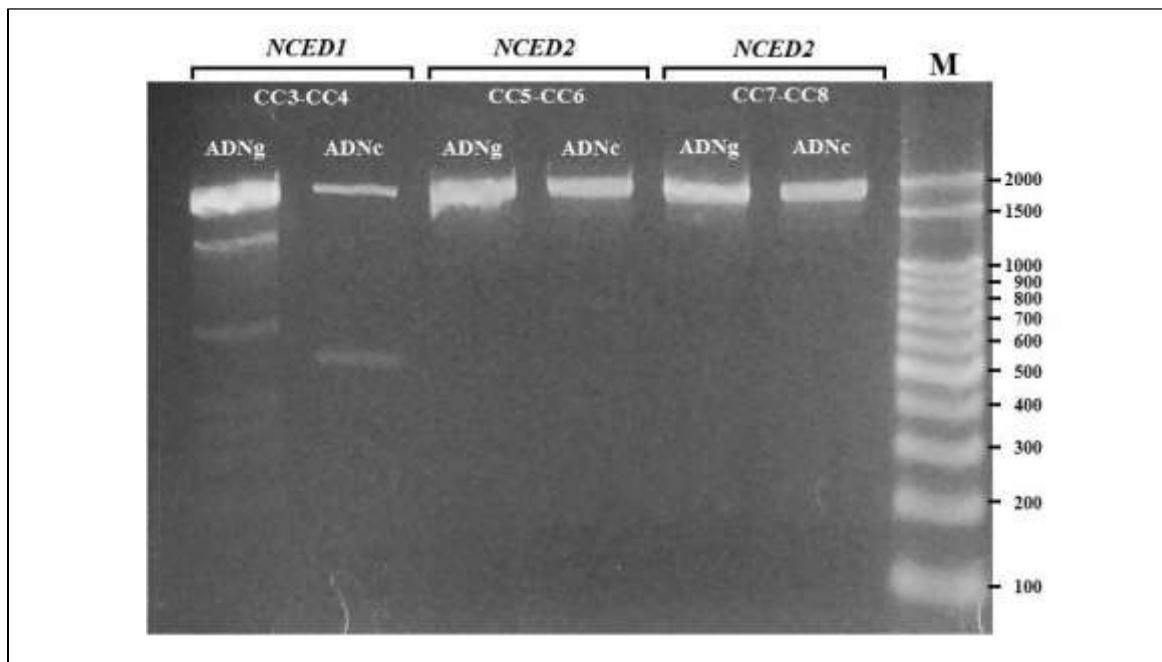


Figura 10. Elecroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v) de los productos de amplificación de PCRs realizadas utilizando ADNg y ADNc como molde y cebadores específicos para cada variante del gen *NCED*.

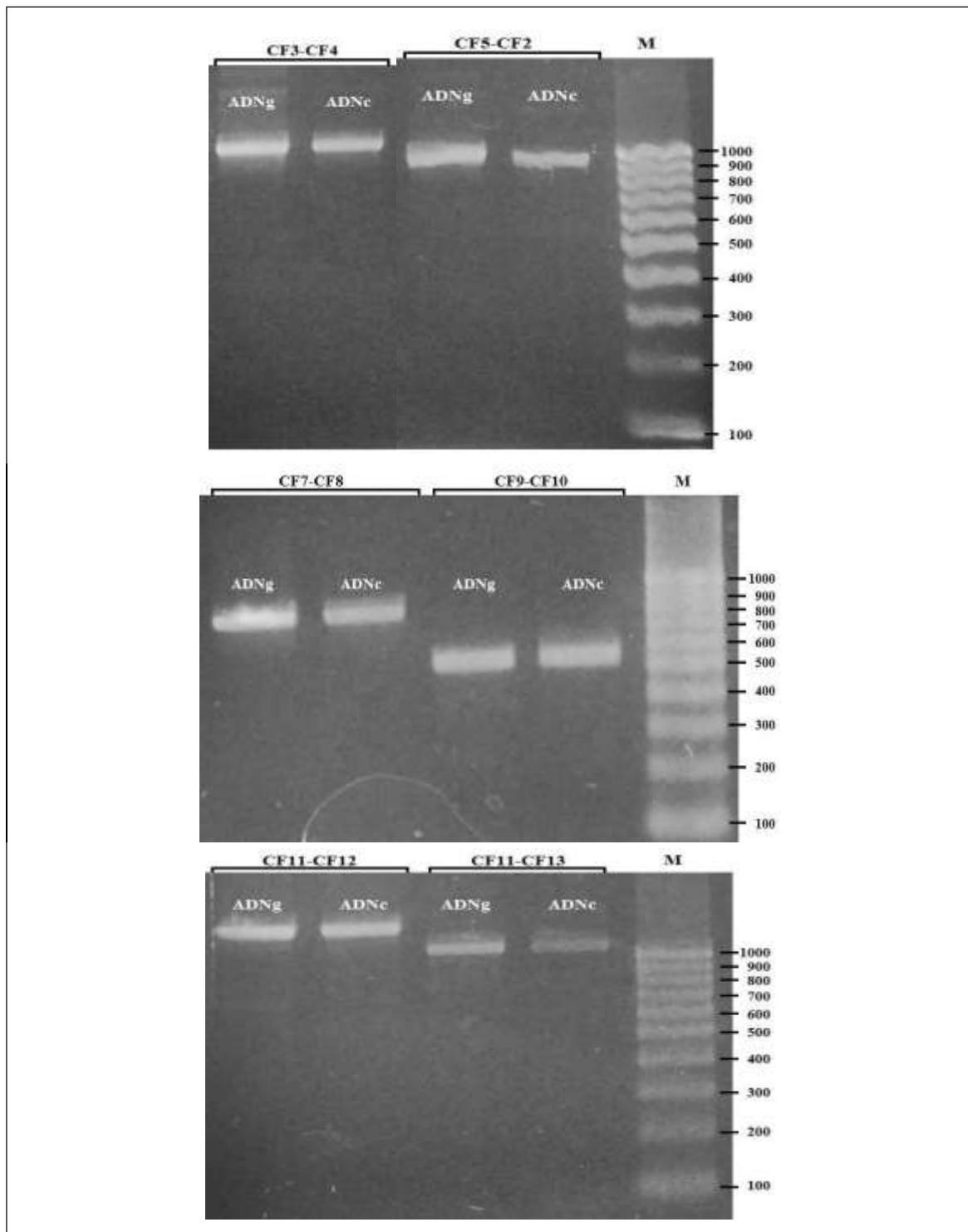


Figura 11. Elecroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v) de los productos de amplificación de PCRs realizadas utilizando ADNg y ADNc como molde y cebadores específicos para fragmentos de cada variante del gen *NCED*.

Por otra parte, la secuenciación de todos estos amplicones, necesarios para cumplir los objetivos específicos 1 y 3, dejó en evidencia que tanto la región codificante de ambas variantes, como sus correspondientes Marcos Abiertos de Lectura son idénticos. Por lo tanto, *NCED1* y *NCED2* son genes continuos sin intrones.

OBJETIVO ESPECÍFICO 5: *Cuantificar la expresión de cada variante del gen NCED en hojas de plantas sometidas a estrés por déficit hídrico y compararlas con plantas irrigadas adecuadamente.*

Mediante la técnica de PCR en Tiempo Real se comprobó que, en plantas bajo condiciones normales de hidratación, la expresión total del gen *NCED* es considerablemente menor que en plantas estresadas, siendo *NCED1* la variante con mayor representación. En contraste, bajo condiciones de estrés hídrico severo la expresión total de *NCED* se incrementa alrededor de 4 veces a expensas de la sobreexpresión de *NCED2*, pues *NCED1* presenta una represión durante el estrés (Fig.12).

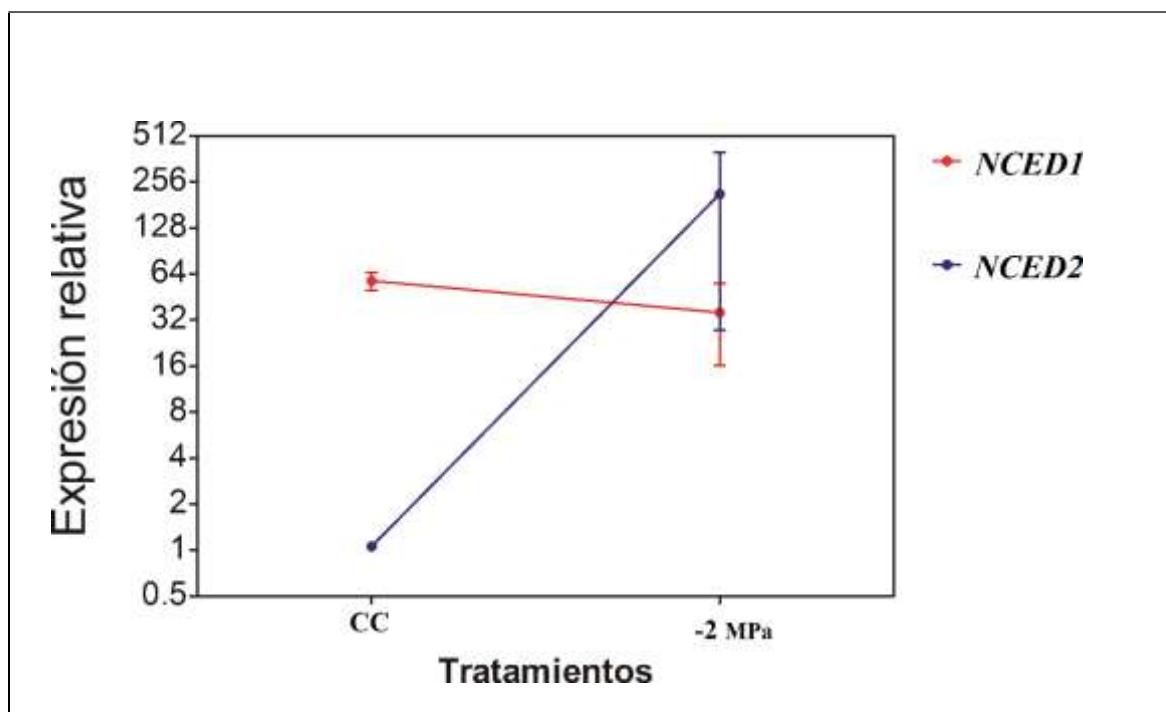


Figura 12. Expresión relativa de cada isoforma en condición de control (CC) y de estrés (-2 MPa). Los resultados expresan el promedio \pm error estándar de tres repeticiones.

Estudios realizados sobre el gen *NCED3* en *Arabidopsis thaliana*, aislado y descripto por Iuchi et al. (2001), demuestran un comportamiento similar al de *NCED2* de *I. paraguariensis*. Bajo condiciones de estrés hídrico, el transcripto del gen *NCED3* presenta una sobreexpresión, desencadenando la acumulación de ABA endógeno que provoca una respuesta adaptativa al estrés ambiental (potenciando la expresión de genes inducidos por sequía y disminuyendo la transpiración en hojas).

CONCLUSIONES:

Se determinaron las secuencias de las regiones codificantes de dos variantes del gen *NCED* en hojas de *Ilex paraguariensis*. Estas fueron denominadas *NCED1* y *NCED2*, y las proteínas que codifican presentan un alto grado de similitud con enzimas NCED estudiadas en otras especies vegetales, en particular con la NCED3 de *Coffea canephora*.

Ambas variantes del gen (*NCED1* y *NCED2*) presentaron un único amplicón de su Marco Abierto de Lectura, que además, resultaron ser idénticos en longitud y secuencia a las regiones codificantes secuenciadas a partir de ADNg. Esto permite clasificarlas como genes continuos sin intrones.

La presencia del elemento *cis* G-box que participa en la inducción de respuesta a deshidratación, respalda la expresión de este gen en condiciones de déficit hídrico.

La identificación de la secuencia ABRE, podría revelar un posible mecanismo de retroalimentación positiva, ya que el aumento de esta enzima se correlaciona bastante bien con el aumento de la concentración de ABA.

El aumento de la expresión de NCED en condiciones de estrés por sequía, se produce principalmente por un aumento muy significativo en la transcripción de *NCED2*.

Estos resultados brindan información que avalan la participación de variantes alternativas de *NCED* en hojas de yerba mate en respuesta a la deshidratación.

BIBLIOGRAFÍA:

Behnam B, Iuchi S, Fujita M, Fujita Y, Takasaki H, Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Kobayashi M, Shinozaki K (2013). Characterization of the promoter region of an *Arabidopsis* gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in dehydration-inducible transcription. *DNA Research* 20: 315-324.

Cabello JV, Lodeyro AF, Zurbriggen MD (2014). Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 62-70.

Chaves M, Maroco J, Pereira J (2003). Understanding plant responses to drought- from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.

Dubos C, Plomion C (2003). Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots. *Plant Molecular Biology* 51: 249-262.

Hernandez-García CM, Finer JJ (2014). Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218: 109-119.

Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 27: 325-333.

Jin LG, Liu JY (2008). Molecular cloning, expression profile and promoter analysis of a novel ethylene responsive transcription factor gene GhERF4 from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 46-53.

Jordán M, Casaretto J (2006) Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. En Squeo FA y Cardemil L (Eds.): *Fisiología Vegetal*, 1ra ed. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

Kuriakose B, Ganesan V, Thomas G, Viswanathan A, Anand N (2009). Random amplification of genomic ends (RAGE) as an efficient method for isolation and cloning of promoters and uncloned genomic regions. *African Journal of Biotechnology* 8: 4765-4773.

Mehrotra R, Bhalothia P, Bansal P, Basantani MK, Bharti V, Mehrotra S (2014). Abscisic acid and abiotic stress tolerance - Different tiers of regulation. *Journal of Plant Physiology* 171: 486–496.

Nambara E (2017) Abscisic Acid. En Thomas B, Murray BG y Murphy DJ (Eds): *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2da ed. Academic Press, Oxford, Inglaterra.

Prat Kricun SD (2011) Sugerencias sobre plantación de yerba mate. Compartiendo Tecnología 2: 11-16.

Qin X, Zeevaart JAD (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 96: 15354-15361.

Sambrook JF, Russell DW (Eds) (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ra ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, Estados Unidos.

Sansberro PA (2000). Estudios fisiológicos acerca del control de brotación en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. 120 pág.

Sansberro PA, Masciarelli O, Mroginski L, Bottini R (2004). Abscisic acid promotes *Ilex paraguariensis* growth by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regulation* 42: 105-111.

Seiler C, Harshavardhan VT, Rajesh K, Reddy PS, Strickert M, Rolletschek H, Scholz U, Wobus U, Sreenivasulu N (2011). ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barely seed development under control and terminal drought-stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 62: 2615-2632.

Shah ST, Pang C, Fan S, Song M, Arain S, Yu S (2013). Isolation and expression profiling of GhNAC transcription factor genes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) during leaf senescence and in response to stresses. *Gene* 531: 220-234.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221-227.

Xiong L, Zhu JK (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 133: 29-36.