



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Evaluación funcional del gen *eIF5A1* de soja en la tolerancia al estrés hídrico

CAMILA MORAES ALBARENGA

Tutora: Sabina Vidal

Co-tutor: Juan P. Gallino

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal

Facultad de Ciencias – UDELAR

Setiembre – 2013



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

UDELAR | fcien.edu.uy

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Mi Amor, gracias negro por acompañarme y estar a mi lado siempre, por escucharme y tratar de entender lo que te explicaba. Por darme siempre para adelante y estar conmigo en todo momento.

A mis padres por acompañarme aunque a tantos kilómetros siempre cerca, gracias por apoyarme, darme la oportunidad de estudiar lo que me gusta y bancarme durante todos estos años. Los amo!

A mi Valita gracias por venir a visitarme, mandarme esos dibujos tan lindos y estas cosas tan ricas en las encomiendas.

A mis abuelas, suegros, tíos, primos, los amigos de mis padres, gracias por estar ahí dándome para adelante en todo momento.

A mis compañeras de facultad, Caro, Jenny, Mariana y Pato por todos los momentos en facultad durante todos estos años.

A Sabina por darme la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio, donde aprendí muchísimo. A Juan Pablo por ayudarme y a Luciana por cuidarme las plantas. A todo el grupo de BMV, Ceci, Lucia, Marcel, Alex muchas gracias por la ayuda.

MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

ABREVIACIONES.	1
RESUMEN.	3
1. INTRODUCCION.	4
1.1.1. Mecanismos de tolerancia al estrés hídrico.	4
1.1.2. Ácido abscísico.	5
1.1.3. Cambios a nivel de la transcripción inducidos por estrés.	5
1.2. Regulación de la síntesis proteica.	6
1.2.1. Factores de iniciación de la traducción.	7
1.2.2. Factor de iniciación de la traducción eIF5A.	7
1.3. La soja en Uruguay.	8
1.4. Antecedentes del proyecto.	9
2. OBJETIVOS.	11
2.1. Objetivos generales.	11
2.2. Objetivos específicos.	11
3. MATERIALES Y METODOS.	12
3.1. Extracción de ARN de plantas de soja.	12
3.2. Electroforesis en gel de agarosa.	12
3.3. Obtención de ADN copia a partir de ARN.	13
3.4. Clonado del gen <i>eIF5A1</i> y eliminación del codón de terminación.	13
3.5. Purificación del gen de interés a partir de gel.	13
3.6. Obtención de extremos cohesivos en el gen.	13
3.7. Ligación con vector pENTR2B con el inserto eIF5A1.	14
3.8. Preparación de células <i>Escherichia coli</i> electrocompetentes.	14
3.9. Transformación de células <i>Escherichia coli</i> electrocompetentes.	14
3.10. Purificación de los plásmidos.	15
3.11. Análisis de plásmidos por ensayo de restricción.	15
3.12. Vectores binarios.	16
3.13. Recombinación del vector de entrada pENTR2B con los vectores binarios pK7FWG2 y pGWB14.	16
3.14. Secuenciación de las construcciones pK7FWG2-eIF5A1 y pGWB14-eIF5A1.	16
3.15. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> electrocompetentes.	16
3.16. Identificación de clones por PCR.	17
3.17. Agroinfiltración de hojas de tabaco.	17
3.18. Visualización de eIF5A1-GFP por microscopia confocal.	17
3.19. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
3.20. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.	18
3.21. Identificación de mutantes.	18
3.22. Análisis de promotores.	18
3.23. Análisis <i>in silico</i> de perfiles de expresión.	19
4. RESULTADOS Y DISCUSION.	20
4.1. Características de secuencia del gen <i>eIF5A1</i>	20
4.2. Generación de construcciones génicas para la caracterización funcional de <i>eIF5A1</i>	20
4.3. Clonado en el vector de entrada pENTR2B.	22
4.4. Generación de una construcción génica que exprese el gen <i>eIF5A1</i> fusionado con GFP.	23
4.5. Generación de una construcción génica para la expresión constitutiva del gen <i>eIF5A</i> de soja en <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
4.6. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.	32
4.7. Identificación de mutantes en genes ortólogos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	34

4.8. Análisis <i>in silico</i> de perfiles de expresión.	34
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	37
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	38

ABREVIACIONES

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	ácido abscisico
ABRE	<i>ABA-responsive element</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN transferencia
BrEt	bromuro de etidio
bZIP	<i>basic leucine zipper</i>
c.s.p.	cantidad suficiente para
CITEs	<i>Cap-Independent Translational Enhancers</i>
DEPC	dietilpirocarbonato
DHH	desoxihipusina hidroxilasa
DHS	desoxihipusina sintasa
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
DO	densidad óptica
DRE/CRT;	<i>dehydration responsive element/C-repeat</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
eIF	<i>eukaryotic initiation factors</i>
eIF5A	<i>eukaryotic initiation factors 5A</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HCl	ácido clorhídrico
hs	horas
IRES	<i>internal ribosome entry sites</i>
kDa	Kilo Daltons
LB	medio Luria-Bertani
LEA	<i>late embryogenesis abundant</i>
LiCl	cloruro de litio
M	molar
MES	<i>monohydrate 2-ethanesulfonic acid</i>
mg	miligramo
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
ms	milisegundos
MS	<i>Murashige & Skoog</i>
mV	milivolt
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
ng	nanogramo
nm	nanometros
p/v	peso/volumen
p35S	promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

RNasa	ribonucleasa
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Retro transcripcion-PCR</i>
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
T-DNA	<i>transferred DNA</i>
UV	ultra violeta
V	volts
YEP	<i>Yeast extract peptone</i>
λ	longitud de onda
μ F	microFaradio
μ g	microgramo
μ L	microlitro
μ m	micras
μ M	micromolar
Ω	ohmio
$^{\circ}$ C	grados Celcius

RESUMEN

Vivimos en un mundo donde la población crece exponencialmente, donde los recursos alimenticios son limitados y donde los efectos del calentamiento global son cada vez más evidentes. En este sentido se hace hincapié en la necesidad de hacer frente a esta situación mediante la utilización de diferentes estrategias.

La sequía es el estrés abiótico más frecuente e impredecible que afecta la viabilidad, el crecimiento, la morfología y la productividad de los cultivos. Es por eso que los distintos mecanismos de adaptación utilizados por las plantas para sobrellevar dichas condiciones son considerados de gran interés para la agricultura. En Uruguay, la soja es uno de los cultivos con mayor superficie de siembra y uno de los productos de mayor exportación del país. Es un cultivo que presenta excepcionales características nutricionales, es fuente de aceite vegetal y de proteínas para el consumo alimenticio a nivel mundial. Por ser un cultivo de verano se encuentra frecuentemente sometida a los períodos de déficit hídrico que se producen durante esa estación, que afectan la productividad y el rendimiento, y causan importantes pérdidas económicas.

La identificación de los loci genéticos involucrados en la resistencia a la sequía en distintas especies vegetales es de gran importancia para el mejoramiento genético de los cultivos. Es por eso que resulta indispensable el empleo de estrategias que integren distintas aproximaciones experimentales para explicar los complejos mecanismos involucrados en la resistencia al estrés hídrico en soja y poder aprovechar este conocimiento para generar cultivares elites con un alto potencial de rendimiento bajo condiciones de sequía.

Este estudio tiene como objetivo general contribuir al conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la tolerancia al estrés hídrico en soja y generar herramientas para incrementar la tolerancia al estrés hídrico en cultivos.

Este trabajo se centró en la caracterización de un gen que se induce fuertemente en condiciones de déficit hídrico en soja. Dicho gen codifica el factor de iniciación de la traducción *eIF5A1*. Con ese objetivo, en primer lugar se generó una construcción génica para determinar la localización subcelular del producto de este gen mediante ensayos de expresión transitoria en plantas. En segundo lugar, se generó una construcción génica para la expresión constitutiva del gen *eIF5A1* de soja en *Arabidopsis thaliana*.

La caracterización funcional de genes involucrados en la resistencia a sequía en el cultivo de soja permitirá avanzar más rápidamente en el desarrollo de genotipos con mejores rendimientos en condiciones de déficit hídrico. Algunas de sus posibles aplicaciones incluyen el desarrollo de un marcador funcional para seleccionar plantas con mayor grado de tolerancia al estrés, su transferencia directa a otros genotipos de soja por mejoramiento convencional o por transgénesis, así como la utilización de este tipo de genes en otras especies vegetales. En suma, se espera que estos estudios contribuyan a desarrollar herramientas para la utilización de este tipo de genes en el mejoramiento convencional o molecular de la resistencia a la sequía en soja y otras plantas, teniendo como foco central del mejoramiento, la optimización del manejo de los recursos energéticos en condiciones de estrés. Este tipo de estrategias podrán ser viables a partir de los resultados obtenidos.

1. INTRODUCCIÓN

Frecuentemente los cultivos se ven sometidos a condiciones de estrés tanto biótico como abiótico a las que deben adaptarse para sobrevivir. Ejemplos de estrés abiótico son la sequía, las temperaturas extremas, la salinidad, la luz, las concentraciones de iones y metales pesados. Todos estos factores afectan la viabilidad, el crecimiento, la morfología y la productividad de las plantas (Vicuna *et al.*, 2011). Es por eso que el estudio de los distintos mecanismos de adaptación utilizados por las plantas para sobrellevar dichas condiciones son considerados de gran interés para la agricultura (Xiong and Zhu, 2001).

1.1.1. Mecanismos de tolerancia al estrés hídrico.

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado diferentes respuestas y adaptaciones que les permitieron sobrevivir en condiciones de déficit hídrico (Nilsen y Orcutt, 1996). Muchas de estas adaptaciones están relacionadas con una mayor capacidad de tomar agua o con un uso más eficiente de este recurso. El déficit hídrico y la salinidad en el suelo se han convertido en los mayores limitantes para la productividad de los cultivos en muchas partes del mundo. La sequía y la alta salinidad producen estrés osmótico disminuyendo la actividad química del agua y afectando la turgencia de la célula (Zhu, 2001). Estos estreses también causan una rápida y excesiva acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS; reactive oxygen species) en las células vegetales (Bartels, 2001; Zhu, 2001). El efecto de los ROS sobre los componentes celulares es extenso, reaccionando con proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, peroxidación de lípidos, etc. De los factores mencionados anteriormente, la sequía es el más frecuente e impredecible. El déficit hídrico afecta tanto al crecimiento como al desarrollo (Pandy *et al.*, 1984a; Pandy *et al.*, 1984b; Brown *et al.*, 1985). Para contrarrestar estos efectos las plantas son capaces de responder de varias maneras, entre ellas el cierre de los estomas que limita la pérdida de agua y el mantenimiento de la integridad del aparato fotosintético y de fijación de carbono (Horton *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1994).

Las plantas se adaptan a las condiciones de sequía implementando cambios fisiológicos, bioquímicos, anatómicos, morfológicos incluyendo modificaciones en la expresión génica. La fisiología de la respuesta de las plantas a la sequía es muy complejo e implica cambios perjudiciales y / o de adaptación. Esta complejidad se debe a algunos factores tales como la especie, la variedad, la dinámica, la duración y la intensidad de la sequía, las condiciones ambientales, así como la etapa de crecimiento en el que se desarrolló el déficit de agua. Las estrategias utilizadas por las plantas para hacer frente a la sequía implican normalmente una mezcla de evitar el estrés y estrategias de tolerancia (Seyed *et al.*, 2012).

Se conocen múltiples estrategias para lidiar con el estrés hídrico, empleadas en mayor o en menor medida por las distintas especies vegetales. Estos procesos forman parte de mecanismos de resistencia a la sequía que pueden ser agrupados en tres categorías: escape, evasión, y tolerancia (Carrow, 1996). El mecanismo de escape a la sequía tiende a maximizar la capacidad de la planta de completar su ciclo de vida antes de experimentar un serio déficit hídrico. Este mecanismo involucra rápidos cambios fisiológicos y en el desarrollo que incluyen la madurez y floración prematura y la dormancia o latencia en la estación seca. Los mecanismos de evasión por su parte, se caracterizan por la capacidad de la planta de mantener en los tejidos un potencial de agua relativamente alto, a pesar de la baja disponibilidad de agua en el suelo. Estos mecanismos están asociados a características del sistema radicular, así como con estrategias para la conservación del agua, como el cierre estomático, la baja conductancia cuticular, la reducción del área foliar y la baja absorción de luz. Finalmente, todas las estrategias que tienden a mantener la supervivencia de la planta o su productividad en condiciones de restricción hídrica en el suelo pueden ser considerados como mecanismos de tolerancia a la sequía. Estos involucran cambios metabólicos para el mantenimiento de la turgencia celular a través de mecanismos de ajuste osmótico, del aumento en la plasticidad celular, de la acumulación de solutos y proteínas con funciones de protección celular, así como

chaperonas, dehidrasas y enzimas tolerantes a la desecación (Jones *et al.*, 1981; Jones, 2004). La resistencia a la sequía es por lo tanto una característica compleja y multifactorial que depende de la combinación de muchos genes, proteínas y vías metabólicas, y que resulta de la combinación de varios caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.

Las plantas también responden al estrés por déficit hídrico a nivel celular y molecular (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Una de las principales respuestas al estrés hídrico es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico (Bray, 1997; Zhu *et al.*, 2002). Los osmolitos, principalmente compuestos orgánicos de bajo peso molecular, permiten el ajuste osmótico y facilitan la toma de agua por la planta (Cushman, 2001). Entre las proteínas más importantes por su efecto protector potencial están las LEA (*Late Embriogenesis Abundant Proteins*) y las que funcionan como antioxidantes (Danon *et al.*, 2004). Se ha propuesto que las proteínas LEA protegen proteínas y membranas del daño debido a la deshidratación (Bray, 1993). Durante el estrés hídrico también se induce la expresión de varios factores de transcripción que median la respuesta de genes a estrés hídrico algunos de los cuales se unen a secuencias específicas en la región promotora de los genes (Guiltinan *et al.*, 1990; Busk *et al.*, 1997). En muchos de estos procesos, el ácido abscísico (ABA) cumple una función reguladora central (revisado por Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

1.1.2. Ácido abscísico

Muchos factores de estrés abiótico dan lugar a la acumulación de ácido abscísico (ABA). El ABA es una fitohormona vegetal que regula muchos aspectos importantes del desarrollo de las plantas, entre los cuales se encuentran la síntesis de lípidos y proteínas de reserva de las semillas, la regulación de la inducción de la dormición de las semillas (inhibe la germinación precoz de embriones inmaduros promoviendo la dormición de las semillas), y la inhibición de la transición de la fase embrionaria a la germinativa y de la vegetativa a la reproductiva (Leung y Giraudat, 1998; Rock 2000; Rohde *et al.*, 2000). Esta hormona activa la expresión génica y desencadena una de las vías de transducción principales en respuesta al estrés (Xiong and Zhu, 2001). Se define como una hormona de estrés debido a su rápida acumulación en respuesta al estrés y su mediación en varias respuestas que ayudan a la planta a sobrevivir. Para cumplir el propósito de hormona reguladora, el ABA cumple con dos requisitos, su producción es rápida en respuesta al estímulo ambiental; y una vez desaparecido el estímulo la hormona se degrada rápidamente o es desactivada debido al efecto inhibitorio en el crecimiento que esta determina en la planta. El ABA regula varias respuestas fisiológicas en plantas (Koorneeff *et al.*, 1998; Cutler y Krochko, 1999; Liotenberg *et al.*, 1999). Está involucrado en la mediación de la tolerancia a la sequía por medio de la regulación de status hídrico de la planta a través del control de las células guarda, así como la inducción de genes que codifican enzimas involucradas en la tolerancia a la deshidratación.

Varios estudios apoyan la idea de que el ABA posee un rol dual en la regulación fisiológica de la planta (Cheng *et al.*, 2002; Finkelstein *et al.*, 2002). Por un lado tendría un rol inhibitorio cuando se acumula en grandes cantidades bajo el estímulo de estrés y ayuda a la planta a sobrevivir mediante el cierre de estomas e inhibición del crecimiento general de la planta. Por otro lado el ABA tendría un rol estimulante cuando se encuentra en bajas concentraciones y es esencial para el desarrollo vegetativo en varios órganos (Sharp *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 2000; Soppen *et al.*, 2000).

1.1.3. Cambios a nivel de la transcripción inducidos por estrés

Una de las respuestas moleculares al estrés es la modificación de la expresión de genes. Durante el déficit hídrico, diferentes tipos celulares responden incrementando o disminuyendo la

expresión de algunos genes. Estos cambios en la expresión génica le pueden conferir a la planta la habilidad para responder apropiadamente al estrés y sobrevivir a dicha condición (Moreno, 2009).

Existen vías de señalización activadas en condiciones de estrés hídrico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Algunas de ellas son dependientes del ABA y otras son independientes de esta hormona. La vía dependiente del ABA puede ser dividida en dos grupos, una que requiere la síntesis de nuevas proteínas y otra que no (Giraudat *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1996; Ingram y Bartels, 1996; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Bray, 2002). En la ruta en la cual no es necesaria la síntesis de nuevas proteínas participan genes cuyos promotores presentan secuencias específicas denominadas elementos de respuesta al ABA (ABRE; ABA-responsive element) de secuencia PyACGTGGC. Cuando a estos elementos de respuesta se unen los factores específicos de tipo bZIP (Basic leucine zipper) se produce la activación de la transcripción de los mismos.

En la ruta en la cual la síntesis de nuevas proteínas es requerida encontramos genes que poseen elementos de respuesta que se combinan con factores de transcripción de la familia MYC/MYB. Los promotores de estos presentan secuencias de reconocimiento para MYC (CANNTG) y/o MYB (A/TAACCA y C/TAACG/TG). Para la expresión de éste es esencial la unión al promotor de ambos factores de transcripción, que a su vez son inducibles por ABA (Abe *et al.*, 1997; Urao *et al.*, 1993).

En las vías independientes del ABA algunos genes pueden ser inducidos por la misma pero no es una condición esencial (Chandler y Robertson, 1994; Ingram y Bartels, 1996; Bray *et al.*, 1997; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Un ejemplo responde al ABA (ABRE) y el otro, conocido como DRE/CRT; dehydration responsive element/C-repeat), que no es afectado por los factores del tipo ABRE. Los elementos DRE/CRT consisten en una secuencia de 9 pares de bases TACCGACAT que son reconocidas por factores denominados DREB (DRE-binding proteins). Estos se clasifican en 2 grupos, DREB1 y DREB2, los primeros están involucrados en la expresión génica relacionada con la respuesta a estrés por bajas temperaturas, mientras que los últimos están involucrados en la respuesta a estrés hídrico. (Ingram y Bartels, 1996; Leung y Giraudat, 1998; Liu *et al.*, 1998).

1.2. Regulación de la síntesis proteica

Generalmente los estudios sobre los mecanismos de regulación de la expresión de los genes en respuesta al estrés abiótico se basan en análisis de cambios a nivel de la transcripción. A pesar de que existen numerosos trabajos que demuestran que la síntesis proteica es uno de los principales blancos de regulación celular en condiciones de estrés, son pocos los estudios sobre los mecanismos de regulación de la traducción (Baena-González, 2010; Muñoz y Castellano, 2012). La mayoría de las veces las condiciones de estrés provocan que la planta inhiba aquellos procesos celulares que requieren un alto consumo de energía, como por ejemplo, la síntesis de proteínas. Si bien el estrés compromete severamente la síntesis proteica global, algunas proteínas son activamente sintetizadas en estas condiciones, como parte de los mecanismos de adaptación y protección de las células (Holcik y Sonenberg, 2005). Es por eso que, para que la planta pueda sobrevivir bajo condiciones de estrés es necesario el manejo de los recursos energéticos y la regulación de la síntesis proteica cumple una función muy importante en este proceso (Baena-González, 2010; Van Der Kelen *et al.*, 2009). Diversos estudios demuestran que la regulación postranscripcional de genes, específicamente a nivel de la traducción de sus ARN mensajeros (ARNm), es crucial en la respuesta adaptativa a distintos factores de estrés abiótico, entre ellos hipoxia, altas temperaturas, salinidad y déficit hídrico (Floris *et al.*, 2009).

En eucariotas, la traducción se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Evidencias experimentales indican que el principal blanco de regulación de la síntesis proteica es el paso de iniciación de la traducción (Muñoz y Castellano, 2012), el cual requiere de la interacción de múltiples factores de iniciación de la traducción (eIF: eukaryotic initiation factors)(Pestova *et al.*, 2007). La mayoría de los transcritos son traducidos mediante un mecanismo dependiente de la estructura cap (7-metil guanosina), ubicada en el extremo 5' de los ARNm. En condiciones de estrés, esta modalidad de traducción dependiente de la estructura cap puede verse afectada por diferentes

mecanismos que condicionan la actividad de algunos factores de iniciación (Muñoz y Castellano, 2012). Por otro lado, se conocen otros mecanismos de iniciación de la traducción que son independientes de la estructura cap, como los mediados por IRES (Internal Ribosome Entry Sites) o CITEs (Cap-Independent Translational Enhancers). La presencia de IRES y CITEs en determinados ARNm permite la traducción eficiente de ellos en condiciones en las cuales la iniciación dependiente de cap está afectada, como es el caso del estrés abiótico (Komar y Hatzoglou, 2011). En plantas se ha observado traducción de ARNm independiente del cap en condiciones de estrés biótico y abiótico (Muñoz y Castellano, 2012).

Entre los mecanismos de regulación de la iniciación de la síntesis proteica, son importantes los que involucran eventos de fosforilación de algunos eIFs impactando sobre su actividad (Manjunath *et al.*, 1999; Kawagushi y Bayley-Serres, 2002; Lageix *et al.*, 2008). Además, varios estudios demuestran que algunas condiciones de estrés están correlacionadas con la presencia o ausencia de las distintas isoformas de eIFs (Gallie *et al.*, 1998; Mayberry *et al.*, 2009). Todos estos estudios indican que existe un nivel adicional de regulación de la expresión génica específico de plantas, el cual resulta de particular interés para evaluar su relevancia funcional en la capacidad de adaptación de las plantas al estrés en general, y en especial al estrés hídrico.

1.2.1. Factores de iniciación de la traducción

La traducción es el proceso de síntesis de proteínas, e involucra la participación de varios factores que forman un complejo compuesto por ribosomas, ARNt y factores adicionales, incluyendo aminoacil ARNt sintetasas. La traducción se puede subdividir en varias etapas: iniciación, elongación, terminación y el reciclaje. La iniciación de la traducción supone ensamblar las dos subunidades ribosomales, el ARNm a traducir, el primer aminoacil-ARNt, GTP (como fuente de energía) y factores de iniciación (eIFs) que ayudan a ensamblar el sistema de iniciación. La elongación de la cadena polipeptídica consiste en la adición de aminoácidos al extremo carboxilo de la cadena. La terminación ocurre cuando uno de los tres codones de terminación es añadido a la proteína en crecimiento (Marintchev and Wagner, 2004).

1.2.2 Factor de iniciación de la traducción 5A

El factor *eIF5A* (eIF5A, eukaryotic initiation factor 5A) es un factor de iniciación de la traducción muy conservado que se encuentra en todos los organismos eucariotas (Gordon *et al.*, 1987). eIF5A es sintetizado como un precursor inactivo que se activa por una modificación post-traduccional que ocurre solamente en la proteína eIF5A, donde se forma el aminoácido inusual hipusina en dos pasos catalizados por la desoxihipusina sintasa (DHS) y la desoxihipusina hidroxilasa (DHH), respectivamente y es esencial para la actividad biológica de eIF5A.

La función celular precisa de eIF5A no está totalmente clara. Algunos estudios indican que promueve la formación del primer enlace peptídico en la iniciación de la síntesis de proteínas. Además, eIF5A está involucrado en la proliferación celular y la apoptosis (Chatterjee *et al.*, 2006), promueve la viabilidad celular, el crecimiento celular (Park *et al.*, 2010) y la síntesis de las proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular (Clement *et al.*, 2006). Por otra parte, las proteínas eIF5A facilitan la síntesis de proteínas mediante la participación en la exportación nuclear de ARNm específicos (Liu *et al.*, 2008), también juegan un papel en la unión al ARN (Teng *et al.*, 2009). El eIF5A parece facilitar la síntesis de proteínas, actuando como un proteína de transporte que va y viene del núcleo al citoplasma, translocando selectivamente subconjuntos específicos de ARNm desde el núcleo hasta el citoplasma para la traducción (Xu *et al.*, 2011) (Figura 1).

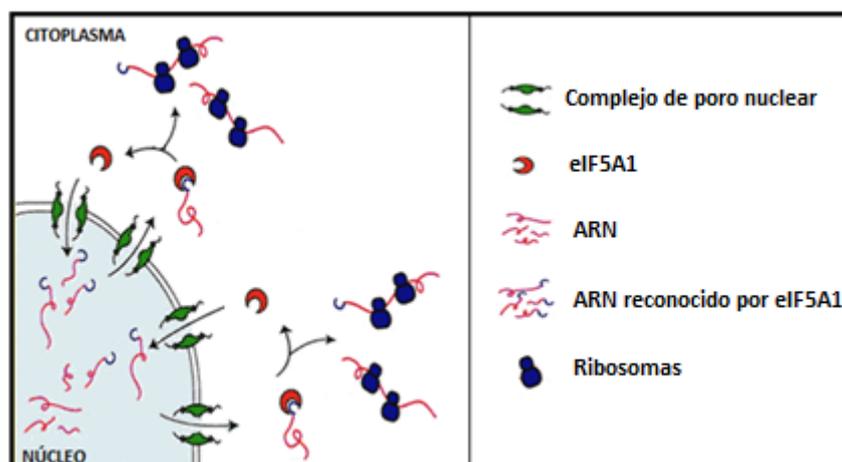


Figura 1. Función de eIF5A. Esquema de la posible función de la proteína eIF5A como una proteína que va y viene del núcleo translocando ARNm específicos. (Imagen modificada de Miura *et al.*, 2001).

Las proteínas eIF5A en vegetales también se encuentran altamente conservadas, y están involucradas en múltiples procesos biológicos, incluyendo regulación de la síntesis proteica, elongación de la traducción, recambio y metabolismo del ARNm, la proliferación celular, crecimiento de la hoja y raíz, el rendimiento de semilla, de hoja, la senescencia de la flor y el fruto y la muerte celular programada (Wang *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2011). Los eIF5A también están involucrados en respuestas de estrés abiótico (Hopkins *et al.*, 2008). Por ejemplo, Xu *et al.*, (2011) mostró que plantas de *A. thaliana* transgénicas que sobreexpresan RceIF5A de *Rosa chinensis* muestran una mayor resistencia al calor, estrés oxidativo y osmótico, mientras que las plantas con expresión de eIF5A reducida son más susceptibles a estas tensiones (Ma *et al.*, 2010). Chou *et al.*, (2004) reportaron que el estrés por sal y metales pesados induce la expresión de genes *eIF5A* en arroz lo que sugiere que están implicados en la tolerancia al estrés (Chou *et al.*, 2004). Sin embargo, poco se sabe de los reguladores de este gen y su papel en la tolerancia al estrés. Además, si de hecho los genes *eIF5A* confieren tolerancia al estrés en las plantas, los cambios fisiológicos mediados por eIF5A merecen mayor estudio.

Existen tres isoformas de eIF5A en *A. thaliana* (Thompson *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003). eIF5A-1 juega un rol crucial alterando la abundancia del xilema (Liu *et al.*, 2008). Plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan eIF5A de distintas especies muestran resistencia a distintos tipos de estrés abiótico (Wang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2011). eIF5A-2 es un elemento clave en la vía de transducción de señales que resulta tanto en el desarrollo de la planta así como en la muerte celular programada, también está involucrado en la muerte celular inducida por patógenos y en el desarrollo de los síntomas en enfermedades de las plantas (Hopkins *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2007). eIF5A-3 juega un papel en el apoyo al crecimiento de plantas y en regulación de las respuestas a estrés osmótico y de nutrientes (Ma *et al.*, 2010).

1.3. La soja en Uruguay.

En Uruguay, la soja (*Glycine max*) es uno de los cultivos con mayor superficie de siembra, 890 mil hectáreas en la zafra 2012/2013 (según la encuesta oficial del MGAP) algo más del 80% de las 1.105.000 hectáreas con cultivos de verano. Además es uno de los productos de mayor exportación del país, en 2012 se obtuvo un promedio de 2,5 millones de toneladas que a un precio de US\$ 500 por tonelada genera el ingreso de US\$ 1.275 millones, muy cerca de lo que se genera por exportación de carne. Dado el impacto económico que la sequía tiene sobre la producción de soja cualquier esfuerzo para mejorar los rendimientos bajo condiciones de estrés hídrico provocará beneficios a la producción de este cultivo en el Uruguay.

Es un cultivo interesante no solo por ser la principal fuente de aceite vegetal y de proteínas para el consumo alimenticio a nivel mundial y sino que también tiene características nutricionales, como su alto contenido en metabolitos secundarios (Sakai y Kogiso, 2008; Osoki y Kennelly, 2003).

La soja es un cultivo de verano que se ve afectado por los períodos de sequía que se producen durante esta estación. Estas condiciones afectan el crecimiento de las plantas, reduciendo la floración y fructificación, disminuyendo el número y tamaño de las semillas, derivando en una reducción de la producción y afectando los rendimientos del cultivo de soja a lo largo de todas las etapas de su desarrollo (Abdel-Haleem *et al.*, 2011). Condiciones ambientales desfavorables durante el desarrollo y maduración de las semillas reduce la viabilidad y el vigor (Tekrony *et al.*, 1980; Salinas *et al.*, 1989; Dornbos *et al.*, 1989). Un estrés lo suficientemente severo, como para interrumpir el crecimiento de las semillas, produce semillas pequeñas y livianas (Delouche, 1980). Es por eso que la identificación de los loci genéticos involucrados en la resistencia a la sequía en distintas especies vegetales es de suma importancia. En condiciones de déficits hídricos, la planta de soja reduce su metabolismo para poder sobrellevar las condiciones de estrés, y reinicia su actividad metabólica normal cuando las condiciones de crecimiento vuelven a ser normales (Dornbos y Mullen, 1992). Existen diversas características asociadas a la resistencia a la sequía en soja entre ellas encontramos aquellas que están relacionadas con la raíz (Abdel-Haleem *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2005), a la capacidad de fijar nitrógeno en condiciones de restricción hídrica (Sinclair y Serraj, 1995), así como caracteres asociados con tolerancia en partes aéreas. Estos últimos incluyen un adecuado control estomático sobre la pérdida de agua (Bennet *et al.*, 1987), la eficiencia en el uso del agua, definida como la cantidad de biomasa acumulada por unidad de agua utilizada (Liu *et al.* 2005) y el control de la turgencia celular a través de mecanismos de ajuste osmótico (Turner *et al.*, 2001; James *et al.*, 2008).

Los programas de mejoramiento para la obtención de variedades de soja con mayor grado de resistencia a la sequía no han dado buenos resultados hasta el día de hoy. Es por esta razón necesaria la utilización de diversas estrategias que integren distintas aproximaciones experimentales para explicar los complejos mecanismos involucrados en la resistencia al estrés hídrico en soja y poder aprovechar este conocimiento para generar cultivares con un alto potencial de rendimiento bajo condiciones de sequía.

1.4. Antecedentes del proyecto.

El gen de soja, *eIF5A1* (*Glyma02g36500*) fue identificado por el grupo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias en el marco de un proyecto llevado a cabo en conjunto con el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía. El objetivo de dicho proyecto era la identificación de genes como posibles candidatos para aumentar la resistencia al estrés hídrico en plantas. El gen fue inicialmente aislado de un genotipo de soja resistente a la sequía seleccionado por su fenotipo de “slow wilting” en condiciones de estrés hídrico. En el marco de la participación de este grupo en el proyecto “Aproximación genómica integrada en el MERCOSUR para la prospección de genes útiles al mejoramiento de la soja frente al estrés biótico y abiótico”, el laboratorio cuenta con genotipos de soja caracterizados en cuanto a su desempeño en condiciones de estrés hídrico y definidos como tolerantes o susceptibles a la sequía. Fueron dos los cultivares con genotipos contrastantes los utilizados para el análisis de genes, el cultivar resistente N7001 (Hufstetler *et al.*, 2007) y el cultivar susceptible TJ2049. El trabajo se basó en la generación de bibliotecas de DNAC sustraídas, enriquecidas en secuencias correspondientes a genes inducidos en condiciones de estrés hídrico en el genotipo resistente N7001. Para ello se utilizó la técnica de Suppression Subtraction Hybridization (Diatchenko *et al.*, 1996), la cual permite el enriquecimiento de las muestras en transcritos de baja abundancia, y por lo tanto aumenta la posibilidad de identificar genes reguladores, los cuales son generalmente de baja expresión. Los clones de la biblioteca fueron secuenciados y algunos de ellos fueron seleccionados para el análisis de expresión y funcional. Se identificaron varios genes con expresión diferencial entre las plantas

resistentes y susceptibles. El perfil de expresión de estos genes fue comparado entre plantas resistentes y susceptibles a la sequía, mediante análisis de Northern blot utilizando muestras de ARN correspondientes a plantas en estrés hídrico y controles (Figura 2).

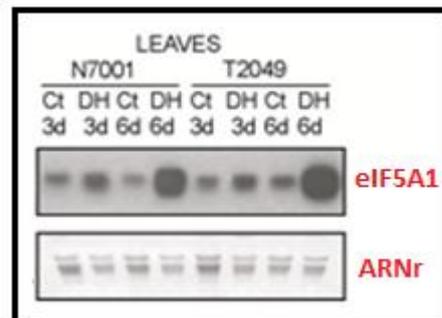


Figura 2. Northern blot. Acumulación de transcritos del gen *eIF5A1* en condiciones control (Ct) y en respuesta a deshidratación (DH), en los tiempos 3 y 6 días luego de comenzar el estrés, en el genotipo resistente N7001 y susceptible TJ2049.

Entre los genes identificados con posible función reguladora de la respuesta al estrés, el gen *eIF5A1* resultó de particular interés por las características de su secuencia así como su patrón de expresión. *eIF5A1* muestra cierta expresión basal en plantas sin estrés, y su expresión se induce más aún por sequía tanto en plantas resistentes como en plantas susceptibles. En ambos cultivares se observa la acumulación de su transcrito en condiciones de estrés (Figura 2).

En base a los antecedentes del trabajo, y de los datos aportados por la literatura, se decidió profundizar en el análisis funcional del gen *eIF5A1* como candidato para el mejoramiento molecular de la resistencia al estrés en soja.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el rol del gen *eIF5A1* de soja en la tolerancia al estrés hídrico y a otros tipos de factores de estrés abiótico en plantas. Como estrategia general se generaron herramientas para evaluar el efecto de la expresión heteróloga del gen *eIF5A1* de soja en *Arabidopsis thaliana*, así como para determinar la localización subcelular del producto de este gen mediante ensayos de expresión transitoria en plantas.

2.2. Objetivos específicos

- Clonado del gen *eIF5A1* en el vector de entrada pENTR2B.
- Generación de una construcción génica que exprese el gen *eIF5A1* fusionado con GFP, bajo el control de un promotor constitutivo.
- Determinación de la localización subcelular del producto de este gen mediante ensayos de expresión transitoria en plantas de tabaco.
- Generación de una construcción génica para la expresión constitutiva del gen *eIF5A1* de soja en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivo específico a largo plazo: Analizar el fenotipo de las líneas resultantes en condiciones normales y en estrés. Esta etapa del proyecto escapa al contenido de este trabajo debido a limitaciones temporales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Extracción de ARN de plantas de soja.

El ARN fue extraído de plantas de soja del genotipo N7001 en condiciones de estrés hídrico. Se molió 1 g de material vegetal en nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se se paso a tubos falcon con 3ml de fenol, 6 ml de NTES (0,1 M NaCl; 0,01 M Tris-HCl pH 7,5; 1 Mm EDTA; 1% SDS) y 3 ml de cloroformo. El homogenizado se centrifugó durante 20 minutos a 5000 rpm y se transfirió a tubos corvex tratados con DEPC (Dietilpirocarbonato). Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa fueron separados mediante precipitación con 0,1 volúmenes de 3 M acetato de sodio pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 95% durante 3 horas a -20 °C. El pellet se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se resuspendió en agua destilada estéril tratada con DEPC y con un volumen igual de LiCl 4 M. Las muestras fueron precipitadas toda la noche en hielo y finalmente se resuspendió en agua DEPC. Durante todo el proceso se trabajó en frío, con guantes, minimizando la acción de las enzimas ARNasas.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para determinar la integridad del ARN, se estimó la concentración y pureza del ARN por espectrofotometría midiendo absorbancias a 260 y 280 nm.

3.2. Electroforesis en gel de agarosa.

Para la visualización tanto de ARN como de ADN se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v. Los mismos se tiñeron con 500 ng/mL de bromuro de etidio (BrEt) utilizando el buffer 1X TAE [0,04 M Tris base, 1 μM EDTA pH 8.0] (Sambrook et al. 1989). Todas las muestras se cargaron con buffer de carga TD [4 % Ficoll, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.01% bromophenol blue, 0.02 % p/v xilenecyanol blue]. El marcador de peso molecular utilizado para estimar el tamaño y la concentración fue el ADN del fago λ digerido con la enzima *Pst*I (Fermentas). (Figura 3)

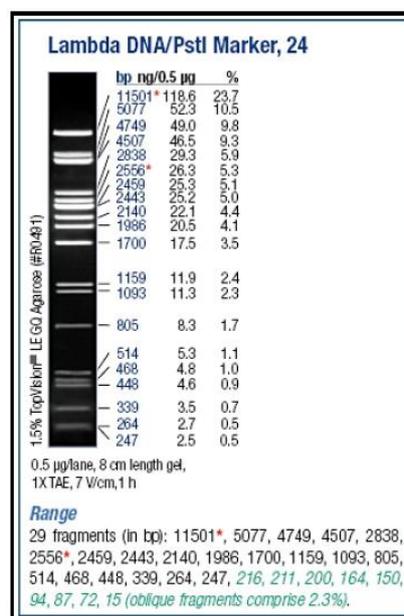


Figura 3. Marcador de peso molecular. ADN del fago λ digerido con la enzima *Pst*I.

3.3. Obtención de ADNc a partir de ARN.

El ADNc del gen *eIF5A1* se obtuvo a partir de la transcripción reversa de muestras de ARN extraído de plantas del genotipo N7001 en condiciones de estrés hídrico. Para ello se utilizó la enzima Transcriptasa Reversa RevertAid (Fermentas). La reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l, utilizando: 1.0 μ l de Transcriptasa Reversa RevertAid (Fermentas), 5.0 μ g de ARN, 0.5 μ g de oligo (dT), 2.0 μ l de dNTP, 4.0 μ l de buffer de reacción 5X (Fermentas), 0.5 μ l de inhibidor de ARNasa y 10 μ l de agua DEPC. La mezcla se incubó 60 minutos a 42 °C. Para comprobar que se obtuvo ADN se realizó una PCR y la misma se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v.

3.4. Clonado del gen *eIF5A1* y eliminación del codón de terminación.

Se realizó una reacción de PCR con el objetivo de clonar el gen de interés y eliminar el codón de terminación del gen *eIF5A1* para su clonado en el extremo 5' del gen de *GFP* y del epítipo de hemaglutinina (3HA) en los vectores pK7FWG2 y pGWB14, respectivamente. La misma se llevó a cabo en un termociclador MultiGene II (Labnet International Inc). Para la amplificación del gen en estudio se utilizaron cebadores con los sitios de restricción adecuados para la ligación con el vector pENTR2B (Invitrogen) (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación del gen *eIF5A1* (en negrita se observa el sitio de restricción de las enzimas).

Nombre	Secuencia	Sitio de restricción	T _m (°C)
208 EcoRI	CGGAATTCATGTCGGACGAAGAGCATC	<i>EcoRI</i>	56.2
208 XhoI	ATCACTCGAGTTTTGGACCGATGTCCTTC	<i>XhoI</i>	53.8

La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 50 μ l, utilizando: 1.0 μ l de la enzima Advantage 2 (Clontech), 5.0 μ l de buffer Advantage 2 PCR 10X, 1.0 μ l de dNTP (10 mM), 2.0 μ l de cada cebador (10 μ M), y 1.0 μ l (100 ng/ μ l) de ADNc. El programa de PCR utilizado fue: 95 °C 2 min; 30 ciclos: 95 °C 30 seg, 55 °C 30 seg, 68 °C 35 seg y 68 °C 10 min. La reacción se visualizó en un gel de agarosa al 1% p/v.

3.5. Purificación del gen de interés a partir de gel.

El fragmento de PCR obtenido en la sección 3.4 se separó en electroforesis en gel de agarosa. La banda de interés se cortó del gel y se purificó utilizando el kit GenCatchTM Advanced gel extraction kit (Epoch Biolabs). La misma se incubó con 3 volúmenes de buffer GEX a 55 °C durante 10 minutos, una vez disuelto se transfirió a la columna y se centrifugó durante 30 segundos a 5000 rpm. En cada instancia se descartó el volumen eluído hasta terminar de pasar todo el volumen inicial por la columna. Luego se lavó con buffer WN, y se centrifugó durante 30 segundos a 5000 rpm, descartando el volumen eluído. Posteriormente se utilizó el buffer WS para lavar la columna, centrifugando, en un primer paso, durante 1 min a 5000 rpm, y luego durante 3 min a 1200 rpm para eliminar el etanol. Por último se paso la columna a un tubo eppendorf para recolectar el ADN, se eluyó con 30 μ l agua miliQ y se centrifugó durante 1 min a 12000 rpm.

3.6. Obtención de extremos cohesivos en el gen.

La obtención de los extremos cohesivos para la ligación del gen *eIF5A1* en el vector de entrada pENTR2B (Invitrogen) se realizó a través del corte, tanto del inserto como del vector, con la enzima *EcoRI* y *XhoI* (Fermentas). Se llevaron a cabo dos reacciones independientes en un volumen final de

70 µl, conteniendo: 1 µl de enzima *EcoRI*, 1 µl de enzima *XhoI*, 14 µl de buffer Tango 10X, y 40 µl de ADN del vector pENTR2B para una reacción y 40 µl de del gen *eIF5A* obtenido mediante PCR para la otra. La incubación se realizó a una temperatura de 37 °C durante 2 horas.

3.7. Ligación del vector pENTR2B con el inserto eIF5A1.

Luego de utilizar cebadores específicos que amplifican la región codificante completa del gen, se clonó en el vector pENTR2B. Para el clonado en ese vector se utilizó la tecnología Gateway (Invitrogen, San Diego, CA), la cual permite transferir fragmentos de ADN entre plásmidos basado en la recombinación de sitios específicos en dichos plásmidos. En primer lugar, se deben clonar las secuencias codificantes génicas en estudio en un vector de entrada, denominado pENTR. Una vez clonado en este vector, el gen queda flanqueado por las secuencia attL1 y attL2, las cuales podrán ser recombinadas con las secuencias attR1 y attR2 que se encuentran en el vector de destino utilizando la enzima clonasa LR (Invitrogen, San Diego, CA). Tanto los vectores de destino como los de entrada contienen el gen *ccdB*, el cual es letal en la mayoría de las cepas de *E. coli*. Estos vectores vacíos son por lo tanto seleccionados luego de su transformación en las células *E. coli*. Esta selección negativa combinada con la selección positiva debido a la resistencia de un antibiótico, asegura que las colonias resultantes contengan el plásmido que hayan incorporado exitosamente el gen en estudio.

Para obtener la construcción deseada, pENTR2B-eIF5A1 (Figura 5-1), se llevo a cabo la ligación de los fragmentos obtenidos tras la digestión del inserto eIF5A1 y el vector pENTR2B, en una relación molar vector:inserto de 1:3. Se utilizo la enzima T4-ADN ligasa (Fermentas). La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, utilizando: 1 u (0.2 µl) de T4-ADN ligasa (Fermentas), 100 ng (4.0 µl) del vector lineal (pENTR2B digerido con *EcoRI* y *XhoI*), 2.0 µl del inserto (eIF5A, obtenido por PCR y digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*), y 2.0 µl de buffer T4-ADN ligasa 10X (Fermentas). La mezcla se incubó 10 minutos a 22 °C. Para mejorar la eficiencia de transformación la enzima T4-ADN ligasa se inactivo a 65 °C por 5 minutos.

3.8. Preparación de células electrocompetentes.

Con el objetivo de obtener células permeables al plásmido recombinante creado se procedió a la generación de las mismas. Para ello se inocularon 500 ml de medio LB (10 g/l Bacto triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, pH 7.0) líquido con 5 ml de un cultivo fresco de bacterias *E. coli* de la cepa Top10, se dejó el cultivo creciendo a 37 °C con agitación de 300 rpm hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0.5-0.7. Se dejaron enfriar las células en hielo por aproximadamente 20 minutos y se centrifugó el cultivo a 4000 g por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 500 ml de glicerol 10% frío y se centrifugó el cultivo a 4000 g por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 250 ml de glicerol 10% frío y se centrifugó el cultivo a 4000 g por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 20 ml de glicerol 10% frío y se centrifugó el cultivo a 4000 g por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 1-2 ml de glicerol 10% frío. La concentración de células debe ser de $1-3 \times 10^{10}$ células/ml. Para congelar las bacterias electrocompetentes, se las fraccionó en tubos de a 50 µl y se las guardó a -80 °C.

Para la preparación de células *A. tumefaciens* de la cepa C58C1 se siguen los mismos pasos utilizando el medio YEP (1% extracto de levadura, 1% peptona, 0,5% NaCl) líquido y creciendo las mismas a 30 °C.

3.9. Transformación de células *E. coli* electrocompetentes.

Las mezclas de ligación o recombinación obtenidas se utilizaron para la transformación de células electrocompetentes, de la cepa Top10 de *E. coli* generadas en el laboratorio de Biología

Molecular Vegetal de acuerdo al método descrito por Inoue et al. (1990). Para ello se agregaron 3 μ l de la reacción de ligación o 2 μ l de la reacción de recombinación a 50 μ l de células electrocompetentes, las mismas fueron electroporadas utilizando un electroporador *Gene Pulser Xcell™* (Bio-Rad) y las siguientes condiciones: voltaje: 2500 V, capacitancia: 25 μ F, resistencia: 200 Ω , y un pulso de 4.5-4.8 ms. Se agregaron 1000 μ l de medio LB (10 g/l Bacto triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, pH 7.0) líquido o YEP (1% extracto de levadura, 1% peptona, 0,5% NaCl) y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación.

Las células transformadas con el vector se plaquearon en medio correspondiente (Tabla 2) y se crecieron en estufa a 37 °C durante toda la noche. Se seleccionaron 8 colonias y se estiraron en una nueva placa, creciendo en iguales condiciones que las anteriores.

Tabla 2. Medios y antibióticos. Para los diferentes vectores se utilizan diferentes medios y antibióticos.

Vector	Medio	Antibiótico
pENTR2B	LB agar	Kanamicina 50 μ g/ml
pK7FWG2	LB agar	Espectomicina 50 μ g/ml
pGWB14	YEP agar	Kanamicina 50 μ g/ml y Hygromicina 200 μ g/ml

3.10. Purificación de los plásmidos.

Las colonias de *E. coli* aisladas se crecieron en su medio correspondiente durante toda la noche a 37°C con agitación. El ADN plasmídico fue aislado utilizando mini preparaciones de plásmidos mediante el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). En primer lugar, se centrifugó el cultivo 30 segundos a 13 000 rpm. Se re suspendió el pellet en 300 μ L de *buffer 1* [50 mM tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 μ g/mL RNAsa] y se vortexeó. Luego se agregaron 300 μ l de *buffer 2* [200 mM NaOH; 1% SDS], se invirtió el tubo varias veces, y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 300 μ L de *buffer 3* [3 M acetato de potasio pH 5.5; 11% ácido acético glacial], se invirtió el tubo e inmediatamente se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 13 000 rpm, se recuperó el sobrenadante. Para precipitar el ADN de la muestra, se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol, se invirtió el tubo varias veces y se centrifugó a velocidad máxima durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1000 μ l de etanol 70%, centrifugando durante 5 minutos a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado. El ADN se resuspendió en 50 μ l de agua miliQ, y se almacenó a -20 °C.

3.11. Análisis de plásmidos por ensayo de restricción.

Los plásmidos obtenidos de las células transformadas con las construcciones pENTR2B-eIF5A, pK7FWG2-eIF5A1 y pGWB14- eIF5A1 se analizaron por ensayo de restricción mediante la digestión con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* (Fermentas). La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 30 μ l en una doble digestión con 0.3 μ l de las enzimas (*EcoRI* y *XhoI*, buffer Tango 10X (Fermentas), utilizando 0.5 μ g de ADN por unidad de enzima. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C, durante 1 hora. La doble digestión fue diseñada en base a las condiciones sugeridas por Fermentas "DoubleDigest™", que se encuentra disponible en la web (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>). Los productos del ensayo de restricción fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% p/v. Aquellos plásmidos donde se confirmó la presencia del inserto fueron utilizados para ensayos posteriores.

3.12. Vectores binarios.

Con el fin de generar una construcción génica que exprese el gen *eIF5A1* fusionado con GFP en tabaco, se utilizó el vector binario pK7FWG2 del sistema Gateway (Pierre Francois Perroud; Department of Biology, Washington University, St. Louis, MO 63130, USA). El mismo confiere resistencia a espectomicina en bacterias y a kanamicina en plantas, y se encuentra bajo la regulación del promotor constitutivo p35S (Figura 5-2).

El vector binario pGWB14 se utilizó con el fin de generar una construcción génica para la expresión constitutiva en *A. thaliana* del gen *eIF5A1* de soja fusionado con el epítotope de hemaglutinina, dicho vector del sistema Gateway (Pierre Francois Perroud; Department of Biology, Washington University, St. Louis, MO 63130, USA) confiere resistencia a hygromicina en bacterias y plantas, y se encuentra bajo la regulación del promotor constitutivo p35S (Figura 5-3).

3.13. Recombinación del vector de entrada pENTR2B con los vectores binarios pK7FWG2 y pGWB14.

En el vector pENTR2B, el gen *eIF5A1* queda flanqueado por los sitios *attL1* y *attL2*, los cuales se recombinan con los sitios *attR1* y *attR2* en el vector destino pK7FWG2 y pGWB14. La recombinación se llevó a cabo en un volumen final de 5 μ L con la enzima clonasa LR (Gateway LR Clonase II enzyme mix); y para ello se utilizó: 1 μ l enzima clonasa II LR, 2 μ l pENTR2B (100 ng/ μ l), y 2 μ l pK7FWG2 (150 ng/ μ l), y se incubó a 25 °C durante toda la noche. Por último se agregó 1 μ l de proteinasa K, y se incubó durante 10 minutos a 37 °C, para detener la reacción. La mezcla de recombinación obtenida se utilizó para transformar células electrocompetentes (como se describe en la sección 3.9.).

3.14. Secuenciación de las construcciones pK7FWG2-eIF5A1 y pGWB14-eIF5A1.

Para completar el análisis del gen en estudio se secuenció la construcción obtenida empleando el servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo. La secuenciación automática se obtuvo a partir de una concentración entre 100 y 500 ng de plásmido (pK7FWG2-eIF5A1 y pGWB14-eIF5A1) para un volumen total de reacción de 7 μ l. La concentración de los cebadores empleados fue de 10 μ M. Para la secuenciación de la construcción pK7FWG2-eIF5A1 se utilizaron cebadores que se unen a las secuencias que flanquean el gen de interés y para la secuenciación de la construcción pGWB14-eIF5A1 se utilizó un cebador específico que se une a la secuencia de GFP en el vector pK7FWG2. Las secuencias obtenidas fueron analizadas en la base de datos Phytozome, (<http://www.phytozome.net/>), y con los programas Serial Cloner 2.6.1 y SeqBuilder v7.0 (DNASTAR Inc, Madison WI).

Una vez obtenida la construcción deseada y confirmada por secuenciación, se guardó un stock de las bacterias recombinantes (500 μ L de cultivo líquido) en glicerol 30% a -80°C para ser utilizado en los ensayos posteriores.

3.15. Transformación de *A. tumefaciens* electrocompetentes.

Tanto para infiltrar hojas de tabaco como para transformar *A. thaliana* se transformaron bacterias de *A. tumefaciens* electrocompetentes de la cepa C58C1 (Deblaere *et al.*, 1985) generadas en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal. Para ello se agregaron 2.0 μ l de la reacción de recombinación a 50 μ l de células electrocompetentes, las mismas fueron electroporadas utilizando un electroporador *Gene Pulser Xcell*TM (Bio-Rad) y las siguientes condiciones: voltaje: 2400 V, capacitancia: 25 μ F, resistencia: 200 Ω , y un pulso de 5.0 ms. Se agregaron 1000 μ l de medio YEP (1% extracto de levadura, 1% peptona, 0,5% NaCl) y se incubó durante 1 hora a 30 °C con agitación. Las células transformadas con la construcción se plaquearon en medio correspondiente (Tabla 3) y se

crecieron en estufa a 30 °C durante toda la noche. Se seleccionaron 8 colonias y se estriaron en una nueva placa, creciendo en iguales condiciones que las anteriores.

Tabla 3. Medios y antibióticos. Para los diferentes vectores se utilizan diferentes medios y antibióticos.

Vector	Medio	Antibiótico
pK7FWG2	YEP agar	Espectomicina 100 µg/ml y Rifampicina 100 µg/ml
pGWB14	LB agar	Kanamicina 50 µg/ml y Rifampicina 100 µg/ml

3.16. Identificación de clones por PCR.

Para corroborar la presencia del gen en las colonias seleccionadas en la sección 3.15. se utilizaron los mismos cebadores que en la sección 3.4. los cuales permitieron la amplificación de eIF5A1 en el vector pK7FWG2 y en el vector pGWB14. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, utilizando: 0.2 mM de cada dNTP's, 0.5 µM de cada cebador, 1X buffer de PCR, 1 U enzima Taq polimerasa (Fermentas), ADN plasmídico (eIF5A- pK7FWG2) obtenido resuspendiendo colonias en 50 µl de agua, y c.s.p 50 µl de agua para PCR (miliQ filtrada). Se realizaron dos reacciones paralelas y en idénticas condiciones, una con ADN plasmídico obtenido como control positivo y un control negativo, sin ADN, para descartar así la presencia de contaminación. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo simultáneamente en un termociclador MultiGene II (Labnet International Inc). El programa utilizado para la amplificación fue: 95 °C 2 min; 30 ciclos: 95 °C 30 seg, 55 °C 30 seg, 68 °C 35 seg y 68 °C 10 min. Los productos de la amplificación fueron analizados en un gel de agarosa al 1% p/v.

3.17. Agroinfiltración de hojas de tabaco.

La agroinfiltración de hojas de tabaco consiste en introducir en el apoplasto (espacio extracelular) de hojas de tabaco, un cultivo de *A. tumefaciens* conteniendo un plásmido con la construcción de interés (pK7FWG2-eIF5A1) (Vaucheret, 1994; Vaghchipawala *et al.*, 2010; Sheludko *et al.*, 2006). La agroinfiltración se llevó a cabo inoculando con estrías frescas del cultivo de *A. tumefaciens* (obtenidas en la sección 3.15.) en 3 mL de medio YEP agar suplementado con espectomicina 100 µg/ml y rifampicina 100 µg/ml el cual se creció durante toda la noche con agitación a 28 °C. Se centrifugó 1 mL del cultivo durante 5 minutos a 5000 r.p.m. a temperatura ambiente, se resuspendió el precipitado en 1 mL de buffer de infiltración (50mM de MES, 2mM de Na₃PO₄, 0.5% de Glucosa, 100 µM de acetosyringona) se centrifugó, y se repitió este paso una vez más. Se diluyó la suspensión bacteriana con buffer de infiltración hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0.1. Se perforaron las hojas y se infiltraron los agujeros con el cultivo por el revés de la hoja. Se incubó la planta durante 2 días.

3.18. Visualización de eIF5A-GFP por microscopia confocal.

Para la observación de la fluorescencia de las hojas de tabaco se cortaron trozos de las hojas infiltradas y se colocaron en un portaobjetos, se montó con agua y se cubrieron con cubreobjetos. Se recurrió al servicio del microscopio confocal de la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo. Las longitudes de onda (λ) utilizadas para la observación de GFP fueron de 488 nm para la excitación y 500 nm para la emisión.

3.19. Transformación de *Arabidopsis thaliana*.

Plantas de *A. thaliana* (Col-0) se crecieron *in vitro* para la transformación con *A. tumefaciens*. Las semillas se esterilizaron en solución hipoclorito de sodio al 7% con Tween-20 y posteriormente se crecieron en el medio de crecimiento MS2% (Murashige & Skoog, 20 g/L de sacarosa, ácido Monohydrate 2-ethanesulfonic acid [MES], 1,5% agar, pH 5,7). Cuando las plantas tuvieron el tamaño adecuado se pasaron a tierra, se sembraron en 5 macetas conteniendo 5 plantas cada una de ellas. Las plantas se crecieron a 22 °C, con un fotoperiodo de 16 horas y un flujo fotónico de 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$. Se cortaron las inflorescencias primarias y cuando se llegó al estado en que las plantas presentaron una mayoría de botones florales, se procedió a la transformación por inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Para ello se inocularon 500 mL de medio YEP suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de espectomicina, con cultivos frescos de *A. tumefaciens* conteniendo la construcción pGWB14-eIF5A. Se incubó toda la noche a 28°C con agitación de 200 rpm, o hasta llegar a una densidad óptica de aproximadamente 2.0. Se centrifugó el cultivo durante 20 min a 5.500 g y se resuspendió en 500 ml de buffer de infiltración (0.5X MS, 5% sacarosa, 0.05% Silwett L-77) obteniendo una DO_{600} mayor a 2.0. Las plantas se sumergieron en esta mezcla durante aproximadamente 20 segundos y se envolvieron en bolsas de nylon para que no se evaporara el inóculo. Se dejó toda la noche dentro de las bolsas y posteriormente se transfirieron a condiciones normales de crecimiento. Se realizó un seguimiento de las plantas, realizándose inoculaciones en los botones florales que fueron surgiendo (cada 5 días a partir de la primera inoculación por inmersión). Para estas inoculaciones se pipeteó la suspensión bacteriana detallada anteriormente en cada botón floral en lugar de sumergir la planta (Martinez *et al.*, 2004). Se cosecharon las semillas y se sembraron en medio 0.5X MS pH 5.7, 0.7% agar, suplementado con antibiótico hygromicina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las plantas que sobrevivieron a los 12 días de crecimiento fueron transferidas a maceta y se les cosecharon semillas para la siguiente ronda de selección.

3.20. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.

Para el alineamiento de secuencias y análisis filogenético se realizaron búsquedas en la base de datos Phytozome (www.phytozome.net) de genes ortólogos de *eIF5A1* de soja (*Glyma02g36500*). La secuencia aminoacídica de *eIF5A1* y de sus ortólogos (*Glyma02g36500.4*, *Glyma05g00780*, *Glyma06g21290*, *Glyma17g11130*, *Glyma04g32950.3*, *Glyma02g12520.2*, *Glyma01g06600* en soja y *AT1G13950*, *AT1G69410*, *AT1G26630* en *Arabidopsis*) se alinearon utilizando la base de datos ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; Larkin *et al.*, 2007).

Se construyó un árbol filogenético utilizando el método Neighbor-Joining con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011)

3.21. Identificación de mutantes.

Los mutantes de *A. thaliana* se identificaron en la base de datos <http://arabidopsis.org>.

3.22. Análisis de promotores.

El análisis de promotores se realizó en la base de datos PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>; Higo *et al.*, 1999) y en PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>; Lescot *et al.*, 2002) utilizando 1500 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción del gen *eIF5A1* de soja. Ésta base de datos brinda información sobre elementos reguladores, potenciadores y represores que actúan *in cis* en diferentes plantas.

3.23. Análisis *in silico* de perfiles de expresión.

El análisis de los perfiles de expresión del gen *EIF5A1* en *A. thaliana* se obtuvo a partir de experimentos de microarrays y de secuenciación directa, depositados en la base de datos Genevestigator (<https://www.genevestigator.com>, Hruz *et al.*, 2008).

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 Características de secuencia del gen *eIF5A1*

El gen *eIF5A1* fue identificado en nuestro laboratorio por presentar un perfil de inducción frente a condiciones de estrés hídrico en distintas variedades de soja. La secuencia aminoacídica deducida corresponde a una proteína de 17 KDa, la cual corresponde a un factor de iniciación de la traducción perteneciente a la familia de los 5A. El ortólogo más cercano en *A. thaliana* es *AtelF5A1* con quien comparte un 94% de similitud y un 89% de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos.

Gracias a la disponibilidad de un genoma de soja de referencia, es posible realizar estudios *in silico* de las posibles regiones reguladoras de los genes de interés. Con ese objetivo, se llevó a cabo el análisis de una región de 1500 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción del gen *eIF5A1* de soja. Para ello se utilizó la base de datos PLACE y PlantCare donde se identificaron diversos elementos en *cis* que podrían estar involucrados en la regulación de la expresión génica en respuesta a condiciones de estrés. Durante el déficit hídrico una de las respuestas moleculares al estrés es la modificación de la expresión de genes. Estos cambios en la expresión génica le pueden conferir a la planta la habilidad para responder apropiadamente al estrés y sobrevivir a dicha condición (Moreno, 2009).

Entre las secuencias identificadas, se destacan los elementos ABRE y MYB (Figura 4). El elemento ABRE (ABA-responsive element) responde a las vías de activación dependiente de ABA, en la ruta en la cual no es necesaria la síntesis de nuevas proteínas. Presenta la secuencia PyACGTGGC la cual sería blanco de unión de los factores de transcripción de tipo bZIP (Basic leucine zipper) y cuando a estos elementos de respuesta se unen los factores específicos de tipo bZIP se produce la activación de la transcripción de los mismos. El elemento MYB consiste en la secuencia A/TAACCA y C/TAACG/TG y participa en las vías de activación dependiente de ABA, en la ruta en la cual se requiere la síntesis de nuevas proteínas.

A partir de este análisis podemos decir que el gen *eIF5A1* contiene elementos en *cis* que podrían estar involucrados en la regulación de la expresión génica en respuesta a condiciones de estrés.

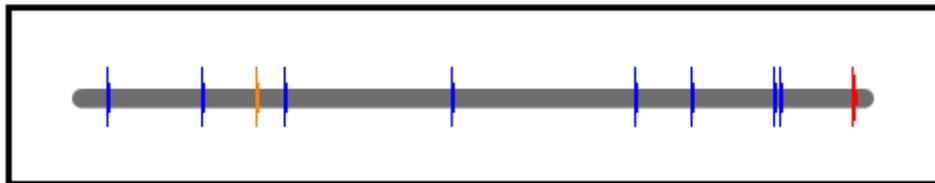


Figura 4. Región de 1500 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción del gen *eIF5A1* de soja. Se observan elementos en *cis* que actúan modificando la expresión de genes. En naranja se observan los elementos ABRE, en azul los elementos MYB y en rojo el codón de inicio de la secuencia nucleotídica.

4.2. Generación de construcciones génicas para la caracterización funcional de *eIF5A1*.

Con el fin de desarrollar los objetivos planteados, se procedió a generar una construcción génica que expresara el gen *eIF5A1* fusionado a GFP y una construcción génica para la expresión constitutiva del gen *eIF5A1* de soja en *A. thaliana*.

La estrategia seguida fue la de extraer ARN de material vegetal de soja, sintetizar ADNc, amplificar la región codificante del gen *eIF5A1* del genoma de soja, clonar dicha secuencia en un vector de entrada (pENTR2B) y posteriormente transferirla a dos tipos de vectores finales de tipo binario (pK7FWG2 y pGWB14 (Figura 5).

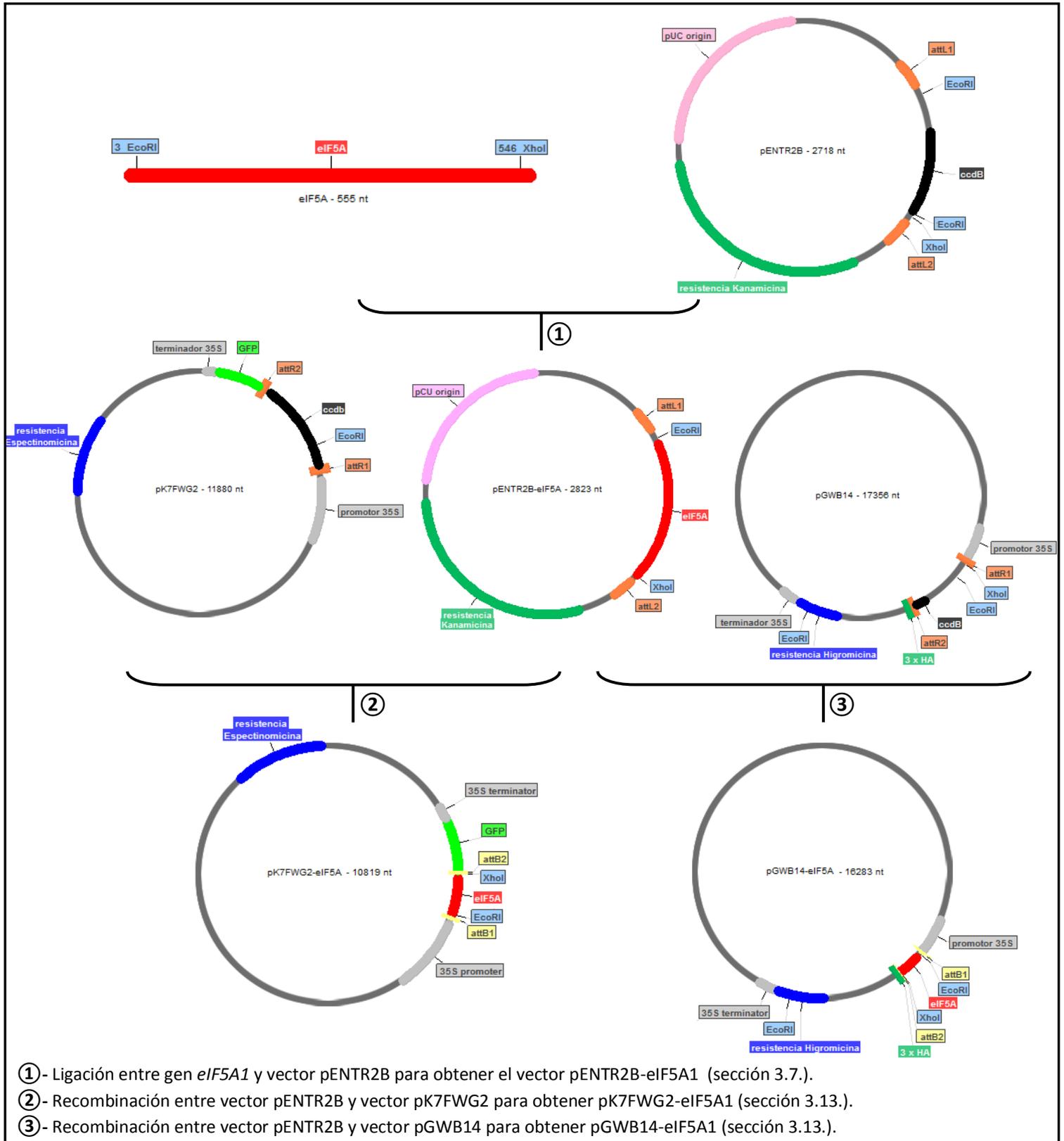


Figura 5. Representación esquemática de obtención de diferentes construcciones génicas. En rojo, el gen *eIF5A1*; en negro, el gen letal *ccdB*; en celeste, los sitios de corte de las enzimas *EcoRI* y *XhoI*; en gris, el promotor y terminador del gen 35S; en naranja, los sitios de recombinación LR; en amarillo, los sitios de recombinación BP. **pENTR2B:** en rosado, se observa el origen de replicación pUC; en verde, el cassette de selección con resistencia a kanamicina. **pK7FWG2:** en verde, la secuencia codificante de la proteína GFP; en azul, el cassette de selección con resistencia a espectinomicina. **pGWB14:** en verde, el epítopo de hemaglutinina (HA); en azul, el cassette de selección con resistencia a higromicina.

4.3. Clonado en el vector de entrada pENTR2B.

La secuencia codificante del gen *eIF5A1* se obtuvo a partir de material vegetal. Conociendo la secuencia de dicho gen se diseñaron cebadores específicos que flanquean la región codificante de la secuencia de ARNm del gen *eIF5A1*, a estos cebadores se le añadieron sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, en este caso se utilizaron las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para el cebador sentido y antisentido, respectivamente. En la figura 6A se muestra la secuencia del gen *eIF5A1*; en azul la secuencia de los cebadores utilizados y subrayado los sitios de corte de las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. En la figura 6B se observa la secuencia aminoacídica de la proteína eIF5A1.



Figura 6. A) Secuencia nucleotídica del gen *eIF5A1*. En rojo se muestra la secuencia del gen *eIF5A1*; en negrita los codones de inicio y terminación; en azul la secuencia de los cebadores utilizados y subrayado los sitios de corte de las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. **B) Secuencia aminoacídica de la proteína eIF5A1.**

Para la selección de dichas enzimas se tuvo en cuenta los sitios de restricción de los plásmidos a utilizar, y que estuvieran ausentes en el gen *eIF5A1*, estas enzimas permitirán posteriormente corroborar la presencia del gen de interés en el plásmido.

Luego de obtener la secuencia codificante de *eIF5A1* y el vector digerido con las enzimas seleccionadas se procedió a la ligación del inserto con el vector, obteniéndose la construcción pENTR2B-eIF5A1 de 2823 pb (Figura 5-1).

Posteriormente se transformaron bacterias *E.coli* electrocompetentes con el plásmido pENTR2B-eIF5A1 mediante electroporación (como se describe en la sección 3.9 de materiales y métodos). A partir de las colonias obtenidas se seleccionaron 8 a las que se les extrajo el ADN plasmídico y se les realizaron ensayos con enzimas de restricción (como se describe en la sección 3.10 y 3.11 de materiales y métodos) para corroborar la presencia del vector con el inserto. Teniendo en cuenta la secuencia del plásmido pENTR2B y del gen *eIF5A1*, se seleccionaron las enzimas *EcoRI* y *XhoI*, las mismas fueron utilizadas con el fin de liberar el inserto. Mediante la digestión con dichas enzimas se esperaba obtener dos fragmentos, uno de 543 pb correspondiente al gen *eIF5A1* y otro de 2280 pb correspondiente al vector pENTR2B. Los productos del ensayo fueron visualizados mediante un gel de agarosa al 1% p/v (Figura 7).

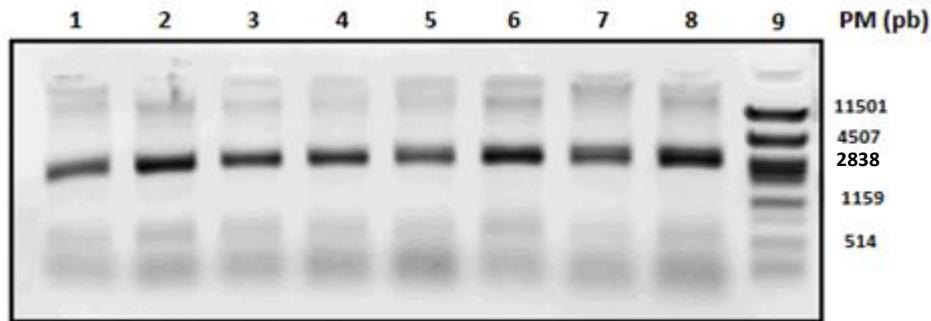


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa. Electroforesis de los productos obtenidos a partir de la digestión del plásmido pENTR2B-eIF5A1 con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. Carril 1-8: ADN plasmídico de las colonias 1-8 digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. Carril 9: marcador de peso molecular λ *PstI*.

Mediante dicho ensayo se logró identificar en las colonias analizadas la presencia del inserto en el vector pENTR2B, ya que las bandas obtenidas se ajustaron al patrón esperado. Para los carriles 1-8 correspondientes al ADN plasmídico digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* se observa una banda de aproximadamente 500 pb, que correspondería al gen *eIF5A1* (555 pb); y una de mayor tamaño, aproximadamente 2800 pb, conteniendo el resto de plásmido linealizado, liberado tras el corte de las enzimas. Si el vector pENTR2B no tuviera el inserto se esperaría observar dos bandas, una de 2280 pb y otra de 423 pb.

4.4. Generación de una construcción génica que exprese el gen *eIF5A1* fusionado con GFP.

Luego de confirmar la presencia del inserto en el vector de entrada pENTR2B se realizó la recombinación del mismo con el vector de destino pK7FWG2 (como se describe en la sección 3.13. de materiales y métodos) (Figura 5-2). Este vector nos permite fusionar la proteína GFP a nuestra proteína de interés y visualizar su localización dentro de la célula. La GFP (*Green Fluorescent Protein*) es una proteína reportera que permite su fácil detección gracias a su capacidad de emitir fluorescencia en la zona del espectro visible. Es una proteína pequeña globular, compacta, y soluble, con una longitud de 238 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 27 kDa, que mantiene sus propiedades bioquímicas cuando está fusionada a otras proteínas. Por lo tanto, manteniendo el marco de lectura es posible fusionar a la GFP la proteína de interés y así obtener una proteína quimérica, la cual nos permitirá visualizar al microscopio su localización intracelular.

Posteriormente a la recombinación se transformaron bacterias *E.coli* electrocompetentes con el plásmido pK7FWG2-eIF5A1 mediante electroporación (como se describe en la sección 3.9 de materiales y métodos). A partir de las colonias obtenidas se seleccionaron 8 a las que se les extrajo el ADN plasmídico y se les realizaron ensayos con enzimas de restricción (como se describe en la sección 3.10 y 3.11 de materiales y métodos) para corroborar la presencia del vector con el inserto. Teniendo en cuenta la secuencia del plásmido pK7FWG2 y del gen *eIF5A1*, se seleccionaron las enzimas *EcoRI* y *XhoI*, las mismas son utilizadas con el fin de liberar el inserto. Mediante la digestión con dichas enzimas se esperaba obtener dos fragmentos, uno de 543 pb correspondiente al gen *eIF5A1* y otro de 10276 pb correspondiente al vector pK7FWG2 (Figura 5-2). Los productos del ensayo fueron visualizados mediante un gel de agarosa al 1% p/v (Figura 8).

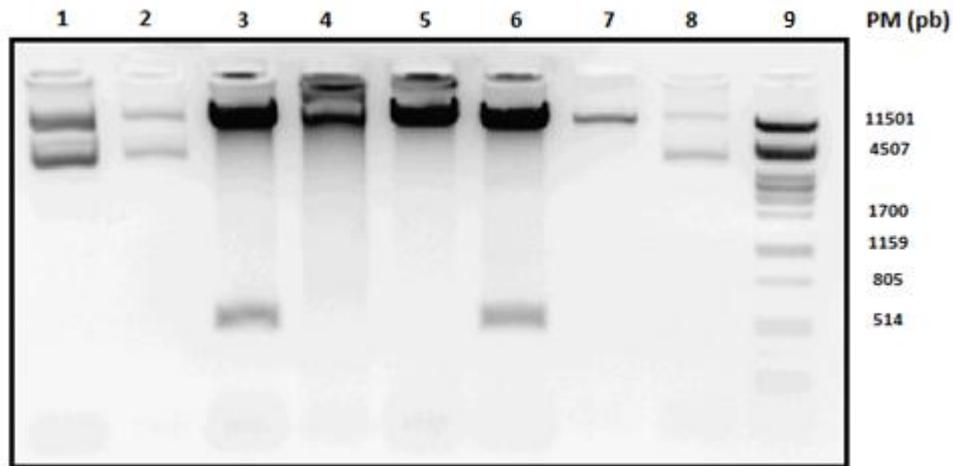


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa. Electroforesis de los productos obtenidos a partir de la digestión del plásmido pK7FWG2-eIF5A1 con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. Carril 1-8: ADN plasmídico de las colonias 1-8 digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. Carril 9: marcador de peso molecular λ *PstI*.

A través de este ensayo se logró identificar en dos de las colonias analizadas la presencia del inserto en el vector pK7FWG2, ya que las bandas obtenidas se ajustaron al patrón esperado. Para los carriles 3 y 6 correspondientes al ADN plasmídico digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* se observa un patrón de bandas que se ajusta al esperado, una banda de aproximadamente 550 pb, que correspondería al gen *eIF5A1* (555 pb); y una de mayor tamaño, aproximadamente 10000 pb, conteniendo el resto de plásmido linealizado, liberado tras el corte de las enzimas. Si el vector pK7FWG2 no tuviera el inserto se esperaría observar una única banda de 11880 pb como se observa en los carriles 4, 5 y 7. En los carriles 1, 2 y 8 se observan las distintas topologías del ADN, el plásmido no incorporó el inserto.

Además se confirmó la presencia del gen *eIF5A1* en el vector pK7FWG2 mediante la secuenciación automática del ADN plasmídico, utilizando el servicio de secuenciación del IP de Montevideo (como se describe en la sección 3.14 de materiales y métodos). Para ello se utilizó un cebador específico que se une a la secuencia de GFP en el vector pK7FWG2. (Figura 9).

pK7FWG2-eIF5A	1	cgccctcgccctcgccggacacgctgaaacttgtggcggtttacgtgcgcgtccagctcga	60
Secuenciación	1	CGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCCAGCTCGA	60
pK7FWG2-eIF5A	61	ccaggatgggcaccaccccggtgaacagctcctcgcccttgctcaccattgatatacca	120
Secuenciación	61	CCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTGATAACCA	120
pK7FWG2-eIF5A	121	ctttgtacaagaaagctgggtctagatatctcgaGTTTTGGGACCGATGTCCTTCAGTG	180
Secuenciación	121	CTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCGAGTTTITGGGACCGATGTCCTTCAGTG	180
pK7FWG2-eIF5A	181	AACAGATCTGTTCTTCTCCATTGCAGACATAACAGAAACCACAAGATCTTTTCCTTCAG	240
Secuenciación	181	AACAGATCTGTTCTTCTCCATTGCAGACATAACAGAAACCACAAGATCTTTTCCTTCAG	240
pK7FWG2-eIF5A	241	AAAAATCCATCTTTAATCTGAGCAAGCAATGCCTCATCAGTAGGAAGCTTCAGATCATCCT	300
Secuenciación	241	AAAAATCCATCTTTAATCTGAGCAAGCAATGCCTCATCAGTAGGAAGCTTCAGATCATCCT	300
pK7FWG2-eIF5A	301	TGGTATTTCCATTATCAGTCAACAGACTCACAAAGCCGTCTTCAGAGATATCAATAAGCT	360
Secuenciación	301	TGGTATTTCCATTATCAGTCAACAGACTCACAAAGCCGTCTTCAGAGATATCAATAAGCT	360
pK7FWG2-eIF5A	361	GATAGTCAGTCCGATTCAATGTTGGAACATCACAGTTGTGGGATGATGGAACAATATCTT	420
Secuenciación	361	GATAGTCAGTCCGATTCAATGTTGGAACATCACAGTTGTGGGATGATGGAACAATATCTT	420
pK7FWG2-eIF5A	421	CAAGCTTTTCCCAATTAATAATCAATTGCAACAAAGTGACACTTTGCATGTCCATGCT	480
Secuenciación	421	CAAGCTTTTCCCAATTAATAATCAATTGCAACAAAGTGACACTTTGCATGTCCATGCT	480
pK7FWG2-eIF5A	481	TGCCTGTCTTTGACGTAGAGACCTCTACAACCTTGCAAGGCC	522
Secuenciación	481	TGCCTGTCTTTGACGTAGAGACCTCTACAACCTTGCAAGGCC	522

Figura 9. Secuenciación automática de la construcción pK7FWG2-eIF5A1. Alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación con la secuencia del vector pK7FWG2-eIF5A1. En verde se observa parte de la secuencia del gen de *GFP*, en amarillo el sitio attB2, en rosa el sitio de restricción de *XhoI* y en rojo parte de la secuencia del gen *eIF5A1*. (Alineamiento realizado con el programa Serial Cloner).

Mediante la secuenciación del inserto se comprobó que el gen *eIF5A1* no contenía mutaciones, y que se encontrara en fase con la secuencia de la proteína GFP.

Una vez obtenida la construcción deseada y confirmada por secuenciación, se guardó un stock de las bacterias recombinantes en glicerol 30% a -80°C para ser utilizado en ensayos posteriores, y se procedió a la transformación de bacterias de *A. tumefaciens* electrocompetentes (como se describe en la sección 3.15 de materiales y métodos). Para confirmar la presencia del plásmido en la bacteria *A. tumefaciens* se realizó una reacción de PCR (como se describe en la sección 3.16 de materiales y métodos). Para ello se utilizaron cebadores que flanquean el inserto. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% p/v (Figura 10).

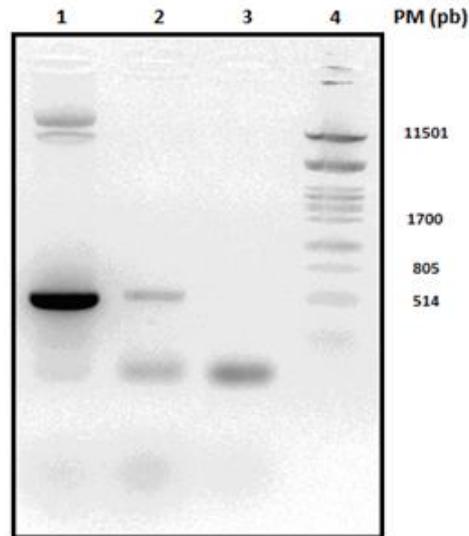


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa. Electroforesis de ADN de colonias de *A. tumefaciens*. Carril 1: Control positivo (ADN plasmídico del vector pK7FWG2-eIF5A1); Carril 2: Producto de amplificación por PCR de colonia de *A. tumefaciens*; Carril 3: Control negativo (sin ADN); Carril 4: marcador de peso molecular λ PstI.

En el carril 2 se observa un fragmento con un tamaño aproximado de 500 pb, el mismo se corresponde con el tamaño esperado para el producto de amplificación del gen *eIF5A1*, 550 pb. En el carril 1 y como control positivo se utilizó ADN plasmídico, en dicho carril se observa un fragmento de aproximadamente 500 pb que corresponde con lo esperado. En el carril 3, el control negativo (sin ADN) confirmó que las bandas obtenidas en las otras dos reacciones son específicas y que no existe contaminación. Este ensayo permitió corroborar que la transformación de *A. tumefaciens* fue exitosa y que la misma contiene el plásmido pK7FWG2-eIF5A1.

Luego de confirmar la presencia del plásmido pK7FWG2-eIF5A1 en *A. tumefaciens* se procedió al análisis de la localización subcelular de la proteína de fusión eIF5A1-GFP mediante ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración de hojas de tabaco (como se describe en la sección 3.17. de materiales y métodos) (Figura 11).



Figura 11. Agroinfiltración de hojas de tabaco. (Fotos por: Cecilia Ruibal)

Para la observación de la fluorescencia de las regiones agroinfiltradas se utilizó el servicio del microscopía confocal de la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo (Figura 12 y 13).

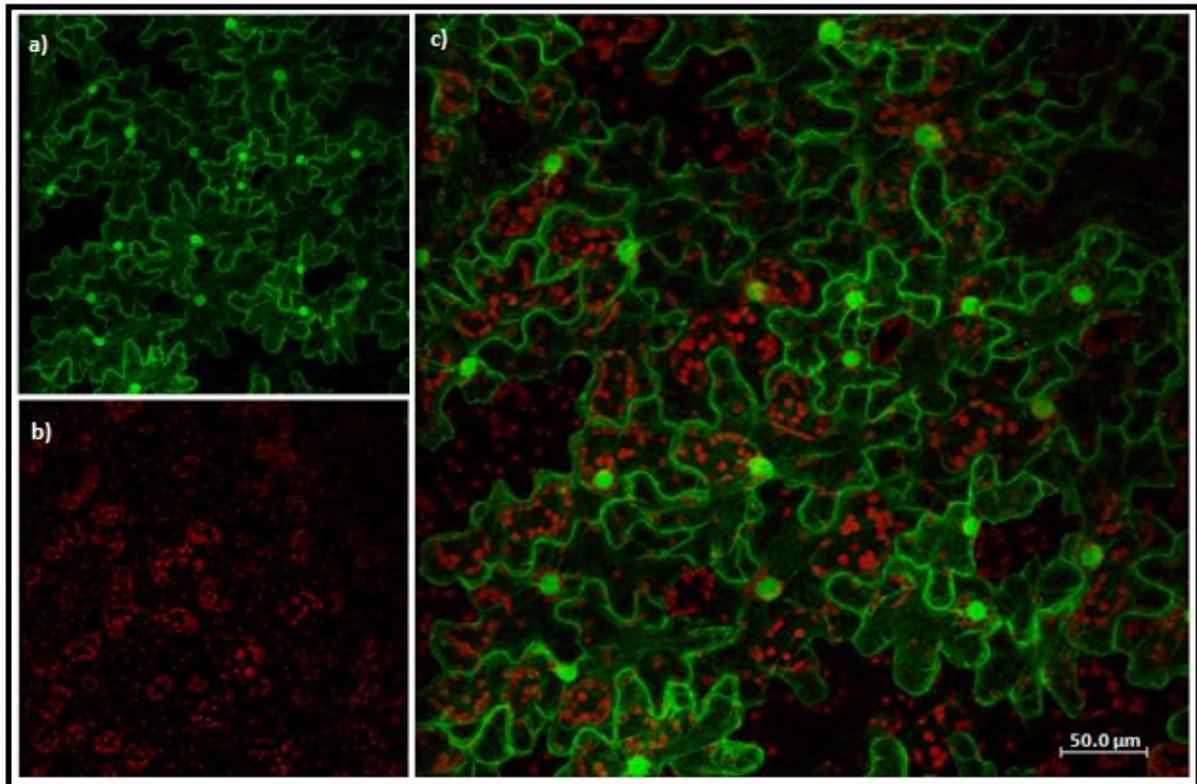


Figura 12. Visualización de eIF5A1-GFP. Expresión transitoria de la proteína eIF5A fusionada a GFP en hojas de tabaco transformadas mediante agroinfiltración. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. (a) eIF5A1-GFP; (b) autofluorescencia de cloroplastos; (c) combinación de a) y b). Escala 1.7X.

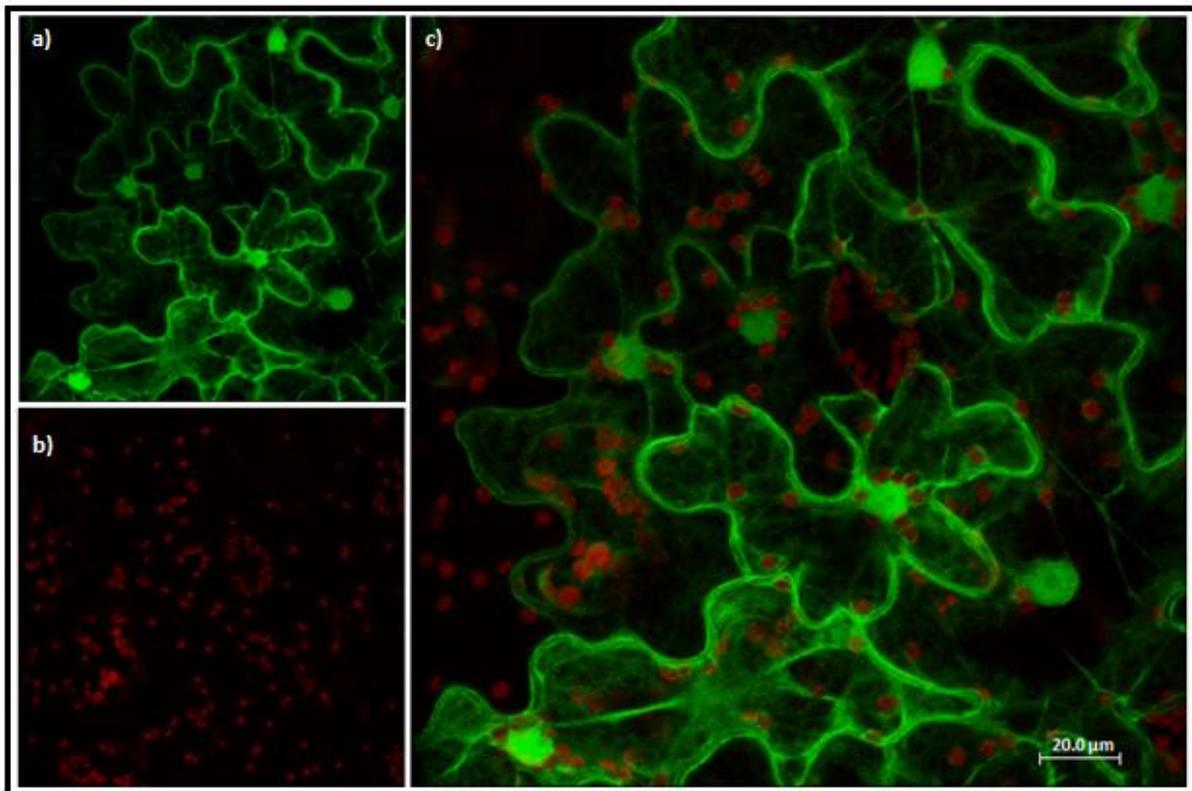


Figura 13. Visualización de eIF5A1-GFP. Expresión transitoria de la proteína eIF5A1 fusionada a GFP en hojas de tabaco transformadas mediante agroinfiltración. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. (a) eIF5A1-GFP; (b) autofluorescencia de cloroplastos; (c) combinación de a) y b). Escala 4X.

Los resultados de estos experimentos sugieren que la proteína eIF5A1 tiene una localización citoplasmática. Si bien se observa señal de GFP en el núcleo no se puede asegurar que su localización es nuclear debido a que es común que las proteínas de fusión con GFP sufran el clivado del dominio GFP el cual tiene tendencia a acumularse en el núcleo.

4.5. Generación de una construcción génica para la expresión constitutiva del gen *eIF5A1* de soja en *Arabidopsis thaliana*.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la expresión heteróloga de este gen de soja en la tolerancia al estrés se realizó una construcción génica en el vector binario pGWB14. Este vector será luego utilizado para generar plantas de *A. thaliana* transgénicas con expresión constitutiva de *eIF5A1*.

La planta modelo *A. thaliana* ha sido el blanco para el estudio de respuestas moleculares a la sequía en plantas superiores. Esta planta es una angiosperma que posee un ciclo de vida corto (6-8 semanas), fecundación autógama, produce numerosas semillas, su rápido crecimiento permite el análisis de un gran número de individuos en un mínimo espacio, se encuentra disponible la secuencia completa de su genoma y éste tiene relativamente escasas secuencias repetidas. La utilización de esta especie como modelo ha facilitado significativamente la unificación de criterios para la evaluación fenotípica de las respuestas al estrés hídrico así como la interpretación de los resultados. Los análisis de expresión génica global en esta y otras plantas, han permitido la identificación de genes cuya expresión se induce en condiciones de sequía.

Luego de confirmar la presencia del inserto en el vector de entrada pENTR2B se realizó la recombinación del mismo con el vector de destino pGWB14 (como se describe en la sección 3.13. de materiales y métodos) (Figura 5-3). Este vector contiene el epítotope compuesto por tres hemaglutininas, cada una de ellas compuesta por nueve aminoácidos. Es un epítotope relativamente pequeño que no afecta las propiedades bioquímicas de la proteína de interés ni su distribución. Este epítotope nos permitirá posteriormente, utilizar anticuerpos comerciales monoclonales específicos para detectar y purificar la proteína para diversos estudios bioquímicos *in vitro* como evaluar la acumulación de la proteína por Western blot, inmunohistoquímica, o llevar a cabo ensayos para identificar proteínas que interactúen con nuestra proteína.

Posteriormente a la recombinación se transformaron bacterias *E. coli* electrocompetentes con el plásmido pGWB14-eIF5A1 mediante electroporación (como se describe en la sección 3.9 de materiales y métodos), de las colonias obtenidas se seleccionaron 8 a las que se les extrajo el ADN plasmídico y se les realizaron ensayos con enzimas de restricción (como se describe en la sección 3.10. y 3.11. de materiales y métodos) para corroborar la presencia del vector con el inserto. Teniendo en cuenta la secuencia del plásmido pGWB14 y del gen *eIF5A1*, se seleccionaron las enzimas *EcoRI* y *XhoI*, las mismas son utilizadas con el fin de liberar el inserto. Mediante la digestión con dichas enzimas se esperaba obtener 3 fragmentos, uno de 543 pb correspondiente al gen *eIF5A1*, otro de 2368 pb y 13372 pb correspondientes al vector pGWB14 (Figura 5-3). Los productos del ensayo fueron visualizados mediante un gel de agarosa al 1% p/v (Figura 14).

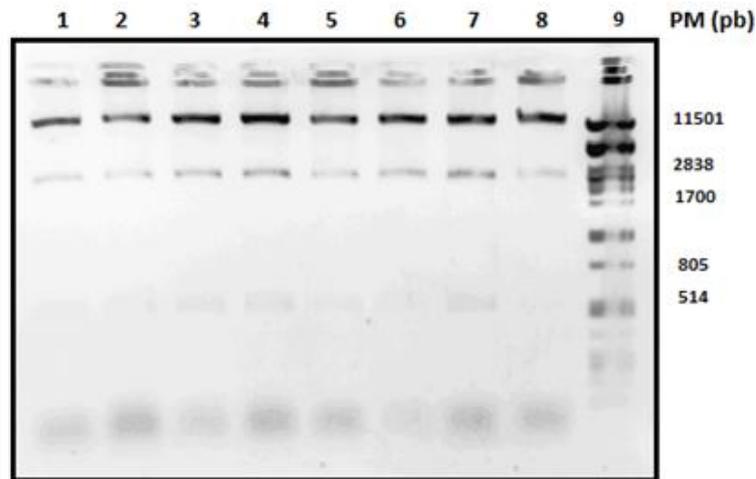


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa. Electroforesis de los productos obtenidos a partir de la digestión del plásmido pGWB14-*eIF5A1* con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. Carril 1-8: ADN plasmídico de las colonias 1-8 digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. Carril 9: marcador de peso molecular λ *PstI*.

A través de este ensayo se logró identificar en las colonias analizadas la presencia del inserto en el vector pGWB14, ya que las bandas obtenidas se ajustaron al patrón esperado. Para los carriles 1 a 8 correspondientes al ADN plasmídico digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* se observa un patrón de bandas que se ajusta al esperado, una banda de aproximadamente 550 pb, que correspondería al gen *eIF5A1* (555 pb); otra banda de un tamaño mayor a 11501 pb y una de un tamaño menor a 2838 pb conteniendo las mismas el resto de plásmido linealizado, liberado tras el corte de las enzimas. Si el vector pGWB14 no tuviera el inserto se esperaría observar tres bandas con un tamaño de 13442 bp, 3588 pb y 326 pb.

Además se confirmó la presencia del gen *eIF5A1* en el vector pGWB14 mediante la secuenciación automática del ADN plasmídico, utilizando el servicio de secuenciación del IP de Montevideo (como se describe en la sección 3.14 de materiales y métodos). (Figura 15).

pGWB14-eIF5A	1	GACGTATCCTCAGCAGGCTGGTACCATTGC	60
Secuenciación	1		60
pGWB14-eIF5A	61	GCCTTGCAAGGTTGTAGAGGTTCTACGTC	120
Secuenciación	61	GCCTTGCAAGGTTGTAGAGGTTCTACGTC	120
pGWB14-eIF5A	121	TCACTTTGTGCAATTGATATTTTAAATGG	180
Secuenciación	121	TCACTTTGTGCAATTGATATTTTAAATGG	180
pGWB14-eIF5A	181	CCACAACGTGATGTTCCACATGTGAATCG	240
Secuenciación	181	CCACAACGTGATGTTCCACATGTGAATCG	240
pGWB14-eIF5A	241	AGACGGCTTTGTGAGTCTGTTGACTGAT	300
Secuenciación	241	AGACGGCTTTGTGAGTCTGTTGACTGAT	300
pGWB14-eIF5A	301	TACTGATGAGGCATTGCTTGCTCAGATT	360
Secuenciación	301	TACTGATGAGGCATTGCTTGCTCAGATT	360
pGWB14-eIF5A	361	GGTTTCTGTTATGTCTGCAATGGGAGAA	420
Secuenciación	361	GGTTTCTGTTATGTCTGCAATGGGAGAA	420
pGWB14-eIF5A	421	CAAAAACtgcagatatctagaccagcttct	480
Secuenciación	421	CAAAAACtgcagatatctagaccagcttct	480
pGWB14-eIF5A	481	AATTAACTCTTTTACCCATACGATGTTCT	540
Secuenciación	481	AATTAACTCTTTTACCCATACGATGTTCT	540
pGWB14-eIF5A	541	GGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACG	574
Secuenciación	541	GGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACG	574

Figura 15. Secuenciación automática de la construcción pGWB14-eIF5A. Alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación con la secuencia del vector pGWB14-eIF5A. En rojo parte de la secuencia del gen *eIF5A*, en rosa el sitio de restricción de *XhoI*, en amarillo se observa la secuencia attB2 y en verde parte de la secuencia del epítipo de hemaglutinina. (Alineamiento realizado con el programa Serial Cloner).

Mediante la secuenciación del plásmido resultante, utilizando los cebadores específicos que se unen a secuencias que flanquean el inserto, se comprobó que el gen *eIF5A1* no contenga mutaciones y que se encontrara en fase con el epítipo de hemaglutininas.

Una vez obtenida la construcción deseada y confirmada por secuenciación, se guardó un stock de las bacterias recombinantes en glicerol 30% a -80°C para ser utilizado en ensayos posteriores, y se procedió a la transformación de bacterias de *A. tumefaciens* electrocompetentes (como se describe en la sección 3.15. de materiales y métodos). Para confirmar la presencia del plásmido en la bacteria *A. tumefaciens* se realizó una reacción de PCR (como se describe en la sección 3.16. de materiales y métodos). Para ello se utilizaron los cebadores que reconocen las secuencias que flanquean del inserto. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% p/v (Figura 16).

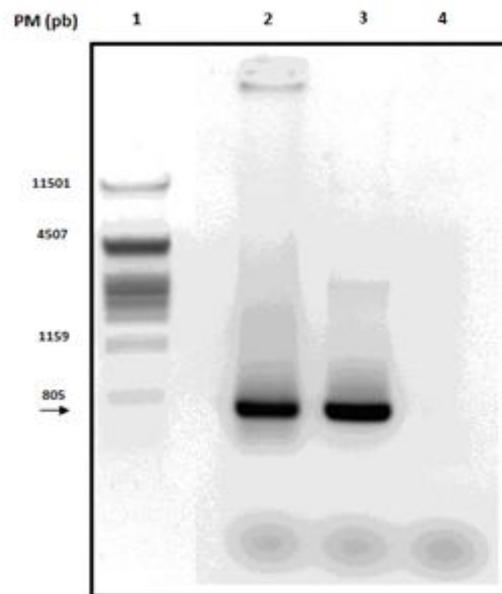


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa. Electroforesis de ADN de colonias de *A. tumefaciens*. Carril 1: marcador de peso molecular λ *Pst*I; Carril 2: Control positivo (ADN plasmídico del vector pGWB14-eIF5A); Carril 3: Producto de amplificación por PCR de colonia de *A. tumefaciens*; Carril 4: Control negativo (sin ADN);

En el carril 2 se observa un fragmento con un tamaño aproximado de 500 pb, el cual se corresponde con el tamaño esperado para el producto de amplificación del gen *eIF5A1*. En el carril 1 y como control positivo se utilizó ADN plasmídico del vector pGWB14-eIF5A1. En el carril 3, el control negativo (sin ADN) confirmó que las bandas obtenidas en las otras dos reacciones son específicas y que no existe contaminación. Este ensayo permitió corroborar que la transformación de *A. tumefaciens* fue exitosa y que la misma contiene el plásmido pGWB14-eIF5A1.

Luego de confirmar la presencia del plásmido pGWB14-eIF5A1 en *A. tumefaciens* se procedió a la transformación de *A. thaliana* mediada por *A. tumefaciens* por infiltración de flores (como se describe en la sección 3.19. de materiales y métodos).

Plantas de *A. thaliana* se crecieron *in vitro* y cuando tuvieron el tamaño adecuado, aproximadamente 6-8 días luego de la germinación de las semillas, se pasaron a tierra, se sembraron en 5 macetas conteniendo 5 plantas cada una de ellas. Se cortaron las inflorescencias primarias y cuando se llegó al estado en que las plantas presentaron una mayoría de botones florales, se procedió a la transformación por inmersión floral. Las plantas se sumergieron en un buffer conteniendo la cepa de *A. tumefaciens* con la construcción pGWB14-eIF5A1 durante aproximadamente 20 segundos y se envolvieron en bolsas de nylon para que no se evaporara el inóculo. Se dejó toda la noche dentro de las bolsas y posteriormente se transfirieron a condiciones normales de crecimiento. Se realizó un seguimiento de las plantas, realizándose inoculaciones en los botones florales que fueron surgiendo pipeteando la suspensión bacteriana en cada botón floral. Dicho procedimiento se realizó cada cinco días a partir de la primera inoculación por inmersión. Posteriormente se cosecharon las semillas de la generación T0 como se ilustra en la figura 17. Las semillas correspondientes a la generación T0 se sembraron en un medio suplementado con el antibiótico correspondiente. Las plantas que sobrevivieron a los 12 días de crecimiento y que presentaron un aspecto normal, frente a las plantas afectadas por la presencia del antibiótico, se consideran transformantes y fueron transferidas a tierra. Actualmente se están creciendo las plantas correspondientes a la generación T1.



Figura 17. Transformación de *A. thaliana*. a) Plantas de *A. thaliana* de 22 días en tierra; b) plantas de 26 días a las que se le cortaron las inflorescencias primarias; c) plantas con botones florales; d) y e) inmersión floral; f) inoculación en los botones florales; g) plantas en bolsas de nylon; h) cosecha de semillas.

Los resultados de los estudios fenotípicos de estas plantas se van a comparar con el genotipo silvestre de *A. thaliana*, así como con líneas de *A. thaliana* que contienen mutaciones nulas por inserción de T-DNA en genes ortólogos. Por esta razón se realiza el alineamiento y el análisis de la distancia filogenética de *eIF5A1* con los de *A. thaliana*; y la disponibilidad de mutantes de este gen.

4.6. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.

Se realizaron búsquedas en la base de datos Phytozome de genes ortólogos de *eIF5A1* de soja. En el genoma de soja existen siete genes con diferente grado de similitud de secuencia con *eIF5A1* (*Glyma02g36500.4*, *Glyma05g00780*, *Glyma06g21290*, *Glyma17g11130*, *Glyma04g32950.3*, *Glyma02g12520.2*, *Glyma01g06600*), mientras que en *A. thaliana* existen tres genes ortólogos *AtelF5A-1*, *AtelF5A-2* y *AtelF5A-3* (*AT1G13950*, *AT1G26630*, *AT1G69410*, respectivamente) siendo el gen *AtelF5A-1* altamente homólogo a *eIF5A1* de soja con una identidad del 89% y una similitud del 94 % a nivel de secuencia de aminoácidos. En la figura 18 se observa el alineamiento con dichas secuencias.

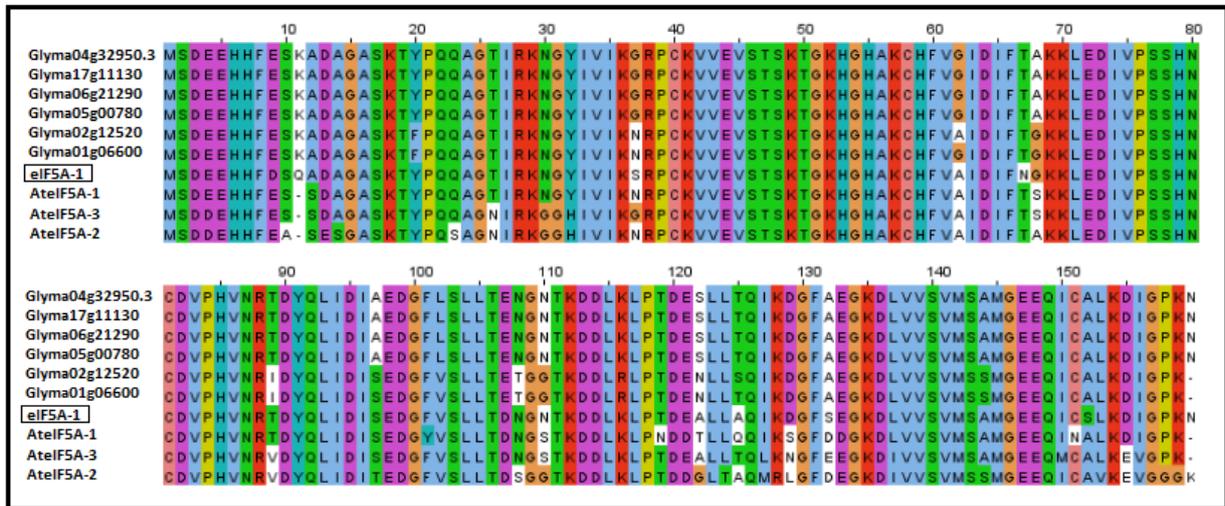


Figura 18. Alineamiento de secuencias. Se observa el alineamiento de la secuencias *eIF5A1*, *Glyma02g36500.4*, *Glyma05g00780*, *Glyma06g21290*, *Glyma17g11130*, *Glyma04g32950.3*, *Glyma02g12520.2*, *Glyma01g06600*, *AtelF5A-1*, *AtelF5A-2* y *AtelF5A-3*. En el recuadro se observa el gen *eIF5A-1* (*Glyma02g36500*).

Se construyó un árbol filogenético utilizando el método Neighbor-Joining con el programa MEGA5. El mismo muestra que *eIF5A1* de soja es más parecido *AtelF5A-1* de *A. thaliana* y tiene una distancia evolutiva más lejana a los demás genes de soja (Figura 19).

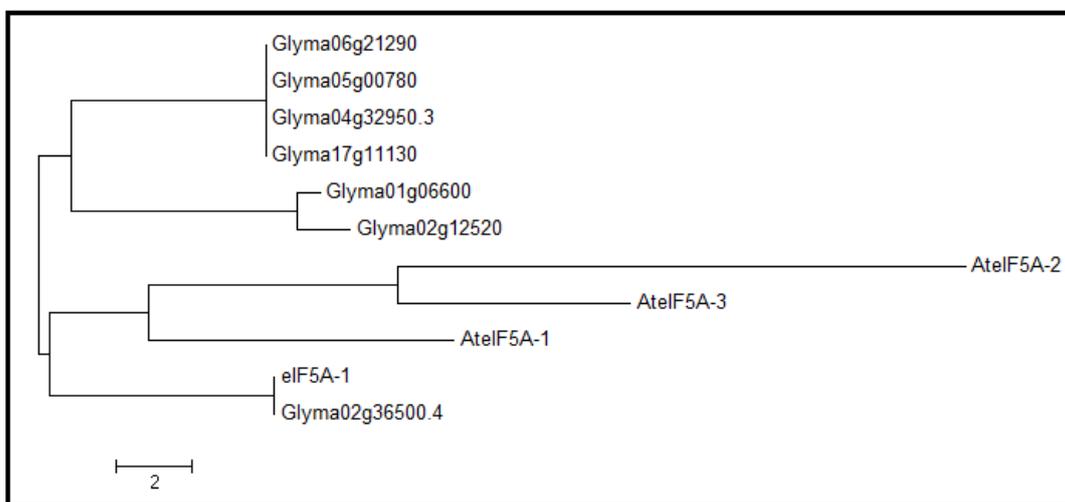


Figura 19. Árbol filogenético. Se observan las distancias evolutivas de los genes *eIF5A1*, *Glyma02g36500.4*, *Glyma05g00780*, *Glyma06g21290*, *Glyma17g11130*, *Glyma04g32950.3*, *Glyma02g12520.2*, *Glyma01g06600*, *AtelF5A-1*, *AtelF5A-2* y *AtelF5A-3*. En el recuadro se observa el gen *eIF5A1* (*Glyma02g36500*).

4.7. Identificación de mutantes en genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana*.

Como se mencionó anteriormente el gen *AteIF5A-1* de *A. thaliana* presenta una alta similitud de secuencia con el gen *eIF5A1* de soja que estudiamos. Es por eso que se identificaron mutantes de este gen de *A. thaliana* con el fin de realizar su análisis fenotípico junto con el de las líneas transgénicas obtenidas en este trabajo.

En la base de datos TAIR se identificaron dos mutantes por inserción de T-DNA en el gen *eIF5A1* de *A. thaliana* el cual se adquirirá y obtendrán semillas para su caracterización (Tabla 4). Las líneas transgénicas del gen *eIF5A1* de soja, junto con los mutantes de T-DNA de *A. thaliana* constituyen el material de partida para el análisis fenotípico del gen *eIF5A1*.

Tabla 4. Mutantes de *A. thaliana*.

Nombre	Tipo de inserción	Lugar de inserción
SAIL_869_A03	T-DNA	Promotor
SALK_019584	T-DNA	Promotor

4.8. Análisis *in silico* de perfiles de expresión.

El análisis *in silico* de los perfiles de expresión de los genes *AteIF5A-1*, *AteIF5A-2* y *AteIF5A-3* de *A. thaliana* se obtuvo a partir de experimentos de microarrays y de secuenciación directa, depositados en la base de datos Genevestigator (<https://www.genevestigator.com>).

Genevestigator es una aplicación desarrollada por biólogos y médicos investigadores que permite conocer en que tejidos, etapas del desarrollo, estímulos, tratamiento con drogas o modificaciones genéticas se activan determinados genes en distintos organismos. Los resultados se procesan a partir de una gran base de datos curada de forma manual y de calidad controlada, donde microarrays son hibridados con ARN de muestras extraídas de una gran variedad de tejidos y condiciones. Actualmente, se dispone de datos para *A. thaliana*, *Physcomitrella*, soja, cebada, arroz, trigo, humanos, ratón y rata.

Dichos análisis permitieron determinar en qué etapa del desarrollo se encuentran activados dichos genes. De esta manera se pudo establecer que la expresión del gen *AteIF5A-1* se mantiene constante durante todas las etapas del desarrollo; el gen *AteIF5A-2* alcanza su nivel más alto de expresión en la etapa de semilla germinada y su nivel más bajo en la etapa de chaucha madura; el gen *AteIF5A-3* mantiene su expresión constante durante casi todas las etapas del desarrollo, aumentando su expresión en la senescencia (Figura 20).

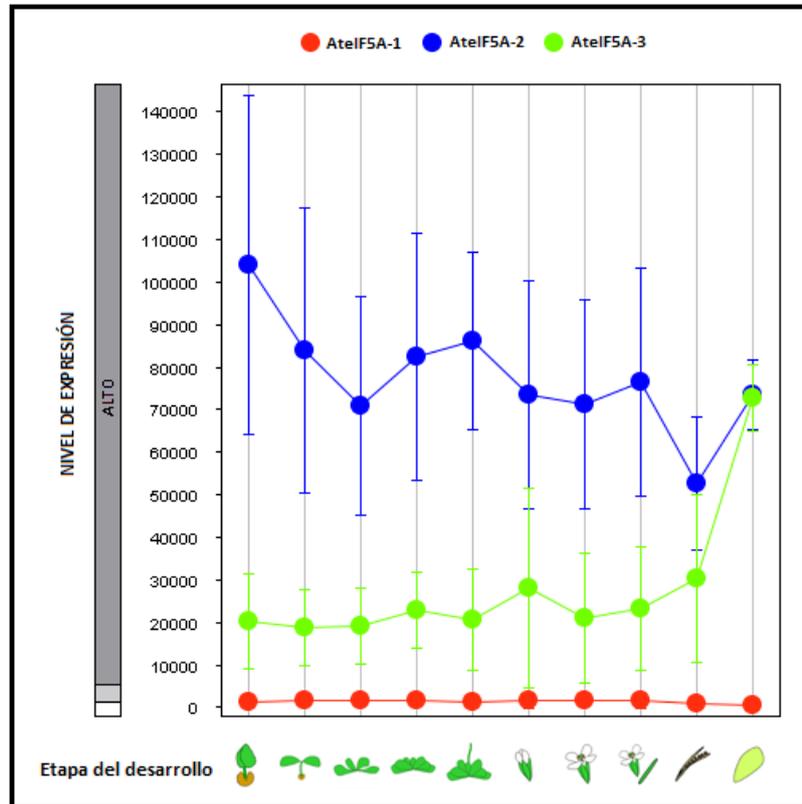


Figura 20. Niveles de expresión de los genes *AtelF5A-1*, *AtelF5A-2* y *AtelF5A-3* de *A. thaliana*. Se observan los distintos niveles de expresión de los genes *eIF5A* en las distintas etapas del desarrollo: semilla germinada, planta de semillero, roseta pequeña, roseta desarrollada, primeras inflorescencias, flor pequeña, flor desarrollada, flores y chauchas, chauchas maduras y senescencia. (Genevestigator)

Por otro lado, el análisis de perfiles de expresión muestra una clara inducción de los genes *AtelF5A-1* y *AtelF5A-2* en condiciones de germinación (estratificación y desecación de semillas), y se observa diferentes niveles de inducción de los tres genes tanto en condiciones de hipoxia, sequía, calor, deshidratación y estrés salino (Figura 21 y Tabla 5).

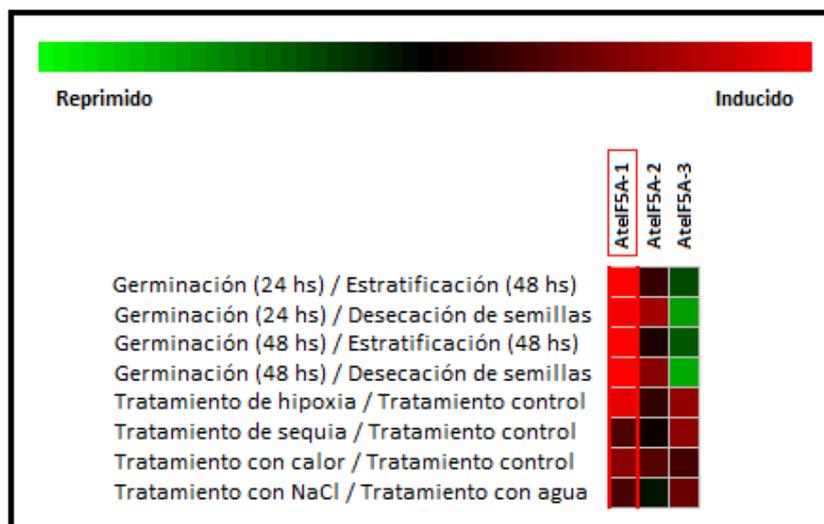


Figura 21. Inducción de los genes *AtelF5A-1*, *AtelF5A-2* y *AtelF5A-3* de *A. thaliana*. Se observan los distintos niveles de inducción de los genes *eIF5A* en distintas condiciones: deshidratación, de calor, de estrés salino, hipoxia, germinación (estratificación y desecación de semillas (color verde indica represión del gen y el rojo indica inducción del gen). (Genevestigator)

Tabla 4. Descripción de tratamientos utilizados para la figura 21. (Geneinvestigator)

Tratamiento	Descripción Tratado / Control
Germinación (24 hs) / Estratificación (48 hs)	Se cosecharon semillas, se desecaron 15 días en oscuridad, se esterilizaron y sembraron en medio MS, se dejaron estratificar a 4 °C en oscuridad por 48h y se dejaron crecer a 22 °C por 24h / Se cosecharon semillas, se desecaron 15 días en oscuridad, se esterilizaron y sembraron en medio MS, se dejaron estratificar a 4 °C en oscuridad por 48h.
Germinación (24 hs) / Desecación de semillas	Se cosecharon semillas, se desecaron 15 días en oscuridad, se esterilizaron y sembraron en medio MS, se dejaron estratificar a 4 °C en oscuridad por 48h y se dejaron crecer a 22 °C por 24h / Se cosecharon semillas y se desecaron 15 días en oscuridad.
Germinación (48 hs) / Estratificación (48 hs)	Se cosecharon semillas, se desecaron 15 días en oscuridad, se esterilizaron y sembraron en medio MS, se dejaron estratificar a 4 °C en oscuridad por 48h y se dejaron crecer a 22 °C por 48h / Se cosecharon semillas, se desecaron 15 días en oscuridad, se esterilizaron y sembraron en medio MS, se dejaron estratificar a 4 °C en oscuridad por 48h.
Germinación (48 hs) / Desecación de semillas	Se cosecharon semillas, se desecaron 15 días en oscuridad, se esterilizaron y sembraron en medio MS, se dejaron estratificar a 4 °C en oscuridad por 48h y se dejaron crecer a 22 °C por 48h / Se cosecharon semillas y se desecaron 15 días en oscuridad.
Tratamiento de sequía / Tratamiento control	Plantas de semillero crecidas durante 7 días en medio MS ½ se pasaron a un medio conteniendo PEG por 4 días / Plantas de semillero crecidas durante 7 días en medio MS ½ se pasaron al mismo medio por 4 días.
Tratamiento de hipoxia / Tratamiento control	Plantas se colocaron en cámaras baja en oxígeno durante 4 hs en oscuridad / Plantas sin tratamiento.
Tratamiento con calor / Tratamiento control	Plantas crecidas a 22 °C por 3 semanas se expusieron a 37 °C por 30 hs / Plantas crecidas a 22 °C por 3 se crecieron a la misma temperatura por 30h
Tratamiento con NaCl / Tratamiento con agua	Hojas de rosetas tratadas con 250 mM de NaCl por 24h / Hojas de rosetas tratadas con agua por 24h.

Estos datos sugieren que el ortólogo *AteIF5A1* de *A. thaliana* podría tener una regulación similar a *eIF5A1* de soja de acuerdo a su perfil de expresión. Es por eso que resulta relevante comparar las líneas transgénicas obtenidas en este trabajo con los mutantes de *A. thaliana*.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que se cumplió con los objetivos planteados, se generaron herramientas para determinar la localización subcelular del producto del gen *eIF5A1* mediante ensayos de expresión transitoria en plantas, así como para evaluar el efecto de la expresión heteróloga del gen *eIF5A1* de soja en *A. thaliana*.

En primer lugar se obtuvo una construcción génica que expresa el gen *eIF5A1* fusionado con GFP, bajo el control de un promotor constitutivo. Se determinó la localización subcelular del producto de este gen mediante ensayos de expresión transitoria en plantas de tabaco.

Por último, para la sobreexpresión de *eIF5A1* en *A. thaliana* se obtuvo una construcción génica para la expresión constitutiva del gen *eIF5A1* de soja en *A. thaliana*.

Dentro de las perspectivas planteadas se tiene como primer objetivo a largo plazo continuar con el análisis fenotípico de la línea resultante en condiciones normales y en estrés.

Las plantas de *A. thaliana* transgénicas y las líneas mutantes en un gen ortólogo de *A. thaliana* serán evaluadas tanto *in vitro* como en tierra en diversas condiciones de crecimiento y estrés.

La caracterización funcional de genes involucrados en la resistencia a sequía en el cultivo de soja permitirá avanzar más rápidamente en el desarrollo de genotipos con mayor estabilidad de rendimientos en condiciones de déficit hídrico. Algunas de las posibles aplicaciones de este estudio incluyen el desarrollo de un marcador funcional para seleccionar plantas con mayor grado de tolerancia al estrés, su transferencia directa a otros genotipos de soja por mejoramiento convencional o por transgénesis, así como la utilización de este tipo de genes en otras especies vegetales. En suma, se espera que estos estudios contribuyan a desarrollar herramientas para la utilización de genes asociados a la tolerancia a sequía en el mejoramiento convencional o molecular de la resistencia a la sequía en soja y otras plantas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Abdel-Haleem H, Lee G y Boerma R (2011). "Identification of QTL for increased fibrous roots in soybean". Theor. Appl. Genet. **122**(5):925-946.

Marintchev A and Wagner G (2004). "Translation initiation: structures, mechanisms and evolution". Quarterly Reviews of Biophysics **37** (3/4): 197–284.

Baena-González (2010). "Energy signaling in the regulation of gene expression during stress". Mol Plant. **3**:300-13

Bartels D (2001). "Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance". Trends in Plant Science **7**:284–286.

Bartels D and Nelson D (1994) "Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics". Plant, Cell and Environment **17**: 659–667.

Bennet J, Sinclair T, Muchow R, Costello S (1987). "Dependence of stomatal conductance on leaf water potential, turgor potential, and relative water content in field-grown soybean and maize. Crop Sci. **27**:784-990.

Bray E (1997). "Plant responses to water deficit". Trends Plant Sci. **2**:48-54

Bray E (2002). "Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome". Plant Cell Environ **25**:153-161.

Bray E (1993). "Molecular responses to water deficit". Plant Physiol. **103**:1035-1040.

Brown E, Caviness C, Brown D (1985). "Response of selected soybean cultivars to soil moisture deficit". Agronomy Journal **77**:274-278.

Busk P, Jensen A and Pages M (1997). "Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize". Plant J. **11**:1285-1295.

Carrow R (1996). "Drought avoidance characteristics of diverse tall freescure cultivars". Crop Sci. **36**:371-377.

Chandler P and Robertson M (1994). "Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance". Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **45**:113-141.

Chatterjee I, Gross S, Kinzy T, Chen K (2006). "Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression". Molecular genetics and genomics **275**(3):264–276.

Cheng W-H, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen H-C, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T and Sheen J (2002). "A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signalling and abscisic acid biosynthesis and functions". Plant Cell **14**:2723-2743.

Chou W, Huang Y, Tsay W, Chiang T, Huang D, Huang H (2004). "Expression of genes encoding the rice translation initiation factor, eIF5A, is involved in developmental and environmental responses". Physiol Plant **121**(1):50–57.

- Clement P, Johansson H, Wolff E, Park M (2006). "Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells". FEBS J **273**(6):1102–1114.
- Clough S and Bent A (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana." Plant J. **16**(6):735-43.
- Cushman J. (2001). "Osmoregulation in plants: implications for agriculture". Amer. Zool. **41**:758-769.
- Cutler A and Krochko J (1999). "Formation and breakdown of ABA". Trends Plant Sci **4**:472–478.
- Danon, A., K. Apel y C. Laloi. (2004). "Reactive oxygen signalling: the latest news". Curr. Opin. Plant Biol. **7**:323-328.
- Davies W and Zhang J (1991). "Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil". Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **42**:55-76
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985). "Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants". Nucl. Acids Res. **13**: 4777-4788.
- Delouche J (1980). "Environmental effects on seed development and seed quality". HortScience. **15**: 775-779.
- Diatchenko L, Lau Y, Campbell C, Chenchik AP, Moqadam A, Huang F, Lukyanov B, Lukyanov L, Gurskaya K, Sverdlov ED y Siebert PD (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:6025-6030.
- Dornbos D y Mullen R (1992). "Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperatura". J. Am. Oil Chem. Soc. **69**(3):228-232.
- Dornbos J, Mullen D, Shibles S (1989). "Drought stress effects during seed fill on soybean seed germination and vigor". Crop Science. **29**: 476-480
- Feng H, Chen Q, Feng J, Zhang J, Yang X, Zuo J (2007). "Functional characterization of the Arabidopsis eukaryotic translation initiation factor 5A-2 that plays a crucial role in plant growth and development by regulating cell division, cell growth, and cell death". Plant Physiol **144**(3):1531–1545.
- Finkelstein R, Gampala S y Rock C (2002). "Abscisic acid signaling in seeds and seedlings". Plant Cell **14**:S15-S45
- Floris M, Mahgoub H, Lanet E, Robaglia C, Menand B. (2009). "Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress". Int J. Molecular Science **10**:3168–3185.
- Gallie D y Browning K (2001). "eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs". J. Biol. Chem. **276**:36951-36960.
- Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, Gosti F, Leung J, Morris P C, Bouvier-Durand M and Vartanian N (1994). "Current advances in abscisic acid action and signaling". Plant Mol. Biol. **26**: 1557-1577.

- Gordon E, Mora R, Meredith S, Lee C, Lindquist S (1987). "Eukaryotic initiation factor 4d, the hypusine-containing protein, is conserved among eukaryotes". J Biol Chem **262**(34):16585–16589.
- Guiltinan M, Marcotte W y Quatrano R (1990). "A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element". Science **250**:267-271.
- Higo K, Ugawa, Y, Iwamoto M y Korenaga T (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements PLACE database. Nucleic Acids Research. **27** (1): 297-300.
- Holcik M, Sonenberg N (2005). "Translational control in stress and apoptosis." Nature Rev Mol Cell Biology **6**:318–327.
- Hopkins M, Lampi Y, Wang T, Liu Z, Thompson J (2008). "Eukaryotic translation initiation factor 5A is involved in pathogen-induced cell death and development of disease symptoms in Arabidopsis". Plant Physiol **148**(1):479–489.
- Horton P, Ruban A y Walters R (1996). "Regulation of light harvesting in green plants". Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol **47**:655–684.
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W and P Zimmermann (2008). Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. Advances in Bioinformatics 420747.
- Ingram J y Bartels D (1996). "The molecular basis of dehydration tolerance in plants". Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. **47**:377-403.
- Inoue H, Nojima H, y Okayama H (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids". Gene **96**: 23-28.
- James A, Lawn R y Cooper M (2008). "Genotypic variation for drought stress response traits in soybean". Aust. J. Agric. Res. **59**:670-678.
- Jensen A, Bush P, Figueras M, Alba M, Peracchia G, Messeguer R, Goday A y Pages M (1996). "Drought signal transduction in plants". Plant Grow Regul. **20**:105-110.
- Jones M, Turner N y Osmond C (1981). "The physiology and biochemistry of drought resistance in plants". Academic, New York 15–37.
- Kawagushi R y Bailey-Serres J (2002). "Regulation of translational initiation in plants". Curr. Opin. Plant Biol. **5**:460-465.
- Komar A y Hatzoglou M (2011). "Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states". Cell Cycle **10**:229–240.
- Koornneeff M, Leon-Kloosterziel K, Schwartz S y Zeevaart J (1998). "The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in Arabidopsis". Plant Physiol. Biochem **36**:83–89.
- Lageix S, Lanet E, Pouch-P'elissier N (2008). "Arabidopsis eIF2alpha kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding". BMC Plant Biology **8**:134.

- Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan P, McWilliam H, Valentin F, Wallace I, Wilm A, Lopez R, Thompson J, Gibson T and Higgins D (2007). "ClustalW and ClustalX version 2" Bioinformatics 23(21): 2947-2948
- Leung J and Giraudat J (1998). "Abscisic acid signal transduction". Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol 49:199-222
- Liotenberg S, North H y Marion-Poll A (1999). "Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants". Plant Physiol. Biochem 37:341-350.
- Liu F, Anderson M, Jacobson S y Jensen C. (2005). "Stomatal control and water use efficiency of soybean during progressive soil drying". Environ. Exp. Bot. 54:33-40.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinazaki K, Shinozaki K (1998). "Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an AP2/EREBP DNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression in Arabidopsis". The Plant Cell 10:1391-1406.
- Liu Z, Duguay J, Ma F, Wang TW, Tshin R, Hopkins MT, McNamara L, Thompson JE (2008). "Modulation of eIF5A1 expression alters xylem abundance in Arabidopsis thaliana". J Exp Bot 59(4):939-950.
- Long S, Humphries S y Falkowski P (1994). "Photoinhibition of photosynthesis in nature". Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol 45:633-663.
- Ma F, Liu Z, Wang T, Hopkins M, Peterson C, Thompson J (2010). "Arabidopsis eIF5A3 influences growth and the response to osmotic and nutrient stress". Plant Cell Environ 33(10):1682-1696.
- Ma Y, Miura E, Ham B, Cheng HW, Lee Y y Lucas W (2010). "Pumpkin eIF5A isoforms interact with components of the translational machinery in the cucurbit sieve tube system". The Plant Journal 64(3):536-550.
- Lescot M, Dhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouz P y Rombauts S (2002). "PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences". Nucleic Acids Res. 30(1):325-327.
- Manjunath S, Williams A y Bailey-Serres J (1999). "Oxygen deprivation stimulates Ca²⁺-mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein eIF4E in maize roots". Plant J. 19:21-30.
- Marintchev A y Wagner G. (2004). "Translation initiation: structures, mechanisms and evolution". Quarterly Reviews of Biophysics 37 (3/4): 197-284.
- Mayberry L, Allen M, Dennis M y Browning K (2009). "Evidence for variation in the optimal translation initiation complex: plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F differentially promote translation of mRNAs". Plant Physiol 150:1844-1854.
- Miura E, Yoo B, Lucas W. Characterization of a phloem-derived RNA-binding protein, PP17, as a component in the long-distance RNA trafficking pathway in plants. Department of Plant Biology, University of California Davis, Davis, CA, USA, and Delaware Biotechnology Institute, Newark, DE, USA.

- Moreno L (2009). "Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico". Una revisión. Agronomía Colombiana **27**(2):179-191.
- Muñoz A y Castellano M (2012). "Regulation of Translation Initiation under Abiotic Stress Conditions in Plants: Is It a Conserved or Not so Conserved Process among Eukaryotes?". Comparative and Functional Genomics **8**:1-7.
- Nakagawa T, Ishiguro S, Kimura T (2009). "Gateway vectors for plant transformation." Plant Biotechnology **26**(3): 275-284.
- Nilsen E y Orcutt D (1996). "Physiology of plants under stress". Abiotic factors. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Osoki A y Kennelly E (2003). "Phytoestrogens: a review of the present state of research". Phytother Res. **17**:84-869.
- Pandy D, Henera W, Pendleton J (1984). "Drought response of grain legumes under irrigation gradient. I. Yield and yield components". Agronomy Journal **76**:549-553.
- Park M, Nishimura K, Zanelli C, Valentini S (2010). "Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes". Amino acids **38**(2):491-500.
- Pestova T, Lorsch J y Hellen C (2007). "Translational Control in Biology and Medicine" In: Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB (eds)
- Prestridge D (1991) SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. CABIOS **7**, 203-206.
- Rock C (200). "Pathways to abscisic acid-regulated gene expression". New Phytol **148**:357-396.
- Rohde A, Kurup S and Holdsworth, M (2000). "ABI3 emerges from the seed". Trends Plant Sci **5**:418-419.
- Sakai T y Kogiso M (2008). "Soy isoflavones and immunity". J. Med. Invest. **55**:167-173.
- Sambrook J, Fritsch E, y Maniatis T (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual". 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Salinas A, Santos D, Santos B, Mello V, Gomes A (1989). "Evaluación de la calidad fisiológica de semillas de soja producidas en diferentes niveles de humedad en el suelo". In: Conferencia mundial de investigación en soja. Anales. Buenos Aires: A.J. PASCALE, 1989. p.391-397.
- Sayed L, Rouhollah M, Mosharraf H and Ismail R. (2012). Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. Water Stress, Prof. Ismail Md. Mofizur Rahman (Ed.), ISBN: 978-953-307-963-9, InTech,
- Sharp E, Wu Y, Voetberg G, Saab I y LeNoble M (1994). "Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials". Exp. Bot. **45**: 1743-1751.
- Sharp R, LeNoble M, Else M, Thorne E y Gherardi F (2000). "Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene". Exp. Bot. **51**:1575-1584.

- Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K (1997). "Gene expression and signal transduction in water-stress response". Plant Physiol. **115**:327-334
- Sinclair T y Serraj R (1995). "Legume nitrogen fixation and drought". Nature 378, 344.
- Spollen W, LeNoble M, Sammuels T, Bernstein N y Sharp R (2000). "Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production". Plant Physiol. **122**:967-976.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods". Molecular Biology and Evolution **28**: 2731-2739
- Tekrony M, Egli D, Philips A(1980). "The effect of weathering on viability and vigor of soybean seed". Agronomy Journal. **72**: 749-753.
- Teng Y, Ma X, He Y, Jiang Y, Du J, Xiang C, Chen Y, Zhou C (2009). "Crystal structure of Arabidopsis translation initiation factor eIF-5A2". Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **77**(3):736–740.
- Thompson J, Hopkins M, Taylor C, Wang T (2004). "Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5a: implications for plant growth and development". Trends Plant Sci **9**(4):174–179.
- Turner N, Wright G y Siddique K (2001). "Adaptation of grain legumes (pulses) to water limited environments". Adv. Agron. **71**:193-123.
- Van Der Kelen K, Beyaert R, Inze D y De Veylder L (2009). "Translational control of eukaryotic gene expression". Crit. Rev. Biochem. Mol.Biol. **44**:143-168.
- Vinocur B and Altman A (2005). "Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress:achievements and limitations". Current opinion in biotechnology **16**:123-132.
- Wang L, Xu C, Wang C and Wang Y (2012): "Characterization of a eukaryotic translation initiation factor 5A homolog from Tamarix androssowii involved in plant abiotic stress tolerance". BMC Plant Biology **12**:118
- Wang T, Lu L, Zhang CG Taylor C, Thompson J (2003). "Pleiotropic effects of suppressing deoxyhypusine synthase expression in Arabidopsis thaliana". Plant Mol Biol **52**(6):1223–1235.
- Xiong L. and J. K. Zhu (2001). "Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives." Physiol Plant **112**(2): 152-166.
- Xu J, Zhang B, Jiang C, Ming F (2011). "RceIF5A, encoding an eukaryotic translation initiation factor 5A in Rosa chinensis, can enhance thermotolerance, oxidative and osmotic stress resistance of Arabidopsis thaliana". Plant Mol Biol **75**:167–178.
- Zhu J-K. (2001). "Plant salt tolerance". Trends in Plant Science **6**:66–71.
- Zhu JK. (2002). "Salt and drought stress signal transduction in plants". Ann. Rev. Plant Biol. **53**:247-273.