

Estudio funcional de genes de respuesta a estrés abiótico en plantas vasculares y avasculares

Lic. Ana Paula Mulet



Maestría en Ciencias Biológicas opción Biología Molecular y Celular

Tutora: Dra. Sabina Vidal

Montevideo, 2012

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

A mi familia y a todos los que sin serlo se ganaron un lugar en ella.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora, Sabina, por su compañía tanto a nivel académico como personal durante todos estos años. Además de que siempre pude contar con su apoyo es una inspiración para mí.

A todos aquellos integrantes y ex integrantes del laboratorio de Biología Molecular Vegetal con cuyo apoyo siempre pude contar y de los cuales he aprendido muchísimo en todos estos años.

A todos los integrantes del Instituto de Química Biológica y de Bioquímica que más de una vez me han sacado de algún apuro.

También al grupo de bioquímica de la facultad de agronomía, principalmente a Omar y Esteban, que me proporcionaron las muestras y su ayuda para el trabajo con soja. A los integrantes del Instituto de Fisiología Vegetal del INTA (Córdoba, Argentina).

A la Anii por la financiación de mi beca de maestría sin la cual me hubiera sido imposible acceder a esta instancia y a PEDECIBA por la oportunidad de formación que ofrecen.

Mi gratitud especial a todos mis amigos y a mi familia. A mis hermanos de la vida, Ro, Maxito y César con los que pude siempre contar en los buenos y malos momentos y que me ayudaron a salir adelante cuando más los necesite, a ellos y a Cuz, el hombre de mi vida, les debo este logro.

Índice

Agradecimientos	4
Índice	5
Resumen	7
Abreviaturas	9
Introducción	10
Estrés por frío	10
Estrés salino	11
Estrés hídrico	12
Rol de azúcares y otros osmolitos en la respuesta al déficit hídrico	13
El ácido abscísico y su relación con el estrés abiótico en plantas	14
<i>Physcomitrella patens</i> como modelo de estudio	15
Recombinación homóloga en <i>Physcomitrella patens</i>	16
PpABR100 y PpABR170 son genes de <i>Physcomitrella patens</i> posiblemente vinculados a la respuesta al estrés abiótico	18
La soja como modelo de traqueofita	19
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Materiales y Métodos	21
Resultados y discusión	27
Análisis funcional del gen PpABR100 de <i>Physcomitrella patens</i>	27
Análisis <i>in silico</i> de PpABR100	27
Obtención de mutantes para el estudio de la función de PpABR100	31
Caracterización molecular de los transformantes	32
Fenotipado de líneas mutantes del gen PpABR100	34
Análisis funcional PpABR170 en <i>Physcomitrella patens</i>	46
Elementos que podrían explicar la dificultad de obtener mutantes KO de PpABR170	48

Búsqueda y descripción de posibles homólogos de PpABR170 en <i>Glycine max</i>	50
Estudio de lipasas GDSL de soja	50
Descripción de las proteínas con dominio fasciclina de soja	59
Conclusiones y perspectivas	63
Bibliografía	64
Anexos	76
Anexo 1	76
Anexo 2	81

Resumen

Las plantas se ven sometidas a un sinnúmero de condiciones ambientales desfavorables con las cuales deben lidiar dada su condición de organismos sésiles. Estas condiciones desfavorables constituyen factores de estrés frente a los cuales las plantas son capaces de responder a nivel fisiológico y morfológico así como bioquímica y molecularmente. El estrés puede ser biótico, si es causado por otros organismos o compuestos derivados de ellos o abiótico si los factores que lo promueven son ambientales.

Un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio permitió identificar dos genes de *Physcomitrella patens* (PpABR100 y PpABR170) que son fuertemente inducidos por el tratamiento con la hormona ácido abscísico y por condiciones de estrés abiótico que incluyen el estrés salino y osmótico.

En este trabajo se utilizaron dos modelos vegetales distantes evolutivamente entre sí y se estudió la relevancia funcional de PpABR100 y PpABR170 en la respuesta adaptativa al estrés abiótico. Los dos modelos de estudio fueron, por un lado, el musgo *Physcomitrella patens*, perteneciente a la familia de las briofitas, y por otro lado la soja (*Glycine max*), una angiosperma dicotiledónea.

Physcomitrella patens, es una planta avascular que se ha convertido en un modelo vegetal debido a su facilidad para realizar estudios de genética reversa. Esta planta se destaca por su resistencia al estrés abiótico y es considerada una fuente de genes para el mejoramiento de especies cultivadas. Por su parte, la soja es un cultivo de gran interés agronómico, por lo que se han desarrollado múltiples herramientas moleculares para su estudio. Además se posee acceso a germoplasma de cultivares con distinto grado de tolerancia al estrés abiótico.

Con el objetivo de evaluar la función de estos genes en la tolerancia al estrés en *Physcomitrella patens* se generaron mutantes KO y plantas que sobreexpresan el gen PpABR100. No se logró obtener mutantes KO para el gen PpABR170. Los análisis fenotípicos de plantas con expresión alterada del gen PpABR100 permiten sugerir una vinculación de este gen principalmente con la respuesta a metales pesados.

La búsqueda de genes ortólogos de PpABR100 en genomas de plantas superiores permitió constatar la ausencia de genes con similitud de secuencia con el mismo en los genomas analizados de plantas con semillas. Sin embargo, la proteína deducida de PpABR100 tiene similitud significativa con una proteína del helecho *Osmunda japonica* que se localiza en los cloroplastos de las esporas verdes de esta planta.

El gen PpABR170 codifica para una proteína del tipo lipasa GDSL que tiene un dominio fasciclina C-terminal. No se encontraron genes que codifiquen lipasas GDSL y que a su vez contengan el dominio fasciclina en genomas de plantas superiores. Sin embargo, todos los genomas analizados (*Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa*, *Glycine max*) presentan numerosos genes codificantes de lipasas GDSL, así como genes de fasciclinas.

Se analizaron en profundidad los genes de soja con dominios lipasa GDSL y fasciclina identificándose varios genes candidatos que podrían estar participando en la respuesta de esta leguminosa tanto al estrés biótico como el abiótico. Se estudió la expresión de tres de ellos

GLIP4, GLIP16 y FAS28 y en particular se encontraron evidencias de una potencial actividad de la lipasa GDSL GLIP4 alterando el crecimiento bacteriano.

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
Cds	Secuencia codificante
Chl	Clorofila
EST	Marcador de secuencia expresada
G2004	Grandsen 2004
GLIP	GDSL lipasa
Int	Integrasa
KO	Mutante nulo
LEA	Abundantes durante la embriogénesis
HR	Recombinación homóloga
HSP	Proteínas de shock térmico
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
PQ	Paraquat
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SA	Ácido salicílico
SE	Sobreexpresante
SSH	Sustracción por Supresión e Hibridación
TGR	Reemplazo dirigido de secuencias
Wt	Tipo salvaje
Xis	Exisionasa

Introducción

Las plantas son organismos sésiles y por lo tanto deben convivir con una gran variedad de condiciones ambientales adversas. Esto determina que los mecanismos de respuesta a situaciones desfavorables hayan proliferado y se hayan diversificado en función de los distintos factores de estrés a las que las mismas se ven expuestas.

Un factor de estrés se define como cualquier estímulo que determine que una planta no se desarrolle en su máximo potencial. Los factores de estrés pueden ser divididos en dos grandes grupos, el biótico y el abiótico. El estrés biótico es aquel impuesto por otros organismos o compuestos derivados o generados de la interacción con ellos, en tanto que el estrés abiótico es generado por factores ambientales como ser la temperatura, la salinidad o la composición de nutrientes del suelo, exceso y la falta de agua o la exposición a sustancias tóxicas.

Las plantas responden al estrés a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular. Para entender las respuestas moleculares de las plantas al estrés abiótico es necesario primero explorar las consecuencias a nivel celular de cada tipo de estrés y cómo éstas se correlacionan. Los distintos tipos de estrés generan señales que son integradas y determinan una respuesta a cada situación, en muchos casos distintas situaciones de estrés tienen los mismos efectos a nivel celular. Así por ejemplo, tanto el estrés hídrico, como el frío o la salinidad, determinan un aumento en la concentración de los solutos intracelulares derivando en estrés osmótico (Chinnusamy et al., 2004).

Otro componente común de varios tipos de estrés es el estrés oxidativo. El exceso de luz, la presencia de sustancias tóxicas como metales pesados o sales y cualquier otro fenómeno que derive en la afectación de la maquinaria fotosintética o la maquinaria mitocondrial, incluyendo la respuesta a patógenos, tendrán como efecto la formación especies reactivas del oxígeno (ROS) y por lo tanto de estrés oxidativo.

Además de este efecto común se identifican consecuencias particulares de cada estímulo, por ejemplo el frío además del estrés osmótico genera una disminución en el metabolismo celular y un descenso en la solubilidad de las membranas. El estrés salino, por su parte, suma al efecto osmótico la toxicidad del sodio.

Estrés por frío

Cada planta tiene requerimientos específicos de temperatura. Un conjunto de condiciones de temperatura que son las óptimas para una planta pueden ser un factor de estrés para otra. Muchas plantas, especialmente aquellas que son nativas de ambientes templados, exhiben síntomas de daño cuando son expuestas a bajas temperaturas aunque las mismas no lleguen a ser temperaturas de congelamiento (Lynch, 1990). Algunos de los efectos que puede tener la exposición prolongada de las plantas a temperaturas bajas son la reducción de la expansión de las hojas, la clorosis e incluso necrosis. El frío además afecta severamente el desarrollo reproductivo de muchas plantas (Jiang et al., 2002).

Por otro lado, las temperaturas de congelamiento pueden inducir daños severos en las membranas (Steponkus, 1984). Este daño es debido principalmente a la deshidratación aguda

asociada con la congelación. La membrana lipídica está principalmente compuesta por dos tipos de ácidos grasos, los insaturados y los ácidos grasos saturados. Los ácidos grasos insaturados tienen uno o más dobles enlaces entre dos átomos de carbono mientras que en los ácidos grasos saturados los átomos de carbono se encuentran totalmente saturados por átomos de hidrógeno.

Los lípidos que contienen ácidos grasos saturados solidifican a temperaturas más altas que aquellos que contienen ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, la proporción relativa de ácidos grasos insaturados en la membrana influye poderosamente en la fluidez de la misma (Steponkus, 1984). La temperatura a la cual la membrana pasa de un estado semifluido a un estado semicristalino es conocida como temperatura de transición. Las plantas sensibles al frío usualmente tiene proporciones más altas de ácidos grasos saturados y por lo tanto una temperatura de transición mayor.

El frío en plantas sensibles suele causar daños estructurales y disfunciones metabólicas (Kacperska, 1989). En conjunto, el efecto final del enfriamiento es la pérdida de integridad de la membrana, con la consecuente pérdida de electrolitos. A su vez, la integridad de los organelos intracelulares también se puede ver afectada, perdiéndose así la compartimentarización, reduciéndose la tasa fotosintética y afectando el ensamblado de proteínas y procesos metabólicos en general.

En el caso del congelamiento, la causa real del daño más allá de las bajas temperaturas es la formación de hielo extracelular. Los tejidos deshidratados como las semillas y las esporas de los hongos, pueden sobrevivir a temperaturas muy bajas sin ningún síntoma de daño puesto que el bajo contenido de agua no promueve la formación de cristales de hielo. Incluso la criopreservación, un método común para guardar semillas y otros materiales biológicos, está basada en lograr la solidificación del agua sin la formación de cristales.

Las respuestas adaptativas a condiciones de estrés generalmente involucran la activación de la expresión génica. El grupo más importante de genes inducidos por el frío codifica polipéptidos pertenecientes a la familia de las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*). Muchas de estas proteínas son sintetizadas durante la última fase de la embriogénesis justo antes a la desecación de la semilla así como en tejidos vegetativos en respuesta al estrés por deshidratación (Close, 1997; Dure, 1993; Ingram 1996). Estas proteínas del tipo LEA son mayormente hidrofílicas y muchas tienen una composición aminoacídica simple con motivos de secuencias aminoacídicas repetidas.

Estrés salino

La salinidad constituye un estrés compuesto. Por un lado, causa estrés hiperiónico y por otro, genera un estrés hiperosmótico. Los depósitos de sal en los suelos generan un menor potencial hídrico aumentando la dificultad de la planta para adquirir tanto agua como nutrientes. Por lo tanto, el estrés salino esencialmente resulta en una deficiencia hídrica en la planta y a nivel fisiológico es tomado como un estrés hídrico. Virtualmente cada aspecto de la fisiología de las plantas así como del metabolismo celular es afectado por el estrés salino y el hídrico.

Entre los principales daños que causa el estrés salino a la célula se encuentra la disrupción del equilibrio iónico. En el caso del sodio, el mismo es tóxico para el metabolismo celular y tiene un efecto deletéreo en el funcionamiento de ciertas enzimas (Niu et al., 1995). Altas concentraciones de sodio pueden causar un desbalance osmótico, la desorganización de la membrana y una reducción del crecimiento, de la división celular y la expansión celular. Los altos niveles de sodio también conducen a la reducción de la fotosíntesis y a la producción de ROS (Flowers et al., 1977; Greenway y Munns, 1980; Yeo, 1998 y Flowers et al., 1992).

Una de las mayores consecuencias del estrés inducido por NaCl es la pérdida de agua intracelular. Para prevenir la pérdida de agua y proteger las estructuras intracelulares, las plantas acumulan varios metabolitos que son también conocidos como solutos compatibles. Estos solutos no inhiben las reacciones metabólicas normales y dado que el agua se mueve desde los sitios de mayor potencial a los sitios de menor potencial la acumulación de estos osmolitos hace que el potencial de agua sea menor dentro de la célula, previniendo así la pérdida de agua intracelular (Ford, 1980; Breesan et al., 1998). Los metabolitos frecuentemente observados con función de osmolitos compatibles son los azúcares, principalmente la fructosa y la sacarosa, los alcoholes y azúcares complejos como los fructanos. Además metabolitos cargados como la glicina betaína, la prolina y la ectoína pueden también acumularse.

Estrés hídrico

El estrés hídrico puede resultar tanto del exceso como del déficit de agua. El exceso de agua, deriva primariamente en la reducción del suministro de oxígeno a las raíces. La reducción en el oxígeno resulta en un funcionamiento deficiente de la raíz que incluye fallas en la respiración y una adquisición limitada de nutrientes. El estrés hídrico más común es el estrés por déficit de agua conocido como estrés por sequía. La remoción del agua de la membrana rompe la estructura de bicapa normal y la misma se vuelve extremadamente porosa al desecarse. El estrés dentro de la bicapa lipídica puede también resultar en el desplazamiento de las proteínas de membrana lo cual contribuye a la pérdida de integridad y selectividad, disrupción de la compartimentarización celular y pérdida en la actividad de las enzimas. Además del daño a la membrana, las proteínas citosólicas y de los organelos pueden exhibir una actividad reducida o pueden desnaturalizarse completamente al deshidratarse. La alta concentración celular de electrolitos debido a la deshidratación del protoplasma puede también causar disrupción del metabolismo celular (Yeo, 1998)

Como consecuencia de la sequía las células vegetales responden activando la expresión de genes del tipo LEA, así como otras proteínas entre las cuales están las chaperonas moleculares, que ayudan a proteger a su proteína compañera de la degradación y las proteinasas cuya función es remover las proteínas dañadas o desnaturalizadas. Este estrés provoca la activación de proteínas relacionadas con la producción y remoción de ROS (Cushman y Bohnert, 2000; Zhu, 2002)

A su vez, las plantas responden rápido a la sequía para prevenir que la maquinaria fotosintética sufra daños irreversibles. El cierre estomático en respuesta al déficit hídrico resulta primariamente en un descenso en la tasa fotosintética, además, condiciones de sequía muy

severas limitan la fotosíntesis puesto que baja la actividad de la enzima RuBisCO (Bota et al., 2004). La actividad de la cadena de electrones está profundamente ligada a la disponibilidad de CO₂ en la planta y el fotosistema II (PSII) regularmente declina en paralelo bajo condiciones de sequía (Loreto et al., 1995). Se ha mostrado que el descenso en tasa de fotosíntesis se debe primariamente a la deficiencia de CO₂, puesto que la eficiencia fotosintética puede ser vuelta a la normalidad luego de una rápida transición de las hojas a un ambiente rico en CO₂ (Meyer et al., 1998).

El descenso en los niveles de CO₂ intracelular determina una reducción excesiva de los componentes dentro del sistema de transporte de electrones y los electrones son transferidos al fotosistema I (PS I). Esto genera ROS incluyendo el superóxido, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radicales hidroxilos. Estos ROS deben ser depurados por la planta puesto que generan foto oxidación (Gill et al., 2010)

Los sistemas detoxificadores de plantas, que incluyen al ascorbato y al glutatión como sistemas no enzimáticos, controlan la concentración intracelular de ROS. Los ROS, a su vez, actúan como segundos mensajeros en la traducción de señales redox y están implicadas en los eventos mediados por hormonas (Foyer y Noctor, 2003). El H₂O₂ actúa como una señal para el cierre estomático, la aclimatación de las hojas a la alta radiación y la inducción de proteínas de shock térmico (Karpinska et al., 2000).

En una situación en donde el déficit hídrico se vuelve muy intenso o prolongado, las plantas pueden marchitarse, las células contraerse y esto puede determinar la contracción de las membranas celulares. La tensión en la membrana es uno de los efectos severos de la sequía implicado en la fisiología de la planta. Esto afecta en particular el funcionamiento de los transportadores de iones así como de otras enzimas asociadas a la membrana. La membrana cloroplástica en particular es sensible a los daños causados por la oxidación generada por las cantidades excesivas de ROS en las mismas. Los ROS no solo pueden causar la peroxidación y deesterificación de los lípidos de membrana sino que también promover la desnaturalización y la mutación de ácidos nucleicos (Bowler et al., 1992).

El descenso del volumen celular a causa de la deshidratación también determina que el contenido celular se vuelva viscoso, incrementando así la probabilidad de interacciones entre proteínas y promoviendo su agregación y desnaturalización (Hoekstra et al., 2001). El aumento en la cantidad de solutos puede exceder los niveles tóxicos, lo cual suele ser deletéreo para las funciones de algunas enzimas incluyendo aquellas requeridas por la maquinaria fotosintética (Hoekstra et al., 2001). La transcripción de algunos genes antioxidantes como la glutatión reductasa y la ascorbato peroxidasa es mayor durante la recuperación de la sequía, y pueden jugar un rol importante en la protección de la maquinaria celular contra la fotooxidación producida por ROS (Ratnayaka et al., 2003).

Rol de azúcares y otros osmolitos en la respuesta al déficit hídrico.

Las plantas tienden a compensar la falta de agua por un proceso conocido como ajuste osmótico. En este proceso, las plantas bajan su potencial osmótico por la acumulación de solutos. Ciertos procesos metabólicos son provocados en respuesta al estrés, lo cual aumenta

la concentración neta de solutos en la célula, ayudando así al movimiento de agua hacia el interior de la misma. Un gran número de compuestos son sintetizados, los cuales juegan un rol manteniendo el equilibrio osmótico, protegiendo las membranas así como las macromoléculas. Estos compuestos incluyen la prolina, el glutamato, la glicina betaína, carnitina, manitol, sorbitol, fructanos, polialcoholes, trehalosa, sacarosa, oligosacáridos e iones inorgánicos como el K^+ . Estos compuestos ayudan a la célula a mantener su estado hidratado y por lo tanto tienen como función la de proveer resistencia contra la deshidratación celular (Hoekstra et al., 2001; Ramanjulu et al., 2002). El grupo hidroxilo de los alcoholes azucarados sustituye al grupo OH del agua y mantiene las relaciones hidrofílicas con los lípidos y proteínas de membrana. Estas moléculas ayudan a mantener la integridad estructural de las mismas sin intervenir en los procesos metabólicos normales de la célula.

El ácido abscísico y su relación con el estrés abiótico en plantas

Muchas de las respuestas al estrés abiótico en plantas dependen de la hormona ácido abscísico (ABA) (Christmann et al., 2006). El ABA es una fitohormona lipofílica que oficia de mensajero endógeno tanto en el estrés biótico como abiótico en plantas (Rock, 2000).

En semillas, el ABA está relacionado con el control de la dormición y la germinación (Finkelstein et al., 2002; Nambara y Marion-Poll 2003; Finkelstein et al., 2008). Evita que la planta crezca en ambientes adversos, haciendo que las semillas sean altamente tolerantes a varios tipos de condiciones de estrés. Otra función fisiológica del ABA es inducir el cierre estomático, lo cual es esencial para la tolerancia al estrés hídrico (Acharya y Assmann 2009)

El rol del ABA es crucial para la respuesta celular a distintos factores de estrés como ser la sequía, el frío, la salinidad, las heridas, la radiación ultravioleta y el ataque de patógenos (Rock, 2000). La sequía y la alta salinidad resultan en un fuerte aumento de los niveles de esta hormona que es acompañado por cambios en la expresión génica y por respuestas adaptativas fisiológicas (Raghavendra et al., 2010).

Los genes que se expresan en respuesta a este estímulo abarcan un gran número de funciones como ser la formación de osmolitos compatibles, la expresión de proteínas chaperonas como ser las dehidrinas o las proteínas de shock térmico (HSP) y la expresión de enzimas que actúan como *scavengers* de radicales libres para la disminución del estrés oxidativo entre otros (Cumming et al., 2007; Böhmer y Schoroder, 2011; Wang et al., 2011; Okamoto et al., 2010)

El ABA se encuentra tanto en plantas vasculares como avasculares, también ha sido encontrada en algas (Hirsch et al., 1989), hongos (Yamamoto et al., 2000) e incluso en tejido cerebral de mamíferos (Le Page-Degivry, 1986). Si bien el ABA es ampliamente encontrado en plantas inferiores como musgos y helechos, no está claro cuál es su contribución a la evolución de las plantas terrestres (Nambara y Marion-Poll 2005).

A su vez, los distintos organismos han ido evolucionando en sus respuestas al ABA tanto a nivel fisiológico como molecular de manera independiente, por lo que existen varios grados de tolerancia, resistencia o susceptibilidad a estos estímulos, incluso dentro de la misma especie.

Physcomitrella patens como modelo de estudio

Un modelo vegetal que se destaca entre otras cosas por su alto grado de resistencia al estrés abiótico es el musgo *Physcomitrella patens* (Frank et al., 2005, Sunkar et al., 2003; Saavedra et al., 2006). *Physcomitrella* es una briofita avascular monodioica que se reproduce a partir de esporas. Los musgos fueron de los primeros organismos vegetales en colonizar la tierra y dada la ausencia de sistema vascular y sistemas aislantes que permitan la captación y retención del agua, ha desarrollado un sinnúmero de estrategias para tolerar el estrés hídrico y por consiguiente el estrés oxidativo y estrés osmótico que éste genera (Frank et al., 2005). Esta planta es capaz de soportar una desecación en ciertas condiciones de hasta el 99,8% de su peso fresco (Oldenhof et al., 2006) y una concentración de sorbitol y manitol de 500 mM y 900mM respectivamente (Frank et al., 2005, Saavedra et al., 2006).

Al igual que otros musgos, durante su crecimiento vegetativo *Physcomitrella* se mantiene en estado haploide (figura 1). Esto es directamente opuesto a lo que sucede en el ciclo de vida de plantas vasculares, en donde el estado diploide es el dominante. Aun así, el estado gametofítico de los musgos presenta estructuras similares a las de plantas vasculares por ejemplo estructuras similares a raíces y hojas, denominadas rizoides y filidos respectivamente.

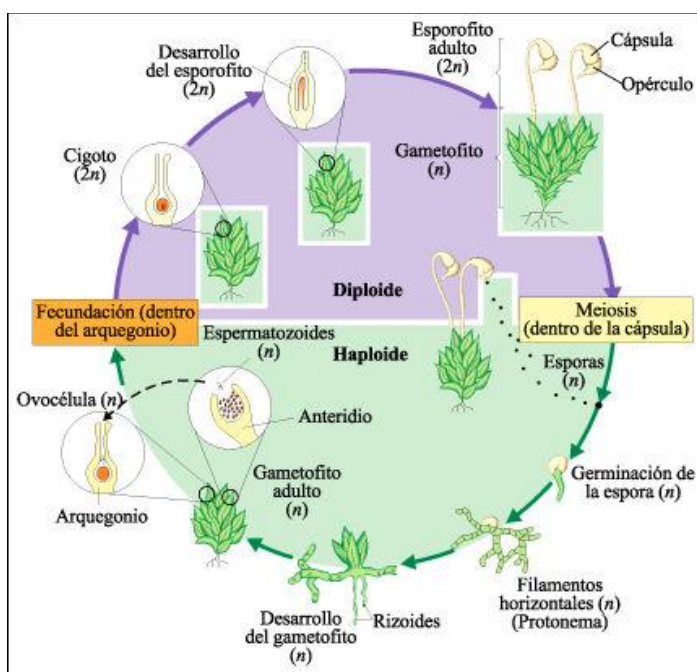


Figura 1. Ciclo de vida de un musgo. Una espora haploide (n) da lugar a un tejido bidimensional denominado protonema. El protonema está compuesto de dos tipos de filamentos el cloronema (rico en cloroplastos y con tabiques oblicuos) y el caulonema (más pobre en protoplastos). Del protonema crece el gametofito que se diferencia en caulidios y filidos. De los extremos de los caulidios o ramas se desarrolla los órganos sexuales. Los órganos femeninos son llamados arquegonios y son protegidos por un grupo de hojas modificadas llamadas perichaetum. El arqueogonio posee un cuello por el cual se desliza el material genético masculino. Los órganos masculinos son llamados anteridios y se encuentran contenidos por hojas modificadas llamadas perigonios.

De las particularidades de su ciclo de vida surge una de las características que la hacen un modelo interesante para el trabajo en genética y biología molecular. Al transcurrir la mayor parte de su ciclo de vida en estado haploide la selección de mutantes homocigotos o los efectos de la heterocigosis no necesitan ser tenidos en cuenta. Por otro lado tiene un genoma relativamente pequeño en relación al resto de los genomas vegetales (480 mpb) y el mismo se encuentra secuenciado y disponible desde el año 2008 (Rensing et al., 2008).

Su pequeño tamaño, además, hace posible crecerla en placas de petri y se pueden obtener nuevas colonias a partir de pequeños trozos de tejido por lo cual su crecimiento *in vitro* es sencillo. Sus protoplastos pueden ser transformados de manera estable mediante una técnica

simple y organismos adultos pueden ser regenerados a partir de una única célula sin necesidad del agregado de hormonas (Hartmann y Jenkins, 1984)

Si bien los musgos divergieron de las plantas con semillas hace más de 400 millones de años, *Physcomitrella* comparte varias cualidades encontradas en plantas superiores, como las respuestas hormonales (Cove et al., 2002; Erxleben et al., 2011; Katsir et al., 2008; Paponov et al., 2009). A su vez, muchos de los mecanismos celulares de respuesta al estrés abiótico parecen estar conservados entre *Physcomitrella* y plantas vasculares, por los datos obtenidos en este musgo pueden ser extrapolados a otros modelos o cultivos de interés agronómico (Wang et al., 2010; Hanada et al., 2011)

Por otro lado, *Physcomitrella* se ha convertido en un nuevo modelo para el estudio de la fitohormona ABA. La misma ha sido involucrada a la adaptación al estrés abiótico dado que el agregado exógeno de ABA induce la tolerancia al congelamiento (Minami et al., 2003) y el aumento en sus niveles endógenos es detectado luego de un tratamiento de estrés osmótico (Minami et al., 2005). Además, plantas como *Physcomitrella*, pueden tolerar la desecación completa si la misma es hecha de manera lenta y la planta es pretratada con ABA y este proceso está asociado con un aumento en los niveles intracelulares de sacarosa (Oldenhof et al., 2006). La tolerancia a estrés inducida por ABA está acompañada también por un aumento en la expresión de genes relacionados al estrés (Seki et al., 2002; Li et al., 2006).

Algunas de las proteínas inducidas por esta hormona en *Physcomitrella* están relacionadas en el metabolismo y la energía, la respuesta de defensa, el tráfico y almacenamiento de proteínas entre otros (Hoth et al., 2002). Las respuestas moleculares a ABA pueden ser altamente conservadas entre las especies de plantas superiores y briofitas. Sin embargo, el rol del ABA o de sus vías de señalización en respuesta al estrés ambiental no ha sido elucidado por completo.

Recombinación homóloga en *Physcomitrella patens*

Durante la última década, *Physcomitrella* ha emergido como un nuevo modelo vegetal también para estudios de biología molecular. Una de las razones que más contribuyen a esto fue el descubrimiento hecho en 1996 de que *Physcomitrella* integra el DNA en su genoma predominantemente por recombinación homóloga (HR) (Kammerer y Cove, 1996). Posteriormente se verificó que el porcentaje de HR en esta planta con respecto a la recombinación por unión de extremos no homólogos es de casi del 100%, una tasa similar a la observada en levaduras y mucho más alta de la descrita para plantas vasculares como *Arabidopsis thaliana* (solo 0,001%) (Schaefer y Zryd, 1997). La recombinación homóloga permite la introducción de alteraciones génicas de manera virtualmente ilimitada. Básicamente permite la inserción o reemplazo de secuencias de manera dirigida, permitiendo así desde el cambio de un solo nucleótido en una secuencia génica hasta la depleción completa de genes, el intercambio de dominios proteicos o de secuencias promotoras o seleccionar el sitio de inserción de secuencias a ser sobreexpresadas, entre otros.

La recombinación homóloga es un proceso que ocurre de manera natural y que cumple varias funciones esenciales en los organismos, como ser la generación de variabilidad o la reparación

de rupturas de doble hebra en el DNA. Este proceso se encuentra altamente regulado en los organismos puesto que la recombinación no regulada generaría una inestabilidad genómica deletérea para la célula (Schaefer y Zryd, 1997). Este mecanismo se activa mayormente durante la meiosis, en donde el intercambio entre cromátidas hermanas genera variabilidad alélica en los gametos sin poner en riesgo la estabilidad debido al estado condensado de la cromatina, así como en presencia de rupturas de doble hebra en el DNA. En este último caso, la recombinación homóloga permite unir los extremos rotos basándose en la secuencia correspondiente presente en el cromosoma homólogo.

En plantas vasculares la remoción de lesiones de doble cadena en el DNA suele realizarse mayormente mediante el proceso de uniones de extremos no homólogos (NHEJ, Non Homologous end joining) (Hohe y Reski, 2003). La relación entre la selección de uno u otro mecanismo de reparación es lo que determina el tipo de recombinación que realizará la célula. Curiosamente los organismos en los cuales la HR se prefiere con respecto a NHEJ son aquellos que transcurren todo o la mayor parte de su ciclo de vida en estado haploide. Es por esto que una de las teorías para explicar el porqué de la preferencia de la recombinación homóloga en estos organismos es que la misma sería esencial en ellos para mantener la integridad genómica (Schaefer, 2001).

Genética reversa en *Physcomitrella*.

La alta frecuencia de HR en *Physcomitrella*, al igual que en otros organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae*, presentan ventajas desde el punto de vista biotecnológico, puesto que permite un acercamiento a la función de los genes basado en la genética reversa.

La genética reversa, se define en contraposición a la genética clásica o directa en la cual se parte de un fenotipo determinado y se intenta determinar cuál o cuáles son los genes que determinan estas características. En la genética reversa el material inicial de estudio son los genes y el acercamiento consiste en identificar cual es la función que cumplen o el fenotipo del cual los mismos son responsables.

Para esto se recurre a la alteración en la secuencia o nivel de expresión del gen de interés. La HR permite realizar estos cambios de una manera simple y dirigida. Por ejemplo el reemplazo dirigido de genes (TGR, *Targeted Gene Replacement*) que constituye una técnica ampliamente utilizada para la obtención de mutantes nulos (Kamisugui et al., 2006). La TGR consiste en la introducción de una secuencia flanqueada por dos segmentos que presenten homología con la zona del genoma en donde se desea insertar la secuencia. Estos segmentos dirigirán dos eventos de recombinación homóloga, uno por cada secuencia homóloga, reemplazando así la secuencia genómica original por una construcción génica que en general incluye un cassette de selección (figura 2). En el caso de que la secuencia genómica reemplazada codifique para un gen, se obtiene un mutante nulo (KO). Se pueden también recombinar secuencias casi idénticas y obtener así cambios puntuales como mutaciones en aminoácidos específicos, intercambio o delección de dominios proteicos o generar proteínas de fusión.

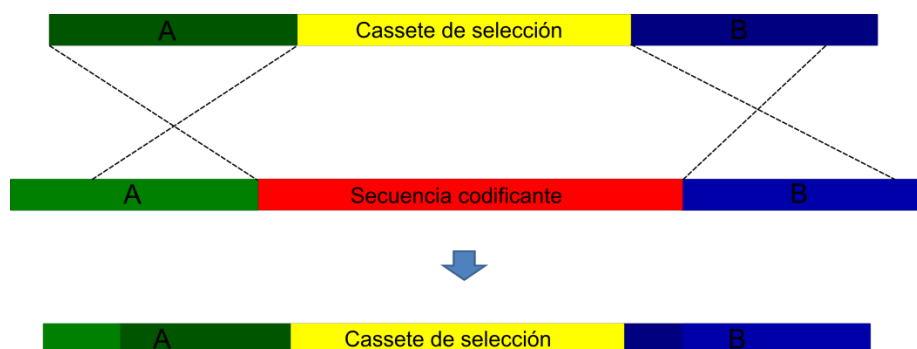


Figura 2: Reemplazo dirigido de secuencias. La introducción de dos secuencias flanqueantes de alrededor de 800 pb dirigen dos eventos de recombinación homóloga que determinan el reemplazo de la secuencia flanqueada, en este caso codificante, por otra, en este caso, un cassette de selección.

La eficiencia de la recombinación homóloga en *Physcomitrella* depende tanto del largo de la secuencia como de la homología entre la secuencia introducida y el genoma blanco. Se determinó que el largo óptimo es de 800 pb y que el porcentaje de recombinación homóloga no aumenta con el aumento del largo de las secuencias por encima de este límite. Sin embargo este parámetro si se ve afectado por la homogeneidad entre la longitud de ambos extremos. La presencia de secuencias sin homología por fuera de la zona de inserción es otro de los factores que afecta la eficiencia en este proceso (Kamisugui et al., 2006).

PpABR100 y PpABR170 son genes de *Physcomitrella patens* posiblemente vinculados a la respuesta al estrés abiótico

Varios genes han sido vinculados con la respuesta al estrés en *Physcomitrella* mediante diferentes enfoques. Entre ellos se destacan el análisis de transcriptomas (Frank et al., 2005; Cuming et al., 2007), la mutagénesis al azar y los estudios funcionales de genes mediante genética reversa. Estudios previos realizados en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias utilizando la técnica de SSH (Sustracción por Supresión e Hibridación) permitieron la identificación de un grupo de genes de *Physcomitrella* que se inducen al exponer esta planta al ABA (Carvallo, 2006). Entre las secuencias que se seleccionaron para su posterior caracterización se encuentran los clones Pp100 y Pp170, posteriormente denominados PpABR (*Physcomitrella patens* ABA-Responsive) 100 y 170.

Tanto PpABR100 como PpABR170 se inducen claramente en condiciones de estrés osmótico, salino y en respuesta a ABA. El clon PpABR100 es también inducido por bajas temperaturas (4°C) y su transcripto presenta cierta acumulación basal, características que no comparte con PpABR170. Se encontró similitud entre la proteína codificada por PpABR100 y una proteína localizada en las esporas verdes del helecho *Osmunda japonica* denominada “proteína cloroplástica de 22 kDa”. Esta última es rápidamente degradada cuando comienza la germinación de las esporas en esta planta (Inoue et al., 2000; Inoue et al., 2002).

El gen PpABR170 codifica para una lipasa de tipo GDSL con un dominio fasciclina en el extremo C-terminal. Las proteínas GDSL son lipasas que tienen un origen evolutivo distinto a las lipasas clásicas y una amplia distribución en toda la escala biológica (Akoh et al., 2004). Las lipasas de este tipo tienen 5 bloques conservados que contienen la triada Ser-Asp-His (Serina-Ácido aspártico-Histidina) y residuos oxianiónicos como Ser, Gly y Asn (Serina, Glicina y Asparagina). Entre sus características más relevantes se encuentran la presencia de un sitio activo flexible,

que permitiría reconocer a más de una molécula diana, por lo que serían proteínas multifuncionales (Derewenda, 1994). Las GDSL han sido vinculadas a la respuesta y tolerancia al estrés biótico (Hong et al., 2007; Oh et al., 2005) y abiótico (Hong et al., 2007; Naranjo et al., 2006; Hu et al., 2008). Un ejemplo es la proteína CaGLIP, una lipasa GDSL de *Capsicum annuum* que aumenta la tolerancia al estrés hídrico y altera la respuesta a ABA al ser sobreexpresada en *Arabidopsis* (Hong et al, 2007). Se han identificado también lipasas con función regulatoria, GLIP2, una lipasa GDSL de *Arabidopsis thaliana* juega un rol en la resistencia a patógenos suprimiendo la respuesta a auxinas (Lee et al, 2009).

El dominio fasciclina, presente en el extremo C-terminal de PpABR170, fue inicialmente descrito en *Drosophila melanogaster* (Patel et al., 1987) aunque se pueden encontrar fasciclinas en organismos que van desde las arqueas hasta los mamíferos (Skonier et al., 1992, Copeland, 2007). Existen antecedentes en *Arabidopsis* que muestran que mutantes de fasciclinas son más sensibles al estrés salino (Shi et al., 2003). En este trabajo la relación entre fasciclinas y estrés fue atribuida a que éstas proteínas mantienen la estructura del tejido radicular durante el estrés.

La soja como modelo de traqueofita.

A nivel molecular muchos de los genes involucrados en la respuesta al estrés abiótico no han sido perdidos durante la evolución de las plantas vasculares, sin embargo en éstas su expresión se restringe a los estadios reproductivos del ciclo de vida, lo cual no sucedió en la evolución de las briofitas (Cumming et al., 2007). Es decir, que si bien los mecanismos básicos de respuesta al estrés están conservados entre plantas vasculares y briofitas, existen vías de señalización y respuestas fisiológicas y moleculares diferentes (Kroemer et al., 2004).

En el caso de las plantas con semillas la resistencia al estrés suma factores no presentes en los musgos como por ejemplo la presencia de sistema vascular, las cutículas que impiden la transpiración y la posibilidad de obtener agua de zonas lejanas en el terreno por medio de las raíces.

En este caso se optó por estudiar la relación entre los genes de resistencia al estrés abiótico presentes en briofitas y aquellos presentes en plantas vasculares usando como modelo a la leguminosa *Glycine max* (soja).

La elección de la soja responde a varios factores, en primer lugar en contraposición a *Physcomitrella* la soja es un cultivo altamente sensible al estrés abiótico, principalmente al estrés hídrico y al estrés salino (Chang et al., 1994; Specht et al., 1999).

Por otra parte, dada su importancia a nivel agronómico, se cuenta con varias herramientas para su estudio a nivel fisiológico y molecular. Por ejemplo su genoma se encuentra secuenciado y disponible a partir del año 2009 (Schmutz et al., 2010), se cuenta con datos de estudios transcriptómicos en condiciones fisiológicas normales tanto como en estrés biótico y abiótico (Libault et al., 2010). Su cultivo *in vitro* y su transformación si bien son laboriosos han sido puestos a punto y estandarizados (Ko et al., 2006) y existen técnicas para transformación transiente que permiten observar fenotipos en raíces transgénicas (Cao et al., 2009).

Por otro lado, la soja representa un modelo muy interesante para el estudio de la evolución génica puesto que presenta características particulares en su genoma. Un hecho llamativo sobre el genoma de este organismo es la extensión en la que han sido retenidos los bloques de genes duplicados. El número de homólogos dentro de un bloque es de alrededor de 31 genes, pudiendo estos bloques presentar de 6 a 736 copias (Schmutz et al., 2010). Un mayor número de genes para la misma función implica una mayor complejidad, en este sentido la soja se presenta como un modelo ideal para estudiar la diversificación de las funciones génicas.

Otro de los motivos por los que esta leguminosa fue seleccionada para este trabajo es que se contaba en el laboratorio con un modelo para el estudio del estrés hídrico y de los genes relacionados en la respuesta. Este modelo consta de dos líneas cultivadas de soja que han sido descritas una como tolerante al estrés hídrico (N7001) y otra como susceptible (TJ2049) al mismo. Trabajos previos en el laboratorio se realizaron comparando a nivel transcriptómico estas dos líneas. Se obtuvo así una biblioteca de ESTs enriquecida en secuencias que se sobreexpresan diferencialmente en condiciones de estrés hídrico en plantas resistentes en dos tiempos luego de inducido el estrés. En un primer tiempo, denominado estrés temprano, no se observan cambios fisiológicos en la planta con excepción del cierre estomático. El segundo tiempo tomado fue denominado estrés tardío y en este estadio del estrés pueden observarse cambios fisiológicos, como por ejemplo la acumulación de solutos compatibles.

Estos estudios permitieron determinar alrededor de 800 genes que se sobreexpresarían en estrés hídrico en la línea N7001. Dentro de este grupo se encuentra una lipasa GDSL, es decir una proteína con un dominio lipasa similar al presente en el gen PpABR170 de *Physcomitrella*.

Objetivo general

Estudiar la función de proteínas previamente vinculadas a la respuesta al estrés abiótico en *Physcomitrella patens* y evaluar el patrón de expresión de genes homólogos en *Glycine max*.

Objetivos específicos

1. Estudio de la función de PpABR100 y PpABR170 en la respuesta al estrés abiótico en el musgo *Physcomitrella patens* mediante la producción y análisis de mutantes KO y líneas que sobreexpresan estos genes.
2. Búsqueda y aislamiento de genes homólogos a PpABR170 en soja.
3. Análisis de expresión de los genes identificados.

Materiales y métodos

Bioinformática

Los alineamientos entre secuencias nucleotídicas se realizaron mediante análisis de parsimonia utilizando el programa Bioedit (Hall, 1999). Los alineamientos entre más de dos genes o proteínas se realizaron usando el programa MEGA5 aligner (Tamura et al., 2011). El análisis filogenético de las lipasas GDSL y las fasciclinas de soja se realizó utilizando el método de máxima verosimilitud, el modelo de Jones-Taylor-Thornton (JTT), usando el programa MEGA5

Las búsquedas de secuencias se realizaron usando la aplicación BLAST (*nucleotide BLAST, Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990) tanto contra las secuencias presentes en la base de datos de la NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) como contra la base de datos de secuencias genómicas disponible en Phytozome (<http://www.phytozome.net>)

La presencia de péptidos señal fue predicha usando SignalIP 4.0 (Petersen et al., 2011; Bendtsen et al., 2004). La masa molecular de las proteínas fue predicha usando la herramienta Peptide Mass (Bjellqvist et al., 1993; Bjellqvist et al., 1994; Gasteiger et al., 2005).

La localización subcelular de PpABR100 fue predicha utilizando los programas Target Pv1.1 (Emanuelson et al., 2000), Chloro Pv1.1 (Emanuelson et al., 1999) y LocTree (Nair y Rost, 2005). La desorden intrínseco fue calculado usando los programas IUPred (Dosztányi et al., 2005; Dosztányi et al., 2005 (2)), Ucon (Schlessinger et al., 2007) y MD (Schlessinger et al., 2009) y la flexibilidad proteica fue predicha usando PROFbval (Schlessinger y Rost, 2005; Schlessinger et al., 2006). La hidrofobicidad de las proteínas fue calculada usando el método de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) con una ventana móvil de 7 aminoácidos.

Extracción de DNA genómico de *Physcomitrella patens* y *Glycine max*

Las extracciones de DNA genómico fueron realizados a partir de 100 mg de tejido vegetal. Las muestras fueron maceradas con nitrógeno líquido y el DNA genómico fue extraído con 750 µl de *buffer* de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoeanol) y 50 µl de 20% SDS. Los extractos fueron posteriormente incubados 15' a 65°C mezclando esporádicamente. Se agregaron 250 µl de 5 M KAc y se incubó 30' en hielo. Las muestras se centrifugaron 20' a 13000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 800 µl de alcohol isopropílico y se dejó precipitando 16 horas a -20°C. Se centrifugaron las muestras 15' a 13000 rpm para precipitar el DNA, el *pellet* fue lavado con 70% EtOH, secado y resuspendido en 225 µl de TE (10 Mm Tris- HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0) y 25 µl de NaCl 3 M y se incubó 30' a 37°C con 1 µl de RNasa (10 mg/ml). Se extrajo una vez con un volumen de fenol y dos veces con un volumen de cloroformo. Se precipitó el DNA con 0,8 volúmenes de alcohol isopropílico y se centrifugó 10' a 13000 rpm; se lavó el pellet dos veces con 70% EtOH y se resuspendió en 30 µl de H₂O ultradestilada estéril. Para visualizar la calidad del DNA extraído se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 0,8%.

Extracción de DNA plasmídico

Las extracciones de DNA plasmídico se realizaron a partir de 5 ml de cultivo líquido en medio LB (Luria Bertani). Las muestras fueron centrifugadas durante 30'' a 13000 rpm y el pellet bacteriano fue resuspendido en 300 µl de *buffer* P1 (50 mM tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg RNAsa (Amresco)). Se agregaron 300 µl de *buffer* de lisis P2 (200 mM NaOH; 1%SDS) y se incubó a temperatura ambiente durante 5'. Se agregaron 300 µl de *buffer* P3 (3,0 M KAc pH 5,5; ácido acético glacial 5 M) y se incubaron las muestras en hielo durante 5'. Posteriormente se centrifugó 10' a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante. El DNA plasmídico fue precipitado con 0,7 volúmenes de alcohol isopropílico, centrifugado a 13000 rpm durante 20', lavado 70% con EtOH y resuspendido en 40 µl de H₂O.

Extracción de RNA

Se extrajo RNA tanto de *Physcomitrella* como de soja por utilizando la misma técnica. Entre 0,5 y 2 gramos de tejidos fueron macerados en un mortero utilizando nitrógeno líquido. Inmediatamente se le agregó una mezcla de 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 fenol pH 4,3 (Sigma, St. Louis, USA). Luego de vortexear 3' se agregaron 3 ml de cloroformo y se mezcló vortexeando por 20''. Las muestras se centrifugaron en tubos de polipropileno de 50 ml a 5000 rpm por 20'

Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 2,5 volúmenes de EtOH 95% y 0,1 volúmenes de NaAc 3 M pH 5,2, tratado previamente con DEPC (dietilpirocarbonato), durante 3 horas a -20°C. Se recuperó el pellet de ácidos nucleicos mediante una centrifugación de 15' a 4°C y 8000 rpm en tubos de vidrio corex libres de nucleasas. Los ácidos nucleicos fueron resuspendidos en 0,8 ml de H₂O tratada con DEPC. Se agregaron 0,8 ml de LiCl 4 M tratado con DEPC y se dejó precipitando durante 16 horas a 0°C. Se precipitó a 12000 rpm y 4°C en tubos *ependorf* de 1,5 ml durante 20'. Se resuspendió en 200 µl de H₂O libre de nucleasas y se adicionaron 20µl de NaAc 3M pH 5,2 y 500 µl de 95% EtOH. Se precipitó por dos horas a -20°C y se recuperaron los ácidos nucleicos luego de una centrifugación de 20' a 4°C y 12000 rpm. El pellet fue lavado con EtOH 70% durante 5' a 4°C, secado al aire y resuspendido en H₂O ultradestilada libre de nucleasas y almacenado a -80°C hasta su uso.

Se midió la absorbancia de la solución de RNA a 260 nm y se calculó la concentración del mismo utilizando la siguiente fórmula.

$$[\text{RNA}] = 40 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{factor de dilución}.$$

La integridad del RNA fue evaluada mediante una corrida electroforética en gel de agarosa desnaturalizante.

Gel desnaturalizante para RNA

Se disolvieron 0,7 gramos de agarosa en 50,4 ml de H₂O, se agregaron 7 ml de MOPS 10X, se dejó enfriar y se agregaron 12,6 ml de formaldehído.

2,7 µl de cada muestra fueron desnaturalizados agregando 1,75 µl de formaldehído, 1 µl de MOPS 10X, 5 µl de formamida y calentando a 65°C por 10'.

Preparación del MOPS: Se disolvieron 41,85 g de ácido 4-morpholinopropanesulfónico (MOPS) y 6,80 g de acetato de sodio trihidratado (NaAc – 3H₂O) en 800 ml de H₂O tratada con DEPC. Se agregaron 20 ml de una solución de 0,5 M de EDTA pH 7,0 y se ajustó el volumen a 1 litro con H₂O.

Tratamiento con DNAsa

El RNA fue tratado con DNAsa libre de RNAsas de la marca Fermentas (USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se chequeó el tratamiento con DNAsas mediante un PCR sobre el RNA.

Vectores

Los vectores T utilizados fueron el vector *pGEM-T Easy* (Promega, WI, USA) y el vector *pCRII* (Invitrogen, Carlsbad, Ca)

Ambos vectores contienen genes que confieren resistencia a la ampicilina en procariontes.

Además se usó el vector *pUbiGate* (Anterola et al., 2009), este vector confiere resistencia a la ampicilina en bacterias y confiere resistencia a higromicina en plantas.

Se usaron además las construcciones génicas pUBW100KO y pUBW170KO para la obtención de mutantes KO. Estas construcciones confieren resistencia a la ampicilina en bacterias y contiene el gen *nptII* que confiere resistencia a la geneticina (G418) en plantas bajo la regulación de promotor pCaMV35S (proveniente del virus del mosaico del tabaco)

Construcciones

Las construcciones génicas realizadas utilizando endonucleasas de restricción se realizaron con enzimas de la marca Fermentas (USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, en el caso de las digestiones dobles se siguieron las recomendaciones de la página web del fabricante (www.enzimas.com/doubledigest). Los vectores fueron desfosforilados utilizando la enzima fastAP (*Fast Alkaline fosfatase*) (Fermentas, USA). Las ligaciones se realizaron con T4 DNA ligasa (Fermentas, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Retrotranscripción

Las retrotranscripciones se realizaron partiendo de 1 µg de RNA total, con oligodT como cebador y con el kit *SuperScript® III First-strand Synthesis System* (Invitrogen, Carlsbad, Ca) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se chequearon mediante PCR utilizando 1 µl diluido 1/10 del cDNA obtenido, con los cebadores para la amplificación de ELF1B (*Eukariotic elongation factor I-beta*) ELF1B-Fw y ELF1B-Rv que amplifican una región de 118 pares de bases en el cDNA y de 237 pares de bases en el genómico dado que contienen un intrón. El PCR se realizó en 25 µl totales, usando 1 µl 10 mM de cada oligonucleótido, 0,1 mM de cada desoxirribonucleótidos (dntp), 1 unidad de enzima Taq polimerasa (Fermentas, USA) y *buffer* de la marca y 1 mM de MgCl₂.

PCR en tiempo real

Para los estudios de PCR en tiempo real de soja se utilizó kit comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, Ca). Las reacciones se hicieron en un volumen de 10 µl utilizando 0,45 mM de cada oligonucleótido, y 3 µl de cDNA diluido 1/30. Luego de 10' a 95°C se hicieron 45 ciclos de 95°Cx15'', 60°Cx40''. Como normalizador se seleccionó el gen ELF1B y los oligonucleótidos fueron seleccionados de entre los propuestos por Jian y colaboradores (Jian et al., 2008). Para la cuantificación de la expresión de GLIP4 se usaron los cebadores GLIP4-Rv-INT 5' TCG AAC AAC ACG CCT TCT CTA CAA CCT C 3' y GLIP4-Fw-RT 5' GGG ACC TTC CAC AAT TGA AAG CTT TGT C 3'. Para la cuantificación de la expresión de GLIP16 los cebadores GLIP13-Fw 5' CCA AGA GCT CCC TGG ACT CAA ATT GGT G 3' y GLIP13-Rv-RT 5' CGC CAC TGA GGT CGA TTC AAA CCC ATA A 3' fueron usados.

Luego de haber comprobado que las eficiencias de los oligonucleótidos eran comparables se calculó la expresión relativa de GLIP4 y GLIP16 usando el método de $2^{-\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Clonado de la secuencia codificante de GLIP4, GLIP16 y FAS28

Los PCR para el clonado de las secuencias codificantes se hicieron a partir de cDNA de la línea de soja N7001, usando parte aérea para el caso de las GLIPs y raíces para el caso de FAS28. Se usó para las GLIPs 1 unidad de Long PCR Enzyme Mix (Fermentas, USA) y para FAS28 1 unidad de High Fidelity Enzyme Mix.

Los cebadores y ciclados usados fueron los siguientes:

Amplificación de GLIP4: GLIP4-Fw-KpnI 5' ACG GTA CCA TGA GTC CCG CAT GG 3', GLIP4-Rv-XhoI 5' AAC TCG AGG ATA ATC ATC ATC TAA AG 3', 94°C 5', 40 x (94°C 50'', 45°C 50'', 68°C 1,5'), 68°C 10'.

Amplificación de GLIP16: GLIP16-Fw-BamHI 5' CCG GAT CCA ATA ATG GAA CAA GGG C 3', GLIP16-Rv-XhoI 5' AGT AGC TCG AGG TTT ATT GTA AGA AT 3' 94°C 5', 35 x (94°C 25'', 46°C 30'', 68°C 1'10''), 68°C 10'.

Amplificación de FAS28: FAS28-Fw-KpnI 5' TTA TTG TGG TAC CAT CAT GGC T 3' FAS28-Rv-EcoRV 5' AAA AGA TAT CAA AAT TAC ATA AAG GTA G 94°C 7', 40 x (94°C 30'', 45°C 30'', 72°C 2'10''), 72°C 10'.

Las secuencias fueron clonadas en vectores t, secuenciadas y posteriormente transferidas al vector pENTR 1A usando los sitios de restricción presentes los cebadores.

Otras reacciones de PCR.

Chequeo de inserción de la construcción pUBW100KO en el genoma: para el extremo 5' se utilizaron los cebadores 5'100KO check-Fw 5' CAT ATG AGA CCC CTC CAG GTG GC 3' y AS camV 5' CTT TCT CTG TGT TCT TGA TGC AGT TAG 3', esperándose un amplicón de 1121 pb. El ciclado utilizado fue: 94°C 5', 40x (94°C 20'', 60°C 20'', 70°C 1,5'), 70°C 10'. En el caso del extremo 3' se utilizaron los oligonucleótidos SensenptII 5' CTA CCC GTG ATA TTG CTG AAG AGC 3' y 1003'check-Rv 5' GCA GAG ACA CCA GGT CGC TCA A 3'. Esperándose un producto de PCR 1293

pb. Estas reacciones se realizaron un 1 unidad de enzima Taq polimerasa de la marca Fermentas (USA).

Chequeo de inserción de la construcción pUbi100 en el genoma: cebadores 328 5' GTT GTC GAT GGC CTC CTG G 3' y 329 5' TCC GAG AGC TGC ATC AGG 3' ciclado: 94°C 30', 40x (94°C 40'', 56°C 20'', 70°C 3'10''), 70°C 10' El amplicón esperado es de 2673 pb. 380 5' ACT GCA CTT CAA ACA AGT GTG AC 3', 381 5' GAC AGC TCT GTT TGA GGT CG 3' ciclado: 94°C 3', 40x (94°C 40'', 58°C 20'', 70°C 3'), 70°C10' Amplifican 2259 pb. Se usó 1 unidad de Taq Polimerasa (Fermentas, USA) y 80 ng de DNA genómico en cada reacción

Amplificación de la construcción pUbi100 del genoma: La construcción pUbi100 se amplificó del genoma utilizando los oligonucleótidos 380 5' GAC AGC TCT GTT TGA GGT CG 3' y 381 5' CTT GTC GAT GGC CTC CTG G 3' complementarios a las zonas adyacentes a la inserción de la misma. El producto de PCR esperado para el caso de una inserción única es de 9703 pb. Para esto se usó el siguiente ciclado: 94°C 3', 10x (94°C 20'', 56°C 30'', 68°C 9'), 20x (94°C 20'', 56°C 30'', 68°C 9' (+ 5'' en cada ciclo)), 68°C 10'. En la mezcla de reacción inicial se utilizó 1 unidad de la mezcla enzimática Long PCR Enzyme mix (Fermentas, USA), a las 5 horas de reacción se agregó una unidad extra.

Chequeo de presencia de la construcción pUBW170 en el genoma: para observar la presencia del extremo 5' se utilizaron los cebadores F170GFP-KpnI 5' GAG GGT ACC ACG ATG GCG AAC 3' y ASCamV 5' CTT TCT CTG TGT TCT TGA TGC AGT TAG 3' que amplifican 972 pb. En el caso del extremo 3' se utilizaron los cebadores Sense nptII 5' CTA CCC GTG ATA TTG CTG AAG AGC 3' y R-KO.Xba 170 5' CAT CTA GAT AGG GAG TAC GCA CAA GTT 3' esperándose un producto de PCR de 1146 pb. En ambos casos se usó el siguiente programa: 94 °C 7', 40 x (94°C 40'', 55°C 40'', 70°C 1'20''), 70°C 10'. Se usó 1 unidad de Taq Polimerasa (Fermentas, USA) y 80 ng de DNA genómico en cada reacción

Chequeo de inserción de la construcción pUBW170KO en el genoma: para el extremo 5' se utilizaron los cebadores 1705'check-Fw 5' CGC AAG TAG TTC TGG TGG GAG GC 3' y AS camV 5' CTT TCT CTG TGT TCT TGA TGC AGT TAG 3', esperándose un amplicón de 1026 pb. El ciclado utilizado fue: 94 °C 5', 40 x (94°C 30'', 59°C 20'', 70°C 1'20''), 70°C 10'. En el caso del extremo 3' se utilizaron los oligonucleótidos SensenptII 5' CTA CCC GTG ATA TTG CTG AAG AGC 3' y 1703'check-Rv 5' CTT TAC CCC AAC CCA GAC ACT TCG 3' y el mismo ciclado, esperándose un producto de PCR de 1282 pb. Estas reacciones se realizaron un 1 unidad de enzima Taq polimerasa de la marca Fermentas (USA).

Northern blot

Se corrieron 15 µg de RNA total por muestra en un gel desnaturizante para RNA. Se transfirió con 20X SSC a una membrana Hidrobond N+ (Amersham, NJ, USA) por capilaridad.

Se marcaron 50 ng de sonda (cDNA) con 1,2 µl de P³² 3000 Ci/µl utilizando el kit de marcado *Ready Prime II* (GE) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se prehibridó la membrana por 2 horas a 68°C con 20 ml *buffer* de prehibridación (5x SSPE (0,9 M NaCl, 50 mM NaPO₄, 5 mM EDTA, pH 7,5), 0,2% SDS, 500 µg/ml ssDNA, 5x Denhardt (1 mg/ml *Ficoll* 400, 1 mg/ml *polyvinyl pyrrolidone*, 1 mg/ml BSA). Se agregó la sonda

desnaturalizada. Se hibridó durante 16 horas y se hicieron dos lavados de 20' cada uno con una solución de 5x SSC y 0,5% SDS seguido de dos lavados de 20' con 1X SSC y 0,5% SDS.

La membrana fue expuesta en el *Fuji Imager* FLA-3000 durante 3 días.

Material vegetal

La línea de tipo salvaje utilizada fue *Physcomitrella patens* vc. *patens* Grandsen 2004 (Bryan 1957, Reski 1994) (G2004). Esta misma línea fue utilizada para las transformaciones de protoplastos. Las plantas fueron crecidas *in vitro* a 22°C, 16 horas de luz (40 μmol fotones m⁻² seg⁻¹) y 8 horas de oscuridad sobre placas de medio BCD (Ashton and Cove, 1977) suplementadas con 1,6 g/l de Hoagland's (Sigma, St. Louis, USA) . Las concentraciones de antibiótico utilizadas en los casos correspondientes fueron de 40 mg/ml de G148 (Duchefa, Países Bajos) y 25 mg/ml de Higromicina (Duchefa, Países Bajos).

Los tratamientos con CdSO₄ y de ZnCl se realizaron rociando las plantas con una solución 100 mM de las sales. El resto de los compuestos (glucosa 75 mM y 150 mM, el D-manitol 200, 400 y 900 mM, el NaCl 150 mM y 500 mM, el metil violágeno 100 μM, ácido salicílico 1 mM) fueron agregados en el medio de crecimiento.

Para los tratamientos de exceso de luz las plantas fueron crecidas bajo una intensidad lumínica de 100 μmol fotones m⁻² seg⁻¹ con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 oscuridad

Las plantas se cultivaron en cámara de crecimiento con las siguientes condiciones: 800 μmol fotones m⁻² seg⁻¹ de intensidad lumínica (lámparas de halogenuro metálico y lámparas de vapor de sodio a alta presión), fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad), 30°C/20°C (día/noche) y humedad relativa 60-40%. Como dispositivos de crecimiento se usaron caños de PVC de 11 cm de diámetro por 30 cm de altura, cerrados en su extremo inferior con una malla metálica. El sustrato utilizado fue suelo mezclado con ¼ de arena, cubierto con perlita para disminuir evaporación. Como solución de riego se utilizó medio RP (Rigaud Puppo, 1975). Las muestras se tomaron en dos niveles de estrés, el inicial o temprano, que comienza cuando el sustrato presenta una capacidad de campo del 50% y el estrés final o tardío, donde el sustrato llega a una capacidad de campo del 25%. Las plantas se regaron diariamente hasta capacidad de campo, una vez alcanzado el estado vegetativo V5 incipiente, se dejaron de regar los tratamientos correspondientes a estrés, continuando el riego diario de los tratamientos control. Una vez alcanzado el nivel de estrés inicial y final, se recolectaron hojas y raíces y se almacenaron a -80°C.

Transformación de protoplastos de *Physcomitrella patens*

Para cada transformación se usaron dos placas de protonema con al menos tres pasajes realizados con el homogeneizador Ultraturrax t8 basic (IKA, Alemania) en potencia 4 y 7 días de antigüedad. El tejido vegetal fue digerido durante 16 horas en la oscuridad con una solución de 0,2% driselasa en 8% D-manitol.

Posteriormente los protoplastos pasados por un filtro de x mm y se disueltos en 8% D-manitol hasta un volumen total de 10 ml. Se centrifugaron a 80 g durante 5' y el pellet de protoplastos fue resuspendido en 10 ml de CaPW (8% manitol, 10 mM de CaCl₂·2H₂O. Se volvieron centrifugar a 80 g y se resuspendieron hasta un volumen total de 10 ml de CaPW.

Se tomó una alícuota de la solución de protoplastos y los mismos fueron contados en la cámara de Neubauer en el microscopio óptico.

El resto de los protoplastos fue centrifugado y fueron resuspendidos a una concentración de $1,6 \times 10^6$ protoplastos/ml en medio 3M (0,439 M D-manitol, 15 mM $MgCl_2$, 0,1% MES pH 5,6). Se mezclaron posteriormente 300 μ l de protoplastos con 20 μ g de DNA lineal y se agregaron 300 μ l de solución PEG (40% Polietilenglicol 8000, 0,439 M D-manitol, 100 mM $Ca(NO_3)_2$, 10 mM TrisHCl pH 8,0).

Estas mezclas fueron colocadas a 45°C durante 5' y posteriormente incubadas a temperatura ambiente por 10'. Se agregaron cantidades crecientes de CaPW (600 μ l, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml) a los protoplastos hasta llegar a un volumen final de 10 ml en aproximadamente 30'. Se centrifugaron 5' a 80 g y se resuspendieron en 0,3 ml de PRML (BDC + Hoagland's, 8% D-manitol, $CaCl_2$ 10 mM), se agregaron 2,5 ml de PRMT (medio BDC Hoagland's, 8% D-manitol, $CaCl_2$ 10 mM, 0,5% agar) a 45°C y se plaquearon 3 ml de la suspensión en placas de PRMB (BDC + Hoagland's, 8% D-manitol, $CaCl_2$ 10 mM, 1% agar) con celofán.

Actividad bacteriostática

Se transformó la construcción pCRGLIP4 y el vector pCRII cerrado (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) en células BL21.

Se inocularon 50 ml de medio LB/ampicilina 100 mg/ml con o sin IPTG 1 mM con 1 ml de cultivo saturado crecido ON. Se incubó 37°C con 220 rpm de agitación y se midió la absorbancia a 600 nm cada una hora hasta llegar a la fase logarítmica de crecimiento.

Medidas de clorofila

Para la evaluación del contenido de clorofila se maceraron entre 50 y 100 mg de tejido vegetal en 10 ml de acetona al 80%. La solución resultante fue filtrada utilizando papel de filtro tipo *whatman* de 80 gr/cm². Se midió la absorbancia de la solución a 645 y 663 nm.

La concentración de clorofila se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Chl a (mg/g)} = \frac{((12,7 \cdot A_{663}) - (2,6 \cdot A_{645}) \cdot 10)}{\text{mg de tejido}}$$

$$\text{Chl b (mg/g)} = \frac{((22,9 \cdot A_{645}) - (4,68 \cdot A_{663}) \cdot 10)}{\text{mg de tejido}}$$

Pérdida de electrolitos (Electrolite leakage)

Se tomaron 3 colonias y se colocaron en 8 ml de H₂O ultradestilada con cuidado de no dañarlas. Se las sometió a agitación lenta durante 15' y luego se retiraron las plantas y se midió la conductividad de la solución resultante con un microconductímetro. Se devolvieron las plantas a los tubos y se hirvieron durante 15', se vortexearon, se quitaron las plantas y se volvió a medir la conductividad de agua que las contenía. Este último valor se tomó como el 100% de los iones contenidos en la muestra y en función de este valor se calculó el porcentaje de iones de perdidos en la muestra inicial.

Resultados y discusión

Análisis funcional del gen PpABR100 de *Physcomitrella patens*

El gen PpABR100 (Pp1s517_11V6, Phypa_110695) fue identificado a partir de una biblioteca de respuesta a ABA en *Physcomitrella* (Carvalho, 2006). La secuencia codificante de este gen es de 837 pb y codifica para una proteína de 278 aa y un peso molecular aproximado de 27 kDa y un punto isoeléctrico de 8,98. PpABR100 no codifica para ningún dominio conservado conocido.

Estudios previos del patrón de expresión de este gen muestran una inducción con las hormonas ABA y SA y en respuesta al estrés osmótico y salino (Carvalho, 2006).

Análisis *in silico* de PpABR100

Se analizó la posible localización subcelular de PpABR100 utilizando varios algoritmos predictivos. En todos los casos el resultado de estas predicciones muestra que ésta sería una proteína de ubicación cloroplástica (tabla 1). Predicciones con targetP, le otorgan un 86% de probabilidad a esta localización con respecto a otras, usando ChloroP se pudo determinar que esta proteína contaría con un péptido de tránsito al cloroplasto de 60 aminoácidos. LOctree también le asigna localización cloroplástica con un índice de seguridad de siete en una escala del 1 al 10. Estas observaciones concuerdan con reportes para el homólogo más cercano descrito de PpABR100, que corresponde a una proteína cloroplástica del helecho *Osmunda japonica* que se localizaría en la membrana de los tilacoides (Inoue et al., 1995)

Tabla 1: Predicción de la localización subcelular de PpABR100. En la primera línea se observa la predicción de la localización según el programa targetP v1.1. Los valores corresponden a las probabilidades de cTP: presencia de péptido de tránsito al cloroplasto, mTP: presencia de péptido de transito mitocondrial, SP: presencia de péptido señal, RC: clase de fiabilidad, valor de 1 a 5 donde 1 representa la predicción más fuerte. En la segunda se observa el resultado de una búsqueda específica de péptidos de tránsito al cloroplasto realizado por el programa ChloroP, cTP-length: largo del péptido de tránsito al cloroplasto, CS-score: es el valor de la matriz MEME para supuesto sitio de clivaje. La predicción de LOctree concuerda con los otros resultados: Asigna una localización cloroplástica a la proteína con un índice de seguridad de 7 en un rango del 1 al 10.

	cTP	mTP	SP	Otra	Localización	RC	Ref.
TargetPv1.1	0,86	0,017	0,134	0,010	Cloroplástica	2	Emanuelsson et al. 2000
	Puntaje	cTP	CS-score	cTP-length			Ref.
ChloroPv1.1	0,584	Si	11,034	60			Emanuelsson et al., 1999
	Localización		Índice de seguridad				Ref.
LOctree	Cloroplástica		7				Nair y Rost, 2005

Si bien todos los algoritmos predictivos apuntan a que PpABR100 es una proteína cloroplástica esto deberá ser confirmado experimentalmente.

El homólogo más cercano de PpABR100 que ha sido descrito corresponde a una proteína que se expresa en esporas maduras del helecho *Osmunda japonica* (Inoue et al., 2000), esta proteína, denominada proteína de 22kDa, se localiza en la membrana interna de los tilacoides y se ha propuesto que su función sería la de la protección del fotosistema II durante el estrés

oxidativo (Inoue et al.2005). En este mismo trabajo se muestra la posible vinculación de esta proteína al grupo III de las proteínas LEA. Las proteínas LEA (Late Embriogenesis Abundant) son un grupo de proteínas altamente hidrofílicas que fueron identificadas inicialmente en las etapas tardías de la embriogénesis del algodón (Dure y Chlan 1981). Si bien no se ha podido probar fehacientemente, las evidencias apuntan a que las LEA cumplirían funciones estabilizadoras de proteínas. Homólogos de las proteínas LEA han sido descriptos no solo en plantas sino que en arqueas, eubacterias y otros eucariotas (Battaglia et al., 2008). Dada su presencia en organismos no vegetales la denominación de LEA no refleja el papel que se atribuye actualmente a las mismas (Hand et al., 2011). El rol de las mismas ya no solo está relacionado con las etapas tardías de la embriogénesis, sino con la respuesta al estrés abiótico en plantas y otros organismos (Furuki et al., 2011, Liu et al., 2011). PpABR100 presenta homología con una proteína putativa de la bacteria gran positiva *Gemella haemolysans* que tiene similitud con el grupo III de las proteínas LEA (figura 3).

PpABR100	129	DGLQNAGSTAKQAGSAAASNVEDVADA	AVKNARDNLN	KAKANFGDLMGK	NSK---	VK--	183
		D	+++A	A+	AAA	EDV DA	D + AK D+ + K VK
ATCC10379	26	DKVEDAKEVAEDVKDAAADKAEDVKDA	----	VEDKVEDAKEVAEDVKDEADKAEDVKDA			81
PpABR100	184	--GKISDASSTANQ----	AFQLGDASDVINEAKSNTTNVDDAKSALSGLGDKLTGS--				234
		K+ DA	A	A ++ DA +V + K +	V+DAK A+ G G		
ATCC1037	82	AEDKVEDAKEVAEDVKDAAADKVEDAKEVAEDVKDEADKVEDAKEAVEEEG--	FAGKLF				139
PpABR100	235	NNPGNVAANVKSKADDAVSD					254
		+ VA +V K A+DA+ D					
ATCC10379	140	SKVKEVAEDVKEAAEDAIED					159

Figura 3. Alineamiento entre PpABR100 y la proteína del tipo LEA de *G. haemolysans*. Entre ambas secuencias, en rojo, se representan con “+” los aminoácidos similares y con el símbolo del aa los idénticos.

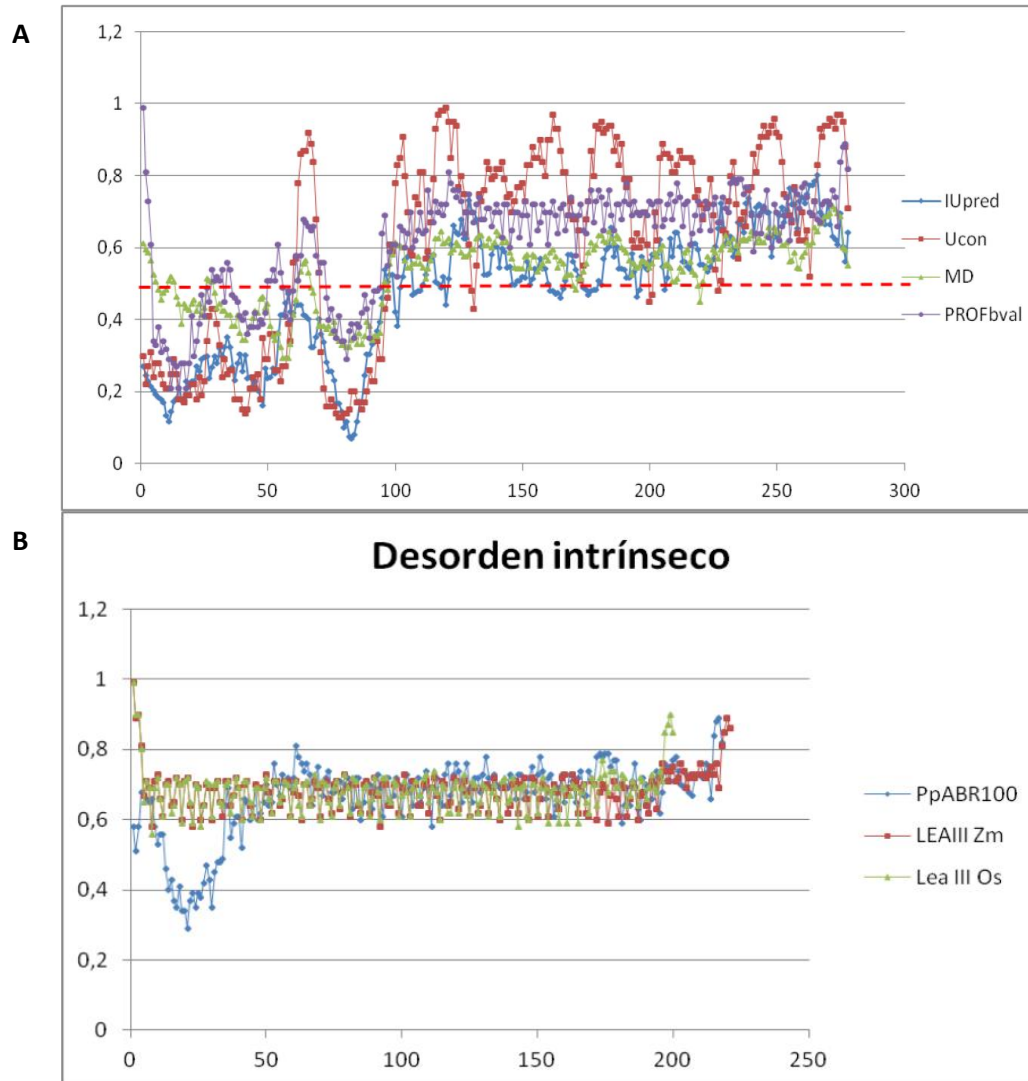
Basándose en esta observación se evaluaron algunos de los parámetros vinculados a la función de las LEA en PpABR100. Una de las características principales de estas proteínas es que no presentan una estructura terciaria definida, al contrario se destacan por ser proteínas intrínsecamente desordenadas. Se estudiaron utilizando distintas herramientas informáticas las propiedades de esta proteína relacionadas a la estructura y en todos los casos se evidenció que PpABR100 es una proteína intrínsecamente desordenada a partir del aminoácido número 100 (figura 4A), siendo que el péptido de tránsito al cloroplasto abarca los primeros 60 aminoácidos de esta proteína. El desorden intrínseco confiere varias características como ser la flexibilidad, la rapidez de interacción y la especificidad sin necesidad de interacciones moleculares muy fuertes. Estas características suelen favorecer las propiedades chaperonas de las proteínas LEA (Kovacs et al., 2008).

Se comparó el grado de desorden intrínseco presentado por PpABR100 con el de dos proteínas LEAIII de una longitud similar, una de *Zea mays* (NP_001105298.1) y otra *Oryza sativa* (ID: A2Y720.1). Para este análisis se eliminaron los primeros 60 aa de PpABR100 correspondientes al péptido de tránsito al cloroplasto. El nivel de desorden observado para estas proteínas fue similar indicando que PpABR100 se encontraría desestructurada en medio acuoso a un nivel similar que proteínas LEA del grupo III (figura 4B).

La mayoría de las LEA son proteínas hidrofílicas por lo que tienen una gran superficie en contacto con el medio acuoso. Se evaluó esta característica en PpABR100, en base a la hidrofobicidad de sus aminoácidos, utilizando el método de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle,

1982). Al igual que lo observado para el caso del desorden salvo los primeros 100 aminoácidos, el resto de la proteína muestra una hidrofobicidad menor a cero (figura 4C). Utilizando el algoritmo PROFphd que utiliza una serie de programas para predecir distintas características basándose en la estructura primaria de una proteína se predijo la accesibilidad de sus compuestos y se determinó que el 66% de sus aminoácidos tiene más del 16% de su superficie accesible.

Según algunos autores la función chaperona de las proteínas LEA estaría basada en la adquisición de una estructura más compacta en situaciones de estrés hídrico, siendo así capaz de interactuar con sus targets específicos (Battaglia et al., 2008).



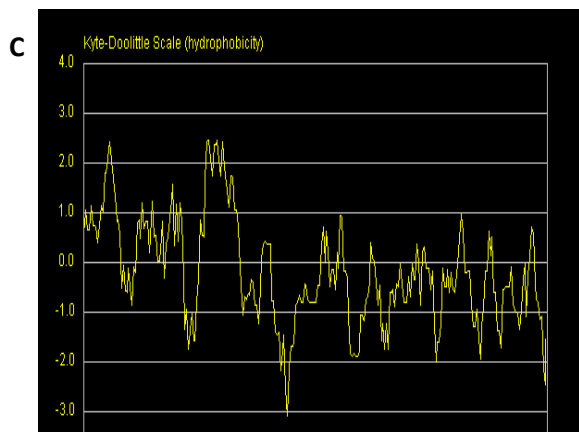


Figura 4: Predicción de las características fisicoquímicas de PpABR100. A partir del aminoácido 100 se observa un aumento en el desorden intrínseco, la accesibilidad de los aa y el grado de hidrofobicidad de la proteína A: predicción del desorden intrínseco y del grado de accesibilidad de los aminoácidos usando distintos programas: IUPred, Ucon, MD, PROFval. Proteínas con valores superiores a 0,5 se consideran desordenadas (Linding, 2002) B: comparación del grado de desorden intrínseco de PpAB100 con el de otras proteínas descritas como LEAIII. Todas las proteínas presentan niveles similares. C: predicción de la hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica de la proteína, gráfico utilizando una ventana de 7 aa.

PpABR100 carece del grupo de 11 residuos aminoacídicos característico del grupo III de las proteínas LEA, conformado por los siguientes aminoácidos: $\Phi\Phi\text{E}/\text{QX}\Phi\text{KE}/\text{QK}\Phi\text{XE}/\text{D}/\text{Q}$ en donde Φ representa un residuo hidrofóbico. PpABR100 tampoco presenta características que lo asignen a ninguno de los otros grupos de proteínas LEA. Sin embargo, existen varios estudios que asignan a las hidrofílinas no LEA funciones chaperonas similares (Lin y Thomashow, 1992, Goyal et al., 2005, Reyes et al., 2005). Las hidrofílinas, nombre con el que se conocen a las proteínas con un contenido de glicina mayor al 6% y una hidrofobicidad menor a 1, comprenden la mayor parte de las proteínas LEA y representan alrededor del 0,2% de los genomas (Battaglia et al. 2008). Se especula que las hidrofílinas cumplen funciones protectoras durante la deshidratación, mediante la prevención de la inactivación de otras proteínas en estas condiciones. Durante la agregación proteica producida durante la deshidratación, estas proteínas crearían un microambiente hidrofílico en las macromoléculas, ejerciendo de esta forma su actividad de chaperonas (Battaglia et al., 2008).

Esta serie de observaciones permite especular acerca de una posible función de PpABR100 como chaperona de proteínas cloroplásticas, que actuaría en condiciones de estrés manteniendo la integridad y la función de la maquinaria cloroplástica. El patrón de expresión de este gen, muy similar al reportado para las proteínas LEA durante el estrés (Dure et al., 1989; Chandler y Robertson, 1994; Ingram y Bartels, 1996; Campbell y Close, 1997; Thomashow, 1998; Bies-Ethève et al., 2008) es coincidente con la función que podría ejercer PpABR100 en condiciones de deshidratación celular, inducidas por estrés hídrico, frío, o estrés osmótico.

Obtención de mutantes para el estudio de la función de PpABR100

Con el objetivo de analizar la función de PpABR100 en la respuesta al estrés se obtuvieron mutantes nulos y líneas transgénicas con expresión constitutiva del mismo gen en *Physcomitrella patens*.

PpABR100 es un gen de copia única, una búsqueda de homólogos en el genoma por TBLASTN lo alinea con dos péptidos presentes en el grupo de ligamiento 251 de 159 y 89 aa. Las secuencias correspondientes a los mismos son Pp1s251_61V6 y Pp1s251_62V6 respectivamente. Por búsqueda en la base de datos de ESTs disponible en NCBI y de COSMOSS

(Lang et al., 2005) no se encontró evidencia de la expresión de ninguno de los transcritos de estos péptidos.

Esta observación es importante puesto que los efectos compensatorios de proteínas con funciones similares podrían enmascarar el fenotipo de un mutante KO.

Para generar mutantes nulos (KO) se utilizó la construcción pUBW100KO, generada previamente en mi trabajo de grado. La misma contiene un segmento de 785 pb correspondientes al extremo 5' de la secuencia genómica correspondiente a PpABR100 y uno de 466 pb del extremo 3' del cDNA del mismo flanqueando a un cassette de selección con el gen *nptII* que codifica para la transferasa de neomicina II y confiere resistencia a la geneticina (G418). Esta es una construcción de reemplazo alélico y por lo tanto dirige dos eventos de recombinación homóloga, uno por cada segmento de homología. La integración de esta secuencia en el locus blanco resulta en la interrupción del gen por inserción de la secuencia del cassette de selección, y por lo tanto en la producción de un mutante KO.

Para la producción de plantas de expresión constitutiva del gen codificante para PpABR100 se generó una construcción génica mediante la inserción de la secuencia codificante del gen bajo la regulación del promotor de ubiquitina del maíz. Para ello se utilizó la construcción pCE100 que contiene la secuencia codificante del PpABR100 clonada en el vector pENTR2B (Invitrogen). Se realizó una recombinación sitio específica entre el vector pCE100 con el vector pTubiGate (Anterola et al., 2009) utilizando el sistema de clonado Gateway. El vector pTubiGate contiene un gen letal flanqueado por sitios *AttR* que recombinan específicamente con los sitios *AttL* del vector pENTR2B en presencia una mezcla enzimática (Gateway) que contiene *Int* (*Integrase*), *IHF* (*Integration Host Factor*) y *Xis* (*Excisionase*), enzimas que catalizan la recombinación in vitro de entre sitios *attL* y sitios *attR*. Ésta es una reacción reversible que intercambia las secuencias presentes entre estos sitios. Utilizando este sistema se obtuvo la construcción pUbi100, que dirige la integración del gen quimérico, bajo la dirección del promotor de ubiquitina de maíz, al locus 108 del genoma de *Physcomitrella*. Este locus es ampliamente usado para la inserción dirigida de secuencias puesto que no presenta genes predichos y se ha demostrado que la recombinación homóloga en este sector tiene una alta probabilidad de ocurrencia (Schaefer y Zríd, 1997), probablemente por la estructura cromatínica del mismo. La construcción contiene además un cassette de selección positiva para el antibiótico higromicina.

Utilizando la técnica de transformación de protoplastos mediada por PEG (Cove et al., 2009) se obtuvieron siete líneas transformantes con la construcción pUBW100KO que fueron denominadas 100KOx (x del 1 al 7) y tres con la construcción pUbi100 (100SE1, 2 y 3).

Caracterización molecular de los transformantes

Se extrajo DNA genómico de las colonias resistentes a G418 o higromicina según la construcción utilizada y se amplificaron regiones que incluyen el sitio de unión entre la construcción y el genoma para confirmar que las secuencias hayan sido integradas por recombinación homóloga.

En el caso de los mutantes KO en dos de las 7 líneas resistentes al antibiótico se confirmó la inserción en el extremo 3' mediante la amplificación de una secuencia de 1293 pares de bases

que incluye el cassette de selección y parte de la secuencia río arriba en genoma en las líneas 100KO1 y 100KO7. Solo se confirmó la correcta inserción en el extremo 5' para la línea 100KO7 mediante la amplificación de una región de 1121 pb que comprende parte del cassette de selección y la secuencia río abajo al sitio de inserción (figuras 5).

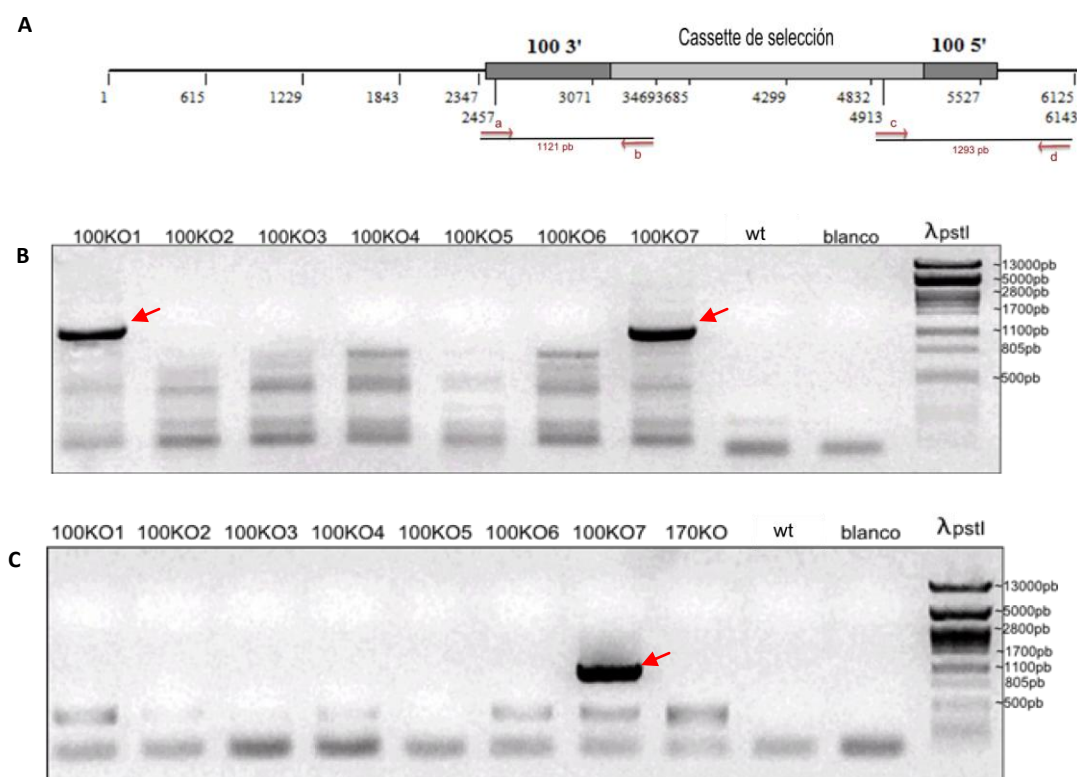


Figura 5: Caracterización molecular de mutantes nulos de PpABR100. A: Modelo de inserción de la construcción pUBW100KO en el genoma. Se observa la localización de los oligonucleótidos utilizados para confirmar la inserción y de fragmentos los amplificados esperados. Los pares a/b, y c/d amplifican el segmento resultante de la inserción por HR de los extremos 5' y 3' respectivamente. B y C: Fragmentos amplificados de los extremos 5' y 3' respectivamente para confirmar la inserción por recombinación homóloga de la construcción KO, el clon 100KO7 contiene ambos extremos recombinados de forma homóloga.

En el caso de los sobreexpresantes, las tres líneas insertaron la construcción por recombinación homóloga, lo que se pudo corroborar mediante la realización de dos PCR que reconoce secuencias del gen 108 fuera de la construcción y partes del promotor de ubiquitina para el extremo 5' y del cassette de selección de higromicina para el extremo 3'. En todos los casos se obtuvieron amplicones del tamaño esperado, 2259 pb para el extremo 5' y 2760 pb para el extremo 3' (figuras 6A, B y C).

Mediante la amplificación de los segmentos recombinantes 5' y 3' se puede asegurar que la inserción al genoma fue mediante recombinación homóloga. De manera previa a la inserción por recombinación homóloga los extremos de la construcción pueden ligarse entre sí determinando una inserción de secuencias en tándem (Kamisugui et al., 2006). Para evaluar si

las recombinaciones habían ocurrido con una copia única del constructo se amplificó toda la construcción usando oligonucleótidos que reconocen secuencias por fuera en el locus 108, en las regiones genómicas adyacentes (oligonucleótidos j y k), en las líneas sobreexpresantes. Solo fue posible obtener un amplicón del tamaño esperado para 100SE3, indicando que en el caso de 100SE1 y 100SE2 probablemente haya ocurrido la integración de más de una copia en tándem (figura 6D).

Para estudiar más precisamente el número y forma de integración de estas inserciones estudios de southern blot deberán ser realizados.

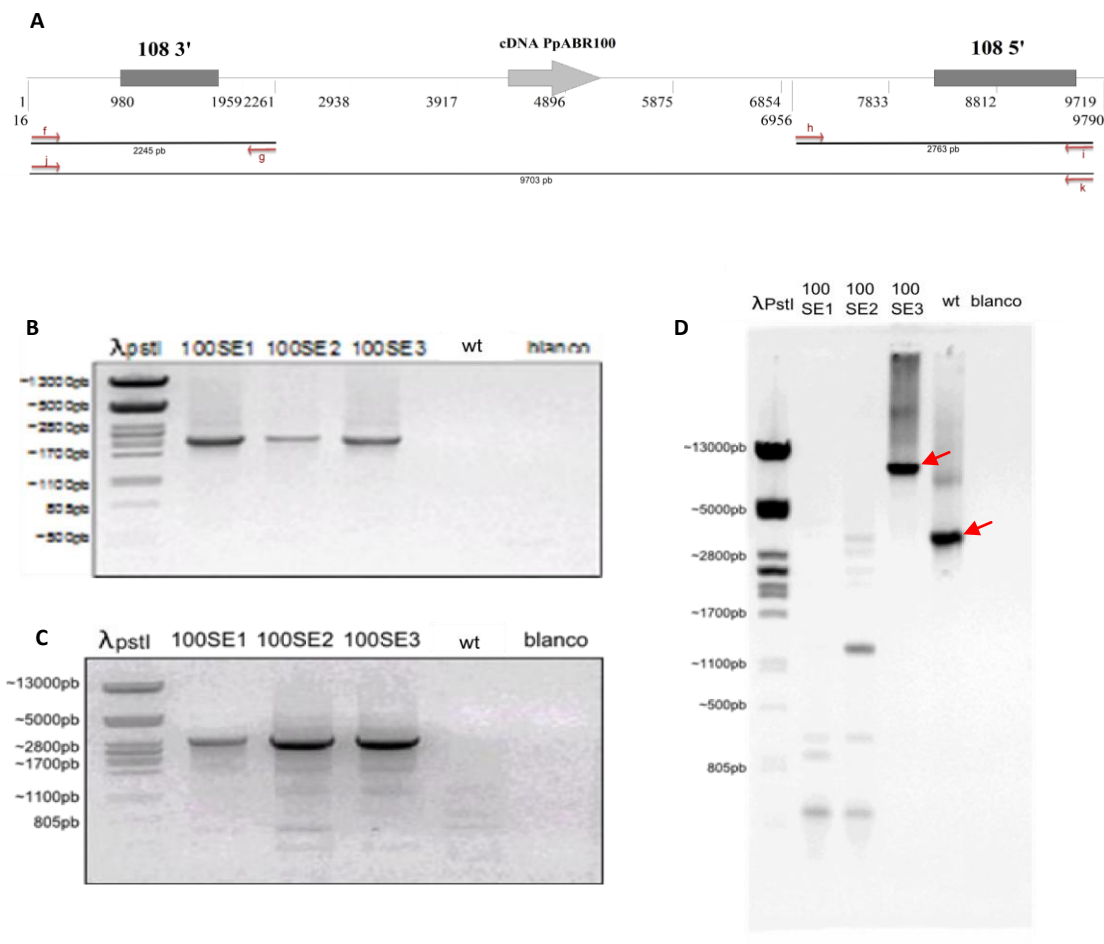


Figura 6: Caracterización molecular de sobreexpresantes de PpABR100. A: Modelo de inserción de la construcción pUbi100 en el genoma. Se observa la localización de los oligonucleótidos utilizados para confirmar la inserción y de fragmentos los amplificados esperados. Los oligonucleótidos marcados con las letras j y k amplifican toda la construcción de sobreexpresión desde fuera de la misma. La inserción correcta del extremo 5' se chequeó con los oligonucleótidos cuya localización está marcada con f y g en tanto que en el extremo 3' se usaron los oligonucleótidos marcados con h y i. B y C: Electroforesis en gel de agarosa para confirmar la inserción por recombinación homóloga de la construcción pUbi100 en los extremos 5' y 3' respectivamente. Se obtuvieron en las tres líneas amplicones de los tamaños esperados. D: Amplificación de la construcción de sobreexpresión completa. Solo fue posible amplificarla en el clon 100SE3, lo que sugiere que 100SE1 y 100SE2 tendrían más de una copia del constructo. El amplicón de la línea salvaje presenta el tamaño esperado de alrededor de 3000 pb.

Posteriormente se realizó un estudio de northern blot para determinar la expresión del gen en

las líneas mutantes. Para esto se sometió a las plantas a un tratamiento previo con ABA para inducir la expresión del gen. Se analizó la expresión del gen en las líneas 100KO7, 100SE1 y 100SE2 así como en la línea salvaje (G2004). En el caso del KO no se detectó expresión tanto en condiciones normales como de inducción del gen por tratamiento con ABA. La línea 100SE1 presentó alrededor de 10 veces más expresión en condiciones control y 4 veces más en condiciones inducidas que la línea wt, la línea 100SE2 presentó una expresión aún mayor (aproximadamente 20 veces más en control y 5 veces más con ABA), determinando así la posible presencia de un mayor número de copias de la construcción en el genoma, lo que coincide con las observaciones realizadas por PCR (figura 7).

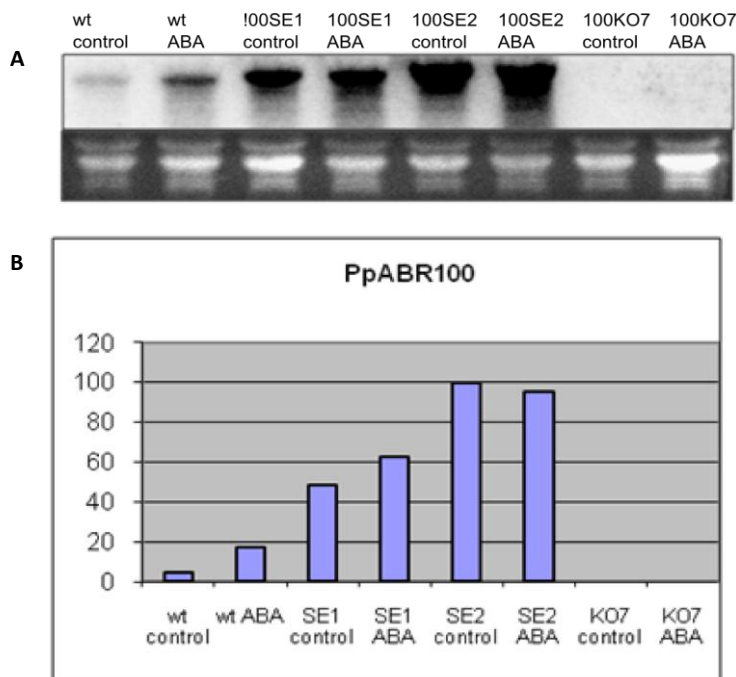


Figura 7: Expresión en mutantes de PpABR100H: A: Expresión del gen PpABR100, *northern blot* en condiciones de crecimiento normal y luego de una inducción del mismo durante 2 horas con ABA 10 μ M. B: Cuantificación aproximada de la expresión. 100SE2= 100%. No se detectó expresión en 100KO7 tanto en condiciones normales como de inducción del gen por tratamiento con ABA. La línea 100SE1 presentó 10 veces más expresión en condiciones control y 4 veces más en condiciones inducidas que la línea wt, la línea 100SE2 presentó una expresión aún mayor (20 veces más en control y 5 veces más con ABA)

Fenotipado de líneas mutantes del gen PpABR100

Una vez obtenidos los mutantes y habiendo caracterizado los mismos molecularmente se procedió a su caracterización fenotípica.

Basándose en la hipótesis de que PpABR100 podría participar en la respuesta de tolerancia al estrés y dadas las observaciones acerca de su patrón de expresión, se procedió al estudio de la respuesta de los mutantes ante condiciones de estrés abiótico.

PpABR100 y su relación con el estrés oxidativo

Dada la posible localización cloroplástica de esta proteína en principio se exploró la relación de esta proteína con el estrés oxidativo, induciendo estrés por la aplicación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y metil violágeno (*paraquat*), un compuesto que inhibe la fotosíntesis y genera superóxido intracelular mediante la captura de electrones del fotosistema I y su transferencia al oxígeno molecular (Summers, 1980).

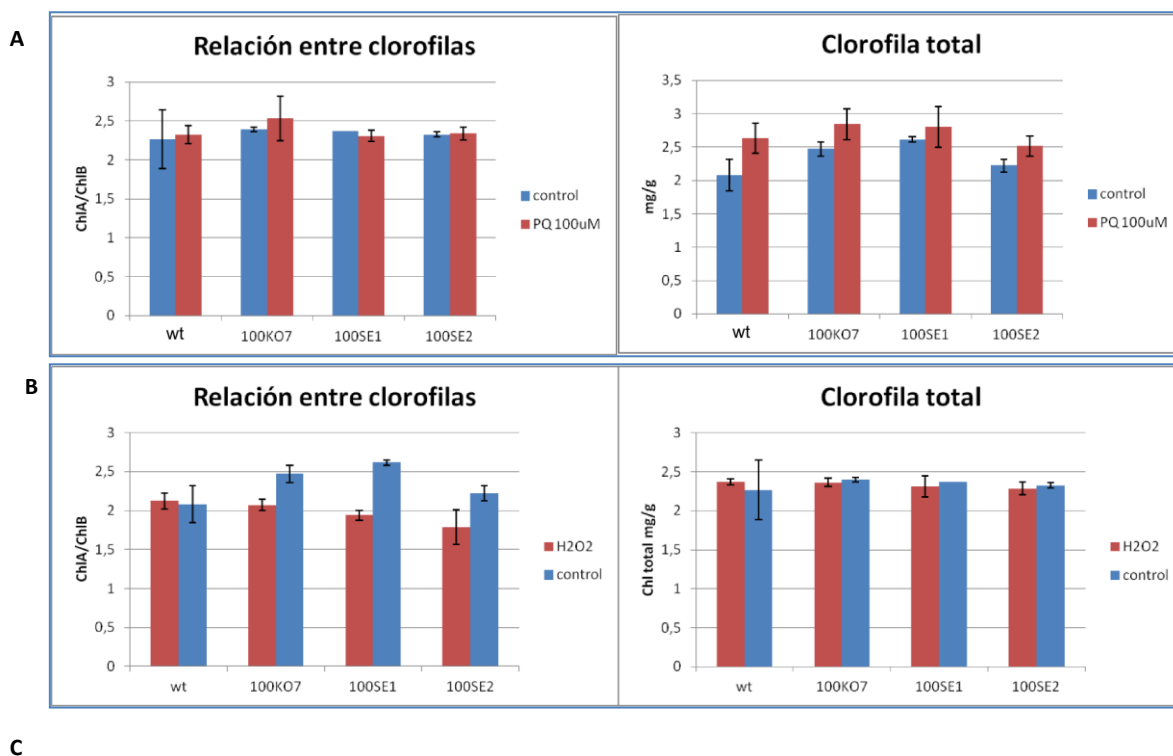
Tratamientos con H_2O_2 1 mM durante 15 días y con paraquat 100 μ M durante 12 días no produjeron ninguna diferencia observable en el patrón de crecimiento de plantas mutantes y

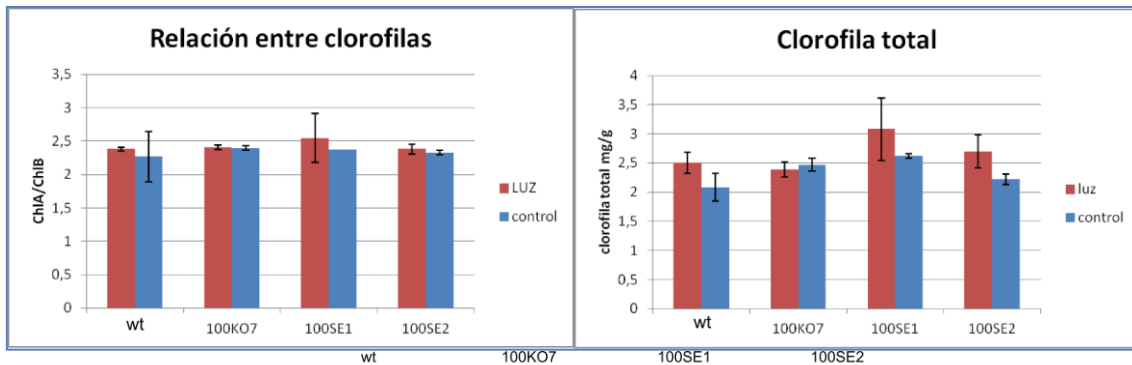
salvajes. Tampoco se observaron cambios en el contenido total de clorofila ni en las proporciones entre la clorofila A y la B (figuras 8A, C, D y F).

En el caso de los tratamientos con paraquat se cuantificó también la pérdida de electrolitos en las plantas control y en aquellas sometidas a estrés. Esta medida es indicativa del grado de integridad de las membranas de la célula mediante la medida del porcentaje de iones de la planta que se encuentran solubles en una condición determinada, utilizando para esto la medida de la conductividad de los iones que se desprenden de las mismas. En este caso tampoco fue posible observar diferencias significativas, generando el tratamiento una pérdida de electrolitos de alrededor del 25% (figura 8G).

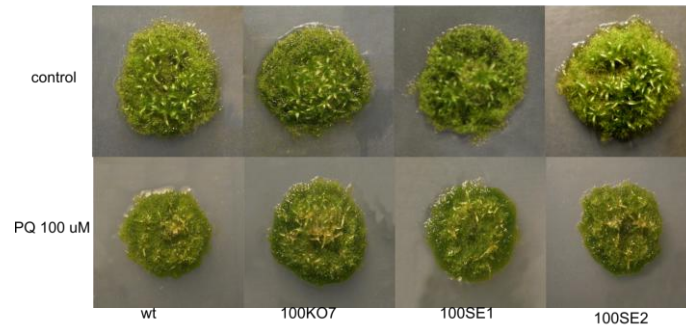
Para analizar desde otro punto de vista la integridad de la maquinaria fotosintética en condiciones de estrés oxidativo se estudió el crecimiento y el contenido de clorofila de plantas sometidas a una alta intensidad lumínica. En este caso tampoco se observó ninguna diferencia entre el fenotipo de las plantas salvajes y de las plantas mutantes. Sin embargo, la intensidad lumínica a las que las mismas se vieron expuestas, aproximadamente 4 veces superiores a las condiciones óptimas de crecimiento *in vitro*, no parece haber generado un grado de estrés significativo, puesto que tanto el contenido de clorofila como la relación entre las mismas y el patrón de crecimiento, fueron similares a los observados en condiciones control (figuras 8 B y E).

Para explorar la relación entre el gen PpABR100 y la respuesta a la luz de esta planta se deberían ensayar condiciones de luz más intensas.

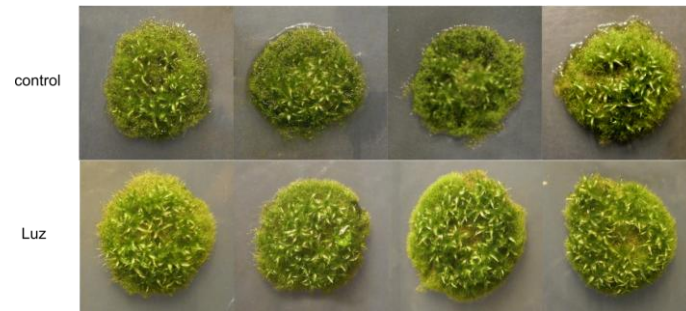




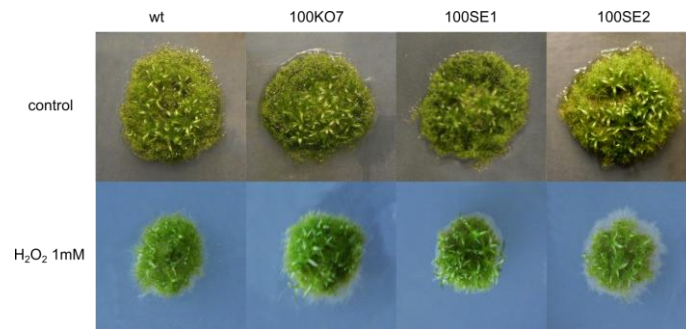
D



E



F



G

Pérdida de electrolitos

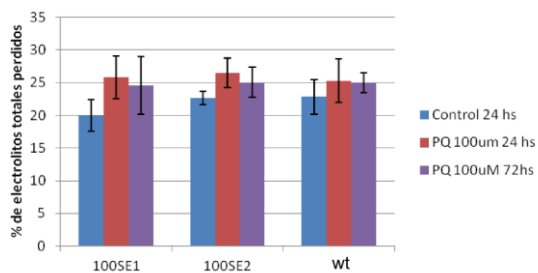


Figura 8: Respuesta de sobreexpresantes y KO del gen PpABR100 al estrés oxidativo. A, B y C: Cuantificación de clorofila total y relación clorofila A/B en plantas sometidas al estrés inducido por paraquat (100uM 12 días), exceso de luz (30 días) y H₂O₂ respectivamente (1mM 15 días), en ninguno de los casos las diferencias entre las líneas son significativas. D, E y F: Colonias de las líneas mutantes sometidas al estrés y comparación con sus distintos controles, no se observaron diferencias macroscópicas significativas. G: Pérdida de electrolitos de líneas sobreexpresantes luego de dos tiempo de la aplicación de paraquat. Las diferencias entre las líneas tampoco son significativas.

Contribución de PpABR100 a la respuesta al estrés osmótico en *Physcomitrella patens*

El estrés osmótico genera en la mayoría de las células vegetales una reducción del volumen de las mismas lo cual conlleva una alteración en la densidad de macromoléculas presentes en la misma. Este cambio en la densidad suele ser contrarrestado por la acumulación de solutos compatibles que aumentan el volumen celular y corrigen parte de los desvíos en la concentración de moléculas sin interferir en el metabolismo celular. También varias proteínas tienen función protectora de estas macromoléculas durante el estrés, siendo este rol uno de los que se les asigna a las hidrofílicas. Basándose en estas observaciones se estudió la respuesta de los mutantes de PpABR100 al estrés osmótico generado por la adición al medio de cultivo de manitol.

Se realizaron tratamientos de manitol a tres concentraciones diferentes (200, 400 y 900 mM) durante 15 días y se estudió la respuesta durante el estrés como también la recuperación del estrés severo de las plantas. Ninguna de las concentraciones de manitol provocó una reacción diferencial en las plantas observable a nivel macroscópico o a través del contenido de clorofila de las plantas tratadas (tabla 2).

Tabla 2. Significancia de las diferencias entre el contenido de clorofila de plantas mutantes y wt en estrés osmótico. En esta tabla se muestran los p-valores de las comparaciones entre los contenidos de clorofila entre la línea 100SE1 y 100KO7 en relación a la línea salvaje. En ninguno de los casos el p-valor resulta significativo (<0,05).

p-valor	200mM	400mM	900mM
wt vs 100SE2	0,1614	0,7387	0,7756
wt vs 100KO7	0,0558	0,7944	0,678

Efecto de PpABR100 en el patrón de crecimiento durante el estrés salino.

Dada las observaciones obtenidas para 100SE2 con manitol se decidió estudiar también la respuesta de las plantas mutantes al estrés salino inducido por cloruro de sodio (NaCl). El estrés salino está conformado por estrés iónico sumado al estrés osmótico. Particularmente el estrés salino inducido por NaCl, suma el efecto tóxico de las altas concentraciones de sodio.

Se aplicaron dos concentraciones distintas de NaCl (150 y 500 mM) durante 15 días y se estudió la recuperación de las plantas al estrés severo (500mM).

A nivel macroscópico se observó un fenotipo diferencial en las plantas KO con respecto al resto de las líneas. Las mismas se veían más translúcidas, y con un crecimiento más expandido (figura 9A y 9B). Estas diferencias no se vieron reflejadas en las medidas de clorofila total, tampoco se observó una proporción distinta de clorofila A y clorofila B. El fenotipo observado en las colonias sometidas a estrés salino leve no se ve reflejado en la concentración de clorofila. Probablemente el mismo responda a un crecimiento menos denso.

Las plantas expuestas a estrés de 500mM no mostraron ninguna diferencia tanto fenotípica como en el nivel de clorofilas, tampoco se observaron diferencias durante la recuperación de las mismas (figura 9B).

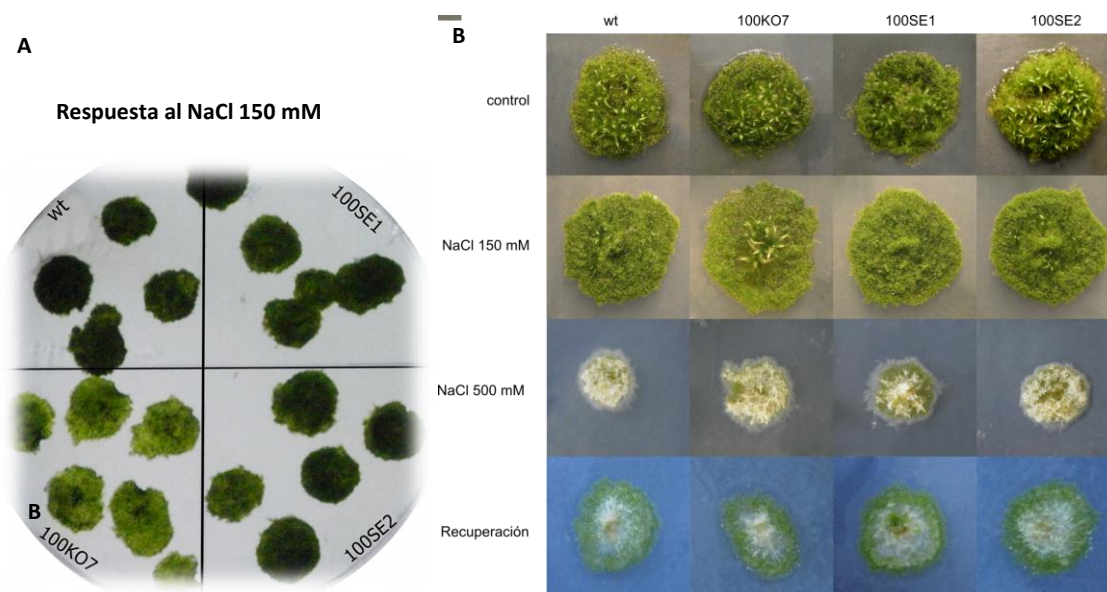


Figura 9: Respuesta de las líneas mutantes 100SE1, 100SE2 y 100KO7 al estrés inducido por cloruro de sodio. A: Colonias de *Physcomitrella* sometidas a 150mM de estrés salino. Se observa un crecimiento menos denso en la línea 100KO7. B: comparación macroscópica de los mutantes en la respuesta a estrés leve y severo (150 y 500 mM 15 días) y en la recuperación del mismo.

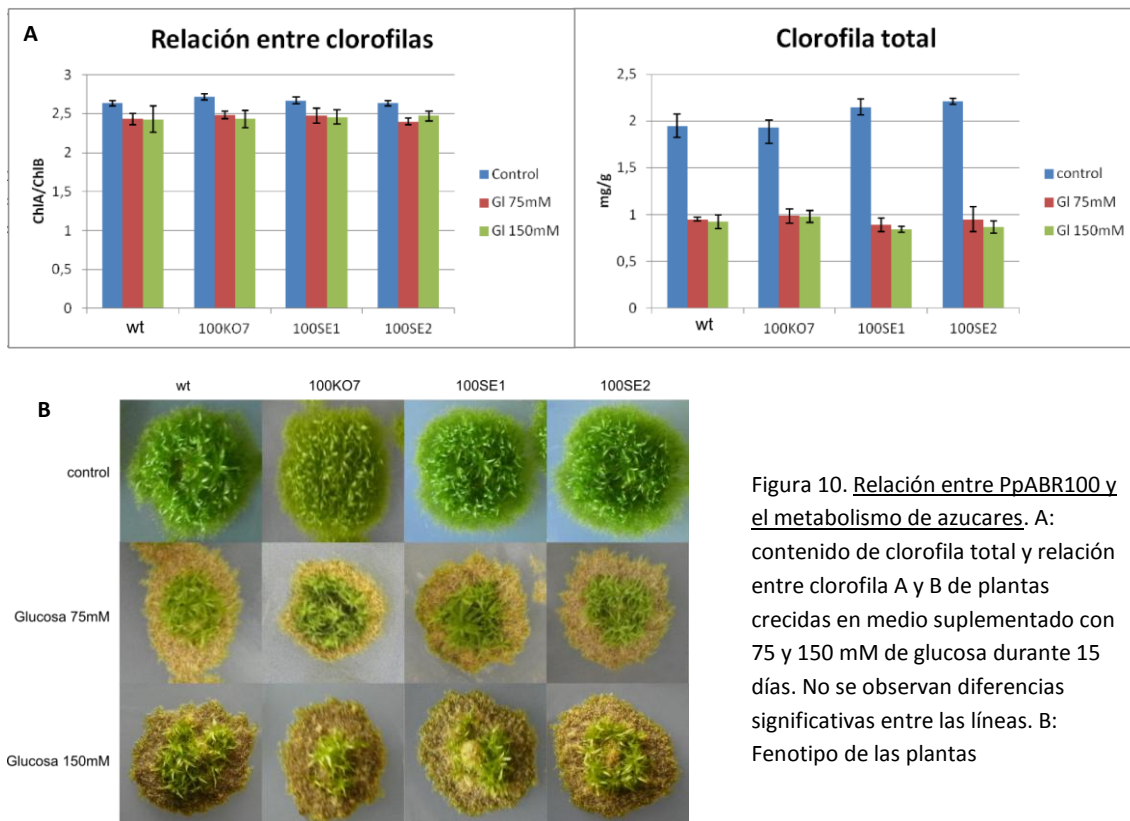
Para explicar el fenotipo observado y obtener un mejor acercamiento a la relevancia de PpABR100 en la respuesta al estrés salino leve se deberían medir otros pigmentos, además de hacer medidas de peso fresco y peso seco a distintos tiempos luego de aplicado el estrés y estudiar la naturaleza de las diferencias a nivel microscópico.

Glucosa

Por otro lado se cuantificó el efecto de la aplicación de glucosa en el medio de cultivo. La glucosa es el principal producto de la fijación de carbono a nivel del cloroplasto. Este proceso, esencial tanto para la vida de la célula como del individuo y de modo más general para la vida en la tierra, depende de manera directa de la maquinaria fotosintética, pues utiliza el ATP producido por la fotosíntesis para la fijación de carbono. El nivel de energía disponible, medido en los niveles de glucosa, tiene un efecto regulatorio de los procesos fotosintéticos por lo que ambos procesos están profundamente vinculados.

En este caso se midieron los niveles de clorofila de las plantas wt y las mutantes, para evaluar si esta regulación se ve afectada y por otro lado, si PpABR100 tiene alguna influencia en la vinculación de estos procesos.

Luego de la aplicación de 75 y 150 mM de glucosa durante 15 días no fue posible observar diferencias macroscópicas significativas y tampoco se observaron diferencias en la cantidad de clorofila total ni en la proporción entre clorofila A y B por lo que se supone que este gen no estaría cumpliendo ningún rol esencial en esta relación (figura 10).

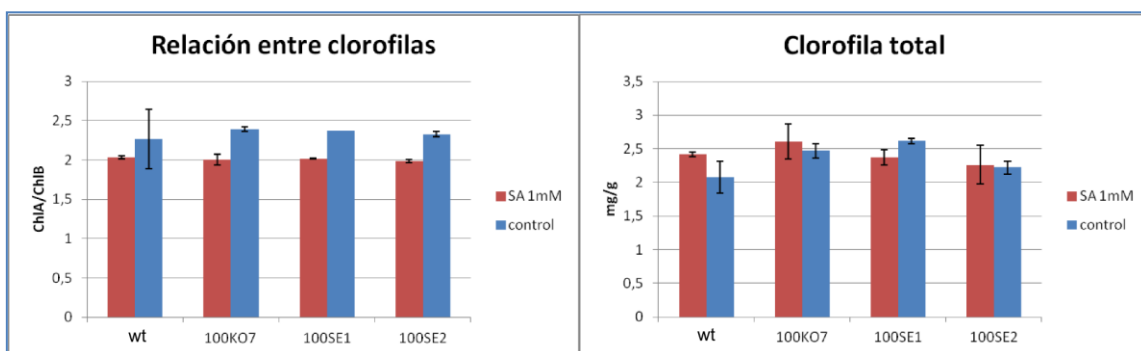


Respuesta de los mutantes a las hormonas ABA y SA

Se realizaron también tratamientos con hormonas, para analizar la relación de PpABR100 tanto con la señalización como con la respuesta a estos agentes. Para esto se seleccionaron dos hormonas, el ácido salicílico, basándose principalmente en los patrones de expresión de este gen en condiciones de estrés biótico, en cuya respuesta esta hormona está vinculada y el ácido abscísico, hormona que induce la expresión del gen PpABR100 de forma muy clara y además está vinculada en la respuesta a la mayoría de los tipos de estrés abiótico.

Las plantas se trataron con 1mM de ácidos salicílico durante 12 días y con 10 μ M de ABA durante 15 días. En ambos casos los niveles de clorofila A y B así como la apariencia de las plantas fueron similares entre las plantas mutantes y las salvajes (figura 11).

A



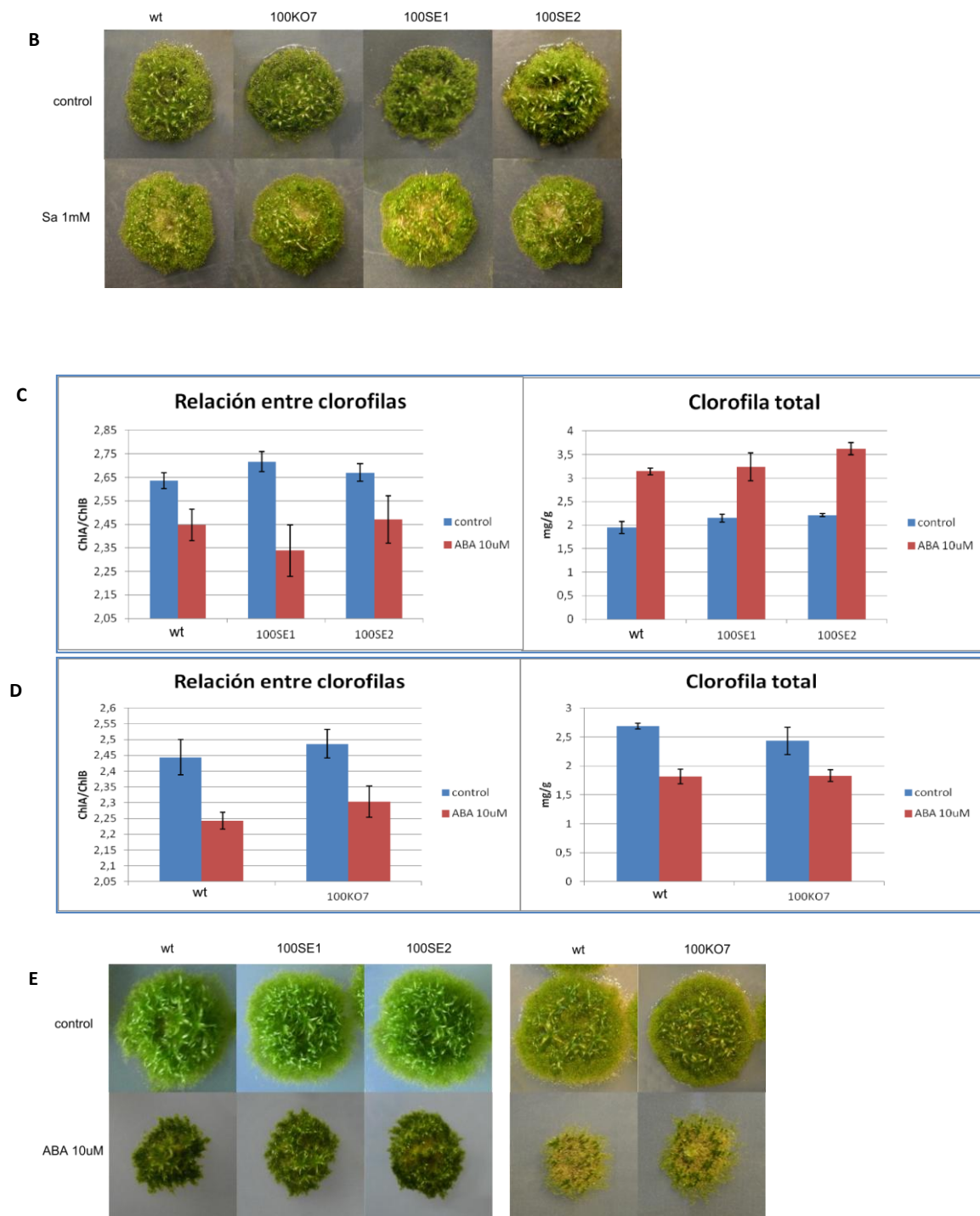


Figura 11. Respuesta al tratamiento con hormonas. A y B: Respuesta al tratamiento de ácido salicílico (1mM, 12 días). C, D y E: Respuesta al tratamiento con ácido abscísico (10 μ M, 15 días). En ninguno de los caso se observan diferencia significativas. En el tratamiento con ABA fue realizado de manera independiente para las líneas sobreexpresantes y KO por lo cual las imágenes se muestran con controles wt diferentes.

Respuesta al estrés por frío

Dado que PpABR100 presenta una leve inducción por temperaturas bajas se crecieron las plantas a 4°C para determinar si este gen cumple una función trascendente en el crecimiento

en estas condiciones. El contenido de clorofila de las plantas fue medido en distintos momentos hasta los dos meses de crecimiento en estas condiciones no siendo posible determinar un patrón claro en los contenidos de clorofila, que variaron su tendencia en los distintos experimentos. Posiblemente otros parámetros que no fue posible controlar, como la humedad, sean los responsables de estas variaciones. En ninguno de los casos se observaron diferencias fenotípicas entre las líneas (figura 12). Se midió también la pérdida de electrolitos, que permite inferir el grado de integridad de la membrana plásmatica, responsable de la mayoría de los desordenes provocados por el frío. Para este parámetro tampoco fue posible observar diferencias significativas.

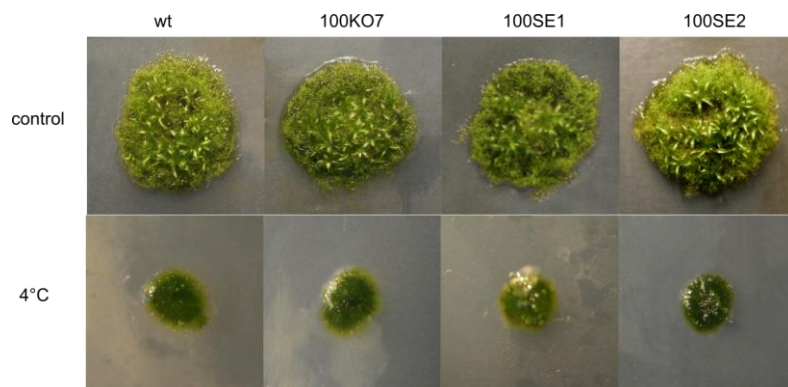
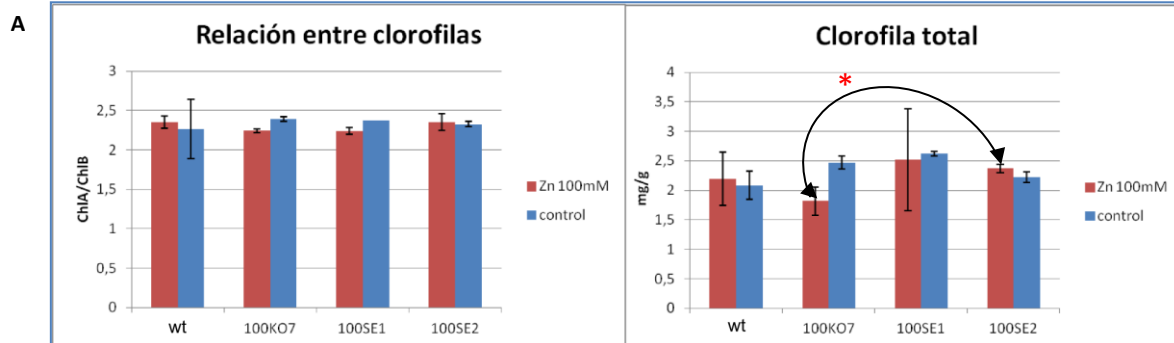


Figura 12. Respuesta de los mutantes de PpABR100 al estrés por bajas temperaturas: Fenotipo de las plantas crecidas a 4°C durante 30 días. No se observan diferencias entre líneas wt y transformantes

La sobreexpresión del gen PpABR100 favorecería la resistencia al estrés inducido por Cadmio

Teniendo en cuenta que cierta diferencia en el crecimiento fue observada en el mutante KO al ser expuesto a NaCl y que esta diferencia no parece estar relacionada con repuesta al estrés oxidativo ni al estrés osmótico, se evaluó la respuesta de las líneas mutantes de PpABR100 a otros compuestos tóxicos. La unión de proteínas del tipo hidrofiliina a metales puede estar relacionada con una función de detoxificación necesaria en situaciones de estrés, en donde la toxicidad de los metales está asociada a la producción de especies reactivas de oxígeno, comúnmente generadas en plantas expuestas a limitaciones hídricas (Hara et al., 2004). Por esto, estas proteínas pueden actuar como *scavengers* de radicales bajo estrés oxidativo.

Se evaluó en este caso la respuesta a dos sales de metales pesados, el cloruro de zinc (ZnCl) y el sulfato de cadmio (CdSO₄)



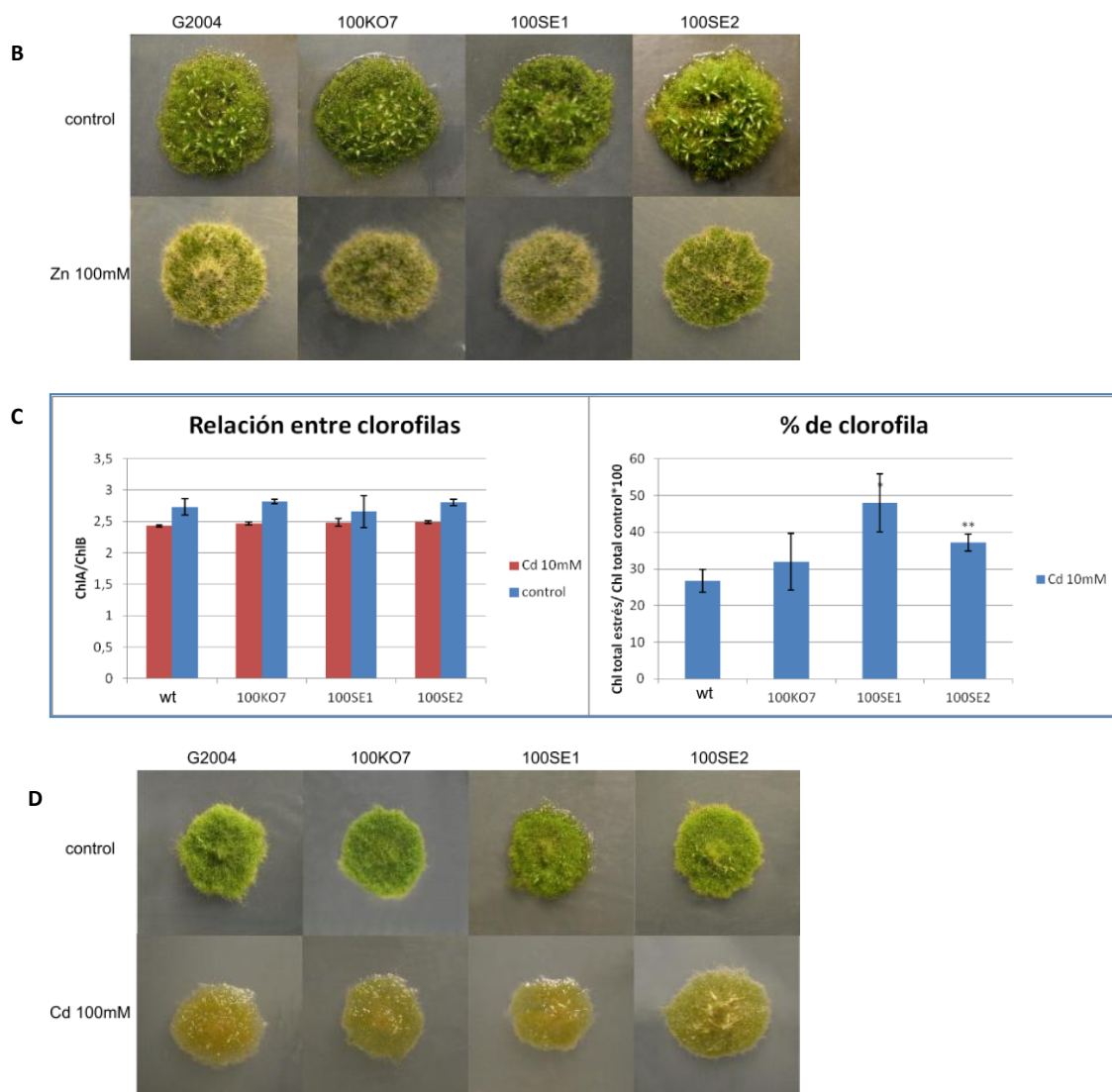


Figura 13: Respuesta de mutantes del gen PpABR100 al estrés inducido por metales pesados. A y B: Plantas tratadas con zinc. Los valores de concentración de clorofila y relación entre las mismas no presentan diferencias significativas entre las líneas. C: Contenido de clorofila de las plantas expuestas a estrés por cadmio. No se observan diferencias significativas en las proporciones de clorofila, si en el porcentaje de clorofila contenido en estrés. Las líneas 100SE1 y 100SE2 tienen un mayor contenido de clorofila total cuando son comparadas con el control. *= diferencias significativas (p-valor < 0,05), **= diferencias muy significativas (p-valor < 0,01). D: Fenotipo de las plantas expuestas al estrés por cadmio.

En el caso de los tratamientos con 100mM de ZnCl_2 durante 7 días no se observaron diferencias significativas en la respuesta de las diferentes líneas al comparalas con el fenotipo wt (figura 13 A y B). En general en todas las líneas evaluadas se observa una tendencia creciente de la cantidad de clorofila en relación al grado de expresión del gen PpABR100, sin embargo dada el alto grado de variabilidad del experimento esta diferencia solo es estadísticamente significativa al comparar las líneas 100KO7 y 100SE2 (p-v: 0,0184). En este caso la línea 100SE2 presenta 1,3 veces más clorofila que el mutante nulo.

También se observó una respuesta diferencial en los tratamiento con Cadmio (100mM, 3 días) en la cuales el contenido de clorofila fue mayor en ambas plantas sobreexpresantes que en la línea salvaje y la KO (figura 13C y 13 D). La relación entre clorofila A y B de las plantas tratadas se mantuvo constante en todas las líneas, levemente superior a la relación que presentan las

plantas no tratadas (figura 13C). Para la evaluación de estos datos se calculó el porcentaje de clorofila que presentan las líneas tratadas con respecto al presentado en sus respectivos controles. Las plantas salvajes presentaron un 26+/-3%, los KO un 32+/-8% en tanto que los sobreexpresantes presentaron un 48+/-8% y un 37+/- 2. Las diferencias entre el 100KO7 y la línea salvaje no son significativas ($p=0,3371$), en cambio en la comparación entre sobreexpresantes y la línea salvaje las diferencias muestran significancia estadística ($p=0,0122$ para 100SE1 y $p=0,0094$ para 100SE2).

La respuesta a cadmio en las plantas es muy compleja dada la variedad de procesos en los que interfiere este compuesto. El cadmio puede ser acumulado en todos los tejidos vegetales e interfiere en una larga lista de procesos biológicos de la planta, enlentece el crecimiento, causa clorosis, epistemia de hojas, altera la ultraestructura de los cloroplastos, inactiva enzimas de fijación de CO_2 , induce peroxidación lipídica y además perturba el metabolismo del nitrógeno y del azufre y la maquinaria antioxidante. El cadmio puede inhibir también varios grupos de enzimas como las del ciclo de Calvin, el metabolismo de los carbohidratos y del fósforo. El efecto del cadmio en la asimilación de nitrato ha sido estudiado en varias plantas mostrándose una inhibición de la toma de nitrato y de la actividad de las enzimas involucradas en la asimilación del mismo. Induce la generación de especies reactivas del oxígeno incluyendo el peróxido de hidrógeno, el radical superóxido y el radical hidroxilo.

Dada la diversidad de procesos involucrados, individualizar aquél o aquellos en los cuales el gen PpABR100 podría estar interviniendo se presenta como un desafío considerable. Sin embargo varios de los elementos involucrados en esta respuesta han sido estudiados de manera individual en este trabajo. Claramente no todos los procesos fueron abarcados, y los compuestos utilizados para inducir cada tipo de estrés presentan características distintas a las del cadmio. Sin embargo, puede descartarse que la mayor resistencia de los sobreexpresantes se deba a una mayor resistencia al estrés oxidativo o una respuesta diferencial del metabolismo de carbohidratos.

En cuanto a la respuesta diferencial a distintos compuestos tóxicos, la misma se puede atribuir a la modulación de los cambios en la conformación de las hidrofiliinas. Estos cambios conformacionales pueden llevar al reconocimiento de un grupo particular de dianas, por lo cual es predecible la presencia de fenotipos diferenciales en respuesta a distintos compuestos tóxicos incluso entre diferentes metales pesados.

Se podría afirmar que el rol en la resistencia al estrés de PpABR100 no se encuentra enmarcado en una respuesta global de la célula o de los tejidos puesto que el estrés oxidativo u otros procesos observados a nivel celular no parecen verse afectados por la presencia o ausencia de esta proteína. Tampoco parece verse afectada la recuperación del estrés severo. PpABR100 parece ejercer su efecto de una manera muy específica, en procesos relacionados con compuestos fitotóxicos (sodio, zinc y cadmio). Puesto que se plantea la posible localización cloroplástica de esta proteína su efecto probablemente se vea circunscripto a procesos a nivel del aparato fotosintético y no de toda la planta, como la protección específica de maquinaria fotosintética.

Tampoco puede descartarse que PpABR100 tenga actividad como quelante de metales y que la unión de PpABR100 a metales pueda aumentar la tolerancia al estrés por medio de una acción

detoxificadora directa. Para otras proteínas del grupo de las proteínas LEA se ha demostrado la capacidad de unirse a iones. Varias dehidrinas de *Arabidopsis* pueden ser purificadas mediante cromatografía de afinidad iónica, en particular con iones de cobre y níquel (Svensson et al., 2000). Se ha demostrado además la capacidad de proteína LEA del grupo de las dehidrinas de citrus de unir iones de cobre, hierro, cobalto, níquel y zinc (Hara et al., 2005).

El paso posterior para la caracterización de esta respuesta deberá ser probar diferentes concentraciones de este compuesto y añadir otras sales de cadmio y distintos metales pesados para profundizar en la caracterización funcional de esta proteína.

Asimismo, la localización subcelular de PpABR100 deberá ser analizada experimentalmente. Para esto se plantea estudiar la localización de la proteína PpABR100 fusionada a GFP (*Green Flourescent Protein*). El gen que codifica la proteína de fusión, ha sido clonando en el vector pENTR 2B, usando el sistema de recombinación Gateway el mismo podrá ser transferido a un vector binario que permitirá la expresión transitoria del mismo en protoplastos u hojas de tabaco, una metodología que ha sido puesto a punto en el laboratorio.

Análisis funcional de PpABR170 en *Physcomitrella patens*.

La secuencia codificante del gen PpABR170 (Pp1s51_28V6, Phypa_124664) de *Physcomitrella patens* es de 1557 pares de bases (pb) y codifica para una proteína deducida de 518 aa, con un peso molecular de 56 kDa y un punto isoelectrico 4,94. Esta proteína tiene dos dominios conservados, un dominio GDSL y un dominio fasciclina en el extremo C-terminal, además posee un péptido señal que dirigiría esta proteína a la vía exocitótica. Las proteínas GDSL son lipasas/esterasas que han sido vinculadas a varios procesos vegetales entre ellos la respuesta al estrés biótico y abiótico (Naranjo et al., 2006; Oh et al., 2005; Hong et al., 2007). Las fasciclinas son proteínas de adhesión celular que han sido relacionadas con el mantenimiento de la estructura de los tejidos durante el estrés salino entre otras funciones (Shi et al., 2003). Resultados previos indican que PpABR170 se induce frente al tratamiento con ABA, estrés salino y osmótico (Carvalho, 2006).

El genoma de *Physcomitrella* contiene una secuencia con alta homología al gen PpABR170 denominada Pp1s126_111v6. Este gen comparte con PpABR170 un 67,8% de identidad y 84% de similitud a nivel de secuencia aminoacídica (figura 14).

PpABR170	23	SVDAQRTTLLFAFGDSYADVGNNPKPSGPNVKGWVYPYGITWPNPAGRFSDBGKSTDW	82
		+V+ Q T+LLFAFGDSYADVGN K + W YPYGITWP + PAGRFSDBGK STDW	
Pp1s126_111v6		AVNVQATSLLLFAFGDSYADVGNTLKG---ISPAWRYPYGITWPLHDPAGRFSDBGKISTDW	201
PpABR170	83	IADlvglpvpppylySAGADTSSGVNFAVGGSCVTYGNQDVTLSQVDNFELFLRTDPY	142
		IADL+GLP+YPPPYLY+AG + S GVNFAVGG V + V+L QVDNFELFLRTDPY	
Pp1s126_111v6	202	IADLLGLPLYPPPYLYTAGENISYGVNFAVGGSGVFKVLSNVSLDVQVDNFELFLRTDPY	381
PpABR170	143	SKDALANSITFVSVVGNNDYLNFKGTTSV-----ELFVFIERVVAGIQANLQRLYDLGLR	196
		SK AL NS+T+VSV GNDYL F+GTT E ++IERV+ GIQANLQRLYDLGLR	
Pp1s126_111v6	382	SKAALNSVTYVSVGGNDYLAFRGTTEAVSLKPNERLLYIERVIRGIQANLQRLYDLGLR	561
PpABR170	197	NVMVANMFESDCLPIFTKKNGYTACTGETAPFVQIHNAFLLGAVRSINALNPGARFVVLD	256
		+VMVAN+ + DCLP+FT+KN +T CTGET P + IHN+FLL AV +INA NPGARF++LD	
Pp1s126_111v6	562	HVMVANIPQPDCLPLFTEKNWNTCTGETGPLINIHNFSLLVAVENINARNPGARFIILD	741
PpABR170	257	QFSAFNQLIATADEHGFTDGLKPCCTGTTNSTYCGDVDASGNWLYTVCKKRGRAIFWDDL	316
		+SAF++L++ ADE GFTDGLKPCCTGTTN+T CGDVDASG WLYTVCK RGRA+FWD	
Pp1s126_111v6	742	HYSAFSRLSEADEQGFTDGLKPCCTGTTNTKCGDVDASGKWLTVCKHRGRALFWDSE	921
PpABR170	317	HPTMWAHWHYIELFASQPNYVLLADAPTLRQWLQINDASQEPAAAPMPQP	366
		HPTMWAHWHY+I+L+ QPNY+LLA PTLR WLQ N+A+ EP AA M QP	
Pp1s126_111v6	922	HPTMWAHWHYIIDLYTKQPNYILLAGVPTLRDLWLQNNNAPEPTAALMSQP	1071

Figura 14: Alineamiento entre la proteína codificada por PpABR170 y su homólogo más cercano en el genoma Pp1s126_111v6. Las mismas presentan 69% de identidad (aminoácidos en rojo entre la secuencia) y el 80% de aminoácidos similares (indicados con signo +)

Con el objetivo de determinar la función de PpABR170, principalmente en la respuesta al estrés abiótico se utilizó una construcción génica para generar líneas con expresión nula del gen.

Para esto se utilizó la construcción pUBW170KO, obtenida como parte de mi tesis de grado, en la cual se clonaron 709 pb y 814 pb correspondientes a los extremos 5' y 3' de la secuencia genómica respectivamente flanqueando a un cassette de selección que codifica resistencia para G418. Esta construcción promueve la recombinación de los extremos de homología lográndose como consecuencia el reemplazo de las secuencias presentes entre los sitios de recombinación por el cassette de selección (figura 15).

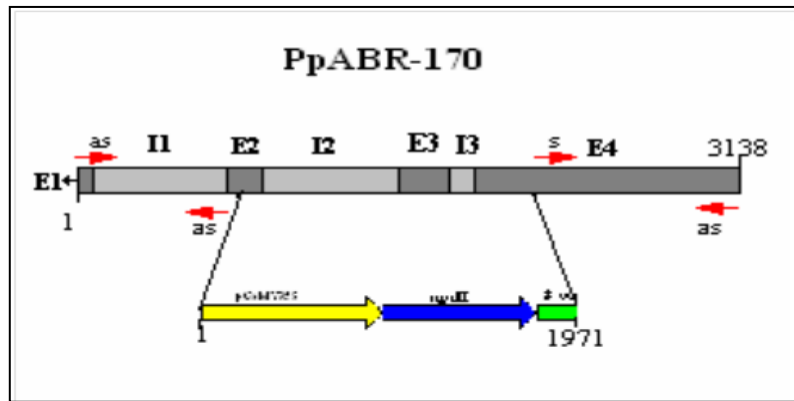
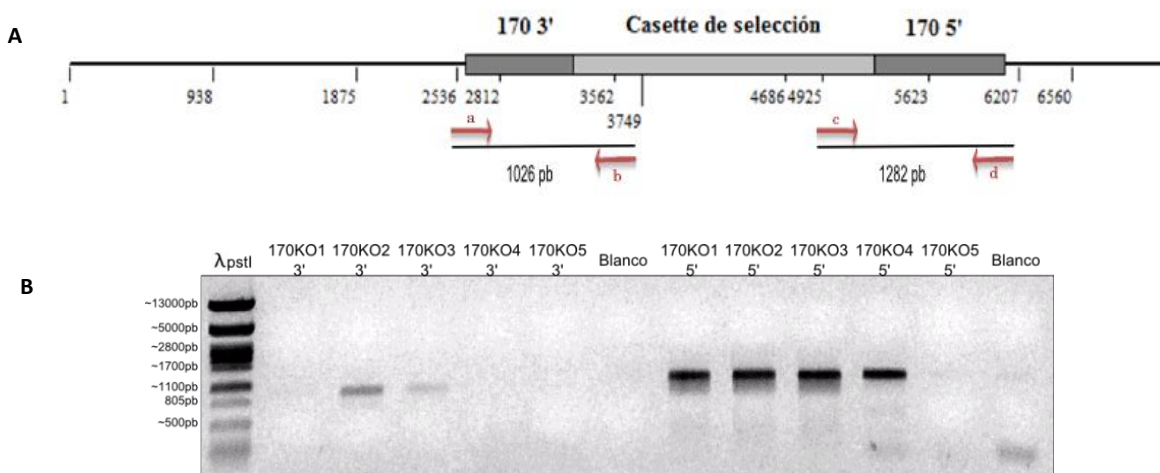


Figura 15: Modelo de inserción en el genoma de la construcción para el KO de PpABR170. Parte del exón 2, los intrones 2 y 3, el exón 3 y parte del exón 4 son reemplazados por el cassette de selección. En rojo se observa la localización de los cebadores sentido (s) y antisentido (as) que fueron utilizados para clonar los fragmentos de homología en el vector de reemplazo pUBW170KO.

En el caso de las plantas transformadas con la construcción pUBW170KO se obtuvieron 5 transformantes resistentes a G418 en la segunda selección. Se extrajo DNA genómico de los mismos y fue analizado mediante PCR, inicialmente utilizando oligonucleótidos que reconocen una zona dentro de la construcción para evidenciar la presencia del cassette de selección. Se usaron dos pares de cebadores para este propósito, un par que reconoce el extremo 5' del gen clonado en el vector PpABR170 y otro par que reconoce el extremo 3' de manera similar, se esperaban amplicones 972 pb para el extremo 5' y 1146 pb para el extremo 3'. Se confirmó la presencia del segmento 3' en cuatro de las líneas evaluadas y en dos la presencia del extremo 5' (figura 16B).

Cuando estas líneas fueron analizadas utilizando oligonucleótidos con homología con el genoma adyacente a la zona de la construcción y otro con homología en el cassette de manera de corroborar la correcta inserción de la construcción no se obtuvieron resultados positivos. Los amplicones de los tamaños esperados, 1026 y 1282 pb para el 5' y 3' respectivamente, no pudieron ser amplificados utilizando distintos protocolos de PCR (figuras 16A y 16B).



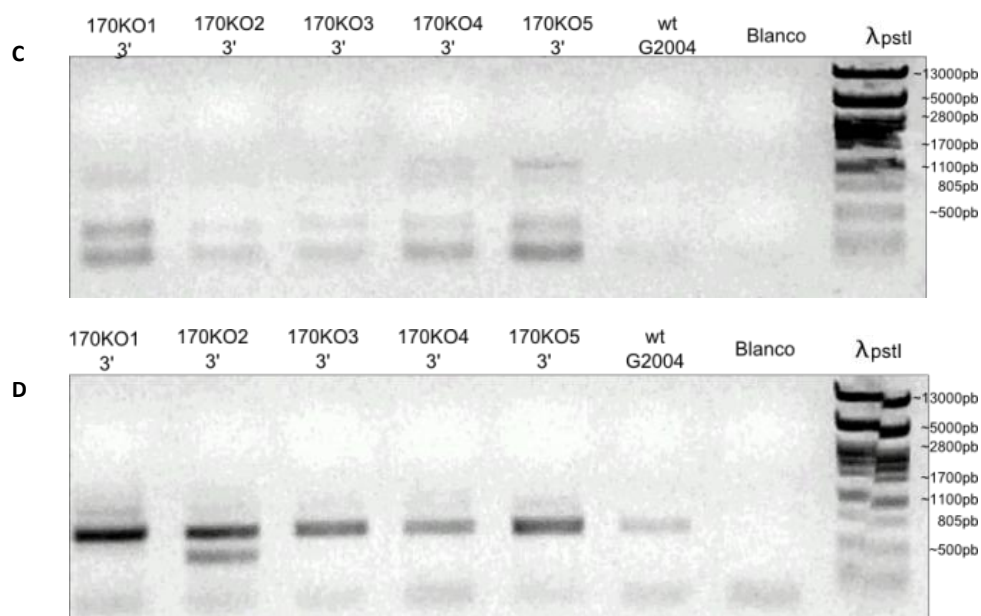


Figura 16: Análisis molecular de posibles KO del gen PpABR170. A: Modelo de inserción de la construcción pUBW170KO en el genoma de *Physcomitrella patens*. Se encuentra marcada la ubicación de los oligonucleótidos diseñados para confirmar el análisis de la correcta inserción en el genoma del extremo 5' (a y b) y del extremo 3' (c y d). B: PCR para evidenciar la presencia de la construcción en el genoma, para el extremo 5' de la misma son positivos el clon 2 y el clon 3 y para el extremo 3' los clones 1, 2, 3 y 4. C y D: PCRs para evidenciar la correcta inserción de la construcción pUBW170KO en el genoma. En ninguno de los casos se observó un producto del tamaño esperado (1026 pb para el extremo 3' y 1282 pb para el extremo 5').

Los eventos de transformación en la mayoría de los casos no resultan en una integración del DNA al genoma, en función de este fenómeno se realizan como mínimo dos rondas de selección, alternadas con una semana de crecimiento en medio no selectivo. De esta manera aquellos clones que no hayan integrado el DNA de manera estable en su genoma, lo perderían durante el crecimiento. En el caso de las líneas resistentes obtenidas a partir del vector pUBW170KO, luego de este proceso se siguió observando el mismo fenómeno. Al colocarse los clones que habían pasado por este proceso por tercera vez en antibiótico presentaron un mosaico en la resistencia, mostrando partes de cada colonia resistentes y partes susceptibles. Las zonas resistentes fueron seleccionadas y el proceso se repitió numerosas ocasiones observándose el mismo comportamiento hasta perderse por completo las zonas de resistencia.

Elementos que podrían explicar la dificultad para obtener mutantes KO de PpABR170

Los protocolos de transformación de protoplastos de *Physcomitrella* sugieren el empleo de dos rondas de selección en antibiótico para descartar las plantas que mantengan el DNA de la construcción de forma extra cromosómica. En este trabajo, las plantas transformadas con la construcción para la disrupción del gen PpABR170, sobrevivieron 3 rondas de selección y luego perdieron paulatinamente la capacidad de crecimiento en presencia del antibiótico de selección. Esto sugiere que los transformantes obtenidos no incorporaron el transgen en el genoma de forma estable.

Esto pudo haberse debido a problemas técnicos en este caso particular, o a que los mutantes obtenidos hayan sido seleccionados negativamente debido a la esencialidad del gen en los

procesos celulares que siguen a la transformación. La regeneración de protoplastos de *Physcomitrella* es un proceso fisiológicamente complejo, esto queda en evidencia por la sensibilidad del mismo a distintos factores ambientales como la cantidad y tipo de nutrientes y la concentración de protoplastos entre otros (Schween et al., 2003). Es lógico proponer que la ausencia de PpABR170 podría afectar la regeneración de tejidos a partir de protoplastos, principalmente dada la presencia del dominio fasciclina, vinculado mayormente a la adhesión celular, el pasaje a estado multicelular o incluso la regeneración de la pared celular puede ser dependiente de esta fasciclina que interactuaría con pectinas de la lámina media. Por otro lado varias lipasas GDSL de plantas vasculares han sido vinculadas al desarrollo vegetal (Yeats et al., 2010, Takahashi et al., 2010) visto esto, la regeneración de plantas a partir de protoplastos podría depender del dominio GDSL de esta proteína.

Estudios de expresión génica en células desdiferenciadas de *arabidopsis* demostraron que las mismas presentan características típicas de células experimentando estrés (Yadav et al., 2009). PpABR170 se induce fuertemente en condiciones de estrés, sugiriendo funcionalidad en los procesos de respuesta al mismo. Los protoplastos son células sometidas a estrés y por lo tanto es lógico proponer que mutantes del gen PpABR170 podrían estar afectando la sobrevivencia de los mismos.

Búsqueda y descripción de posibles homólogos de PpABR170 en *Glycine max*

Estudios evolutivos indican que las briofitas podrían formar un clado hermano de las traqueofitas por lo cual el análisis de organismos de estos clados ancestrales pueden resultar en contribuciones significativas al entendimiento del desarrollo (Cove et al., 1997), la fisiología (Reski et al., 1998), la filogenia (Mishler et al., 1994) y las respuestas celulares al estrés entre las plantas (Oliver et al., 1997)

En comparación con muchas otras plantas, *Physcomitrella* exhibe un alto grado de tolerancia al estrés abiótico (Frank et al., 2005, Saavedra et al., 2006), haciendo de esta una valiosa fuente para la identificación de genes relacionados con la adaptación al estrés.

Teniendo en cuenta estas observaciones se abordó la caracterización de genes con homología funcional a PpABR100 y PpABR170 en la leguminosa *Glycine max* (soja).

La elección de la soja como planta modelo responde a varios motivos. Por un lado la soja es la principal oleaginosa cultivada a nivel regional, es una gran fuente de aceite y proteínas y además se ha reportado que su consumo reduce el colesterol, previene el cáncer, la diabetes y la obesidad además de proteger contra la enfermedad de bowel y enfermedades de los riñones (Friedman y Brandon 2001).

Por otro lado se disponía de un sistema modelo consistente en una línea tolerante y una línea susceptible al estrés hídrico, uno de los tipos de estrés abiótico por los cuales el cultivo de soja frecuentemente se ve muy afectado. Esto sumado a la presencia del genoma secuenciado de este organismo (Schmutz et al., 2010) hacen de la soja un modelo de estudio muy interesante de las respuestas a estrés abiótico a nivel molecular.

Los musgos representan el clado más ancestral de plantas terrestres, separado por aproximadamente 450 millones de años de evolución de las plantas cultivadas, en consecuencia los musgos contienen metabolitos y genes que no son conocidos en las plantas con semilla. Este es el caso de PpABR100 cuyo gen codificante no presenta homólogos en plantas con semilla. Tampoco se han descrito en plantas vasculares genes que codifiquen dominios GDSL y fasciclina en la misma proteína, como es el caso de PpABR170. Existen sí proteínas con estos dominios de manera independiente.

Estudio de lipasas GDSL de soja

Con el objetivo de caracterizar posibles homólogos del gen PpABR170 en soja se realizó una búsqueda de los genes predichos en el genoma que contuvieran motivos tanto GDSL como fasciclina y se utilizaron estas secuencias para realizar estudios *in silico* de las mismas.

Inicialmente se confirmó que ninguno de los genes codificantes para GDSLs contiene dominios fasciclina. Se identificaron 194 genes en el genoma de soja que codifican proteínas con un dominio lipasa del tipo GDSL. Se asignó a cada lipasa el nombre de GLIPn (GDSL Lipase n; n entre 1 y 194). Se evaluó además la posible expresión de estas lipasas por medio de un BLAST de cada cds contra la base de EST de soja disponible en el NCBI (est_others/soybean) encontrándose evidencia de la expresión de 125 de ellos. Para cada uno de estos genes se seleccionó el EST con una mejor calificación en el alineamiento y para confirmar que fuera

específico de cada gen, se realizó una búsqueda del mismo en genoma de soja con el algoritmo blastn, esperando recuperar el mismo gen. El código de estas secuencias fue registrado, así como las condiciones en las que fue aislada en los casos en que las mismas estuvieran descritas (Anexo1).

Dentro de los genes con evidencia de expresión se encontraron 94 secuencias en las que no estaban descritas las condiciones en las que fue obtenido el EST. Seis presentes en condiciones de estrés abiótico, 6 en condiciones de estrés biótico, 6 con la hormona ácido salicílico y 11 en otras condiciones o tejidos específicos (tabla 3).

Tabla 3. Resumen de las lipasas GDSL encontradas en soja y de su patrón de expresión.

Resumen	
Genes predichos	194
Expresión	125
SA	11
Estrés biótico	6
Estrés abiótico	6

Utilizando este procedimiento se pudieron individualizar ciertos genes con aparente expresión diferencial en condiciones de estrés dada su sobrerrepresentación en estos contextos (tabla 4). Este es el caso de GLIP4 y, GLIP16 los cuales fueron tomados posteriormente para su estudio (tabla 4).

Tabla 4. Ejemplos de GLIPs de soja que presentan una clara inducción bajo condiciones de estrés.

GLIP4	<i>Phytophthora soyae</i> , <i>Fusarium solani</i> wvere, SDS disease.
GLIP5	Ácido salicílico, nemátodos, <i>Phakopsora pachyrhizi</i>
GLIP16	Estrés hídrico, Hojas senescentes, ácido salicílico.
GLIP17	Estrés hídrico

Todas las GLIPs de plantas cuya localización subcelular fue descrita hasta el momento son secretadas al exterior celular (Updegraff et al., 2009; Kram et al., 2008; Kim et al., 2008; Takahashi et al., 2010; Yamamoto y Momonoki, 2008; Yeats et al., 2010), y es esperable que todas las proteínas de este tipo tengan una localización similar. Para explorar esta propiedad se realizó una predicción de la presencia de péptido señal para todas las GLIPs predichas en soja. El péptido señal es una secuencia aminoacídica presente en el extremo N-terminal de la proteína que dirige a la misma hacia la vía exocitótica (retículo endoplásmico) siendo posteriormente clivado. El 68% de los genes codificantes de estas lipasas en soja contienen péptido señal predicho con una probabilidad mayor al 50% y aquellas que no lo contienen no poseen señal de localización para ningún otro organelo por lo que de expresarse podrían ser citoplasmáticas.

Se observó una alta concomitancia entre las proteínas que carecen de péptido señal y aquellas en las que no existe evidencia de expresión. Esta observación sugiere que estas secuencias

podrían representar pseudogenes, y que todas o la mayoría de las GDSL funcionales se localizarían en el espacio extracelular.

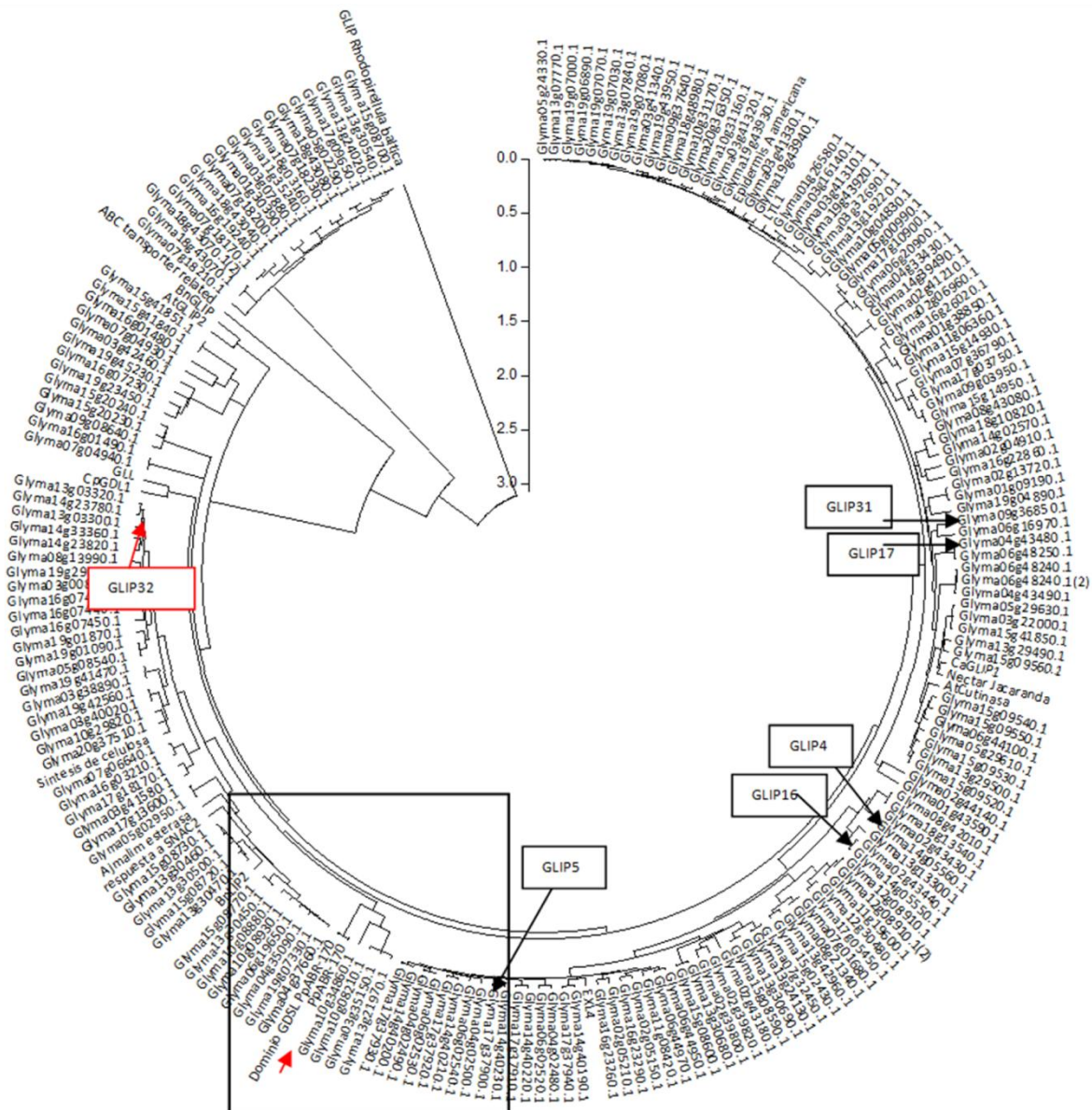
Posteriormente se realizó un análisis filogenético de estas lipasas. Se estima que más del 80 % de las angiospermas pudieron haber tenido un origen poliploide (Masterson 1994; Lockton and Gaut 2005; Adams and Wendel 2005). El genoma de soja ha pasado al menos dos rondas de duplicación en gran escala (Shoemaker et al. 1996), una hace 13 millones de años (myr) y otra hace 59 myr. Un análisis filogenético primario de las GDSLs identificadas en soja permitió individualizar ciertos grupos en los que las cuatro copias de los genes se habrían mantenido luego de las duplicaciones (figura 17A). Este es el caso de las lipasas de la familia que se encuentra en los cromosomas 14, 17, 6 y 4.

El primer análisis detallado acerca de regiones genómicas parálogas en soja involucraba regiones que contenían duplicaciones génicas de genes de HCBT (Schlueter et al., 2003). Nueve de los 10 genes presentes en esta región fueron retenidos luego de la duplicación. Todos los genes retenidos eran colineales tanto en orden como en orientación encontrándose diferencias en el número de duplicados en tándem que implican una expansión de una región por encima de la otra. Este tipo de fenómenos es observado también entre las GLIP de soja en donde se encontraron genes duplicados en tándemes de hasta 5 (por ejemplo Glyma15g09520, Glyma15g09530, Glyma15g09540, Glyma15g09550 y Glyma15g09560), cuyos homólogos se encuentran localizados en otros cromosomas (figura 17A).

Al análisis filogenético de las GLIPs de soja se incluyeron lipasas GDSL de otros organismos cuya función ya ha sido descripta. El estudio sugiere un origen evolutivo común de las lipasas, lo cual era esperable dado que estas proteínas no son exclusivas de las plantas. No se encontró ningún tipo de agrupación filogenética evidente entre genes con funciones similares lo que sugiere que estas funciones (por ejemplo señalización o protección durante el estrés) no están definidas en la secuencia primaria de las proteínas (figura 17A).

Los genes de soja con mayor homología a PpABR170 son GLIP32 (Glyma05g24330.1), GLIP94 (Glyma03g35150.1), GLIP95 (Glyma10g08210.1) y GLIP96 (Glyma13g21970.1) (49, 40, 38 y 40 % de identidad nucleotídica y 13, 11, 11 y 11 % de similitud proteica respectivamente). Se observó la presencia dentro de este grupo de dos genes involucrados en la respuesta a estrés, GLIP95, expresado en respuesta a la infección de *Phytophthora soyae* y GLIP96 expresada en las raíces de soja a las 48 horas de la exposición al estrés hídrico (Anexo 1, figura 17B). Estos genes podrían representar un interesante blanco para próximos estudios.

A



B

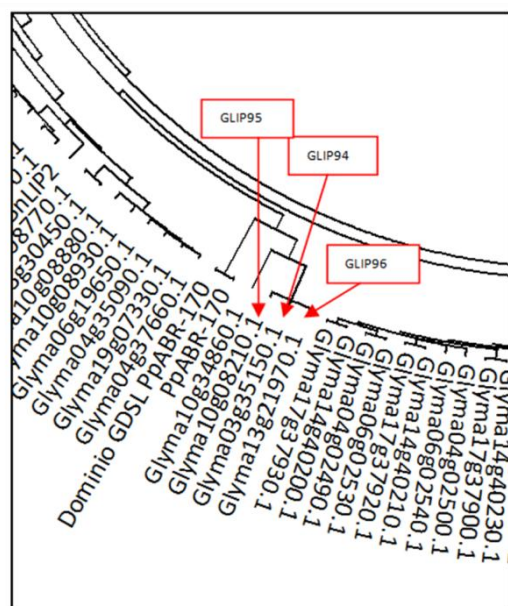


Figura 17: Análisis filogenético de las lipasas GDSL de soja. A: Relación filogenética entre las lipasas GDSL de soja y otras lipasas vegetales cuya función ya ha sido descrita. La comparación se realizó a nivel proteico y como grupo externo se utilizó una lipasa GDSL de la bacteria *Rhodospirillum rubrum*. Se sugiere un origen común de las GLIPs de plantas. Se observan eventos de duplicación en tándem aunque no se pudo observar una agrupación evidente entre genes con funciones similares. B: Ampliación de la zona de mayor homología con la lipasa pPABR170, entre las secuencias más similares se encuentran GLIP95 expresado en respuesta a la infección de *Phytophthora soyae* y GLIP96 expresado en las raíces de soja a las 48 horas de la exposición al estrés hídrico.

Estudio de la expresión de GLIP4 y GLIP16

Se seleccionaron genes cuya expresión estaría que tuvieran una mayor cantidad de registros de expresión en condiciones de estrés que en condiciones control para realizar estudios de expresión génica. Los mismos son GLIP4, cuyos transcriptos se encontraron mayormente en condiciones de estrés biótico en soja como ser enfermedad de SDS (*Sudden death syndrome*) (Shoemaker et al., 1999), infección con *Phytophthora soyae* y con *Fusarium solani* *var.* *solani*. GLIP5, se encontró expresado casi exclusivamente en respuesta al ácido salicílico, GLIP16 que además de estar presente en la biblioteca de SSH de respuesta al estrés hídrico realizada en el laboratorio tiene reportes previos de expresión en sequía. GLIP17, expresado casi exclusivamente en estrés hídrico y GLIP31 expresado durante la simbiosis de soja con *Bradyrhizobium japonicum*.

En principio se clonó un segmento de estos genes y se secuenció para confirmar su identidad. Para eso se utilizó una mezcla de RNAs extraídos en condiciones normales y condiciones de estrés hídrico en dos niveles de estrés, el inicial o temprano, que comienza cuando el sustrato donde crecen las plantas presentó una capacidad de campo del 50% y el estrés final o tardío, donde el sustrato llegó a una capacidad de campo del 25%. Durante el estrés temprano la planta percibe el estrés lo que se evidencia por el cierre estomático pero aún no presenta cambios fisiológicos. Durante el estrés tardío se observan varias respuestas fisiológicas significativas como la acumulación de osmolitos compatibles. Se usaron muestras de dos cultivares disponibles, N7001 caracterizado como tolerante al estrés hídrico y TJ2049 caracterizado como susceptible. Se clonaron fragmentos de transcriptos GLIP4, GLIP5, GLIP16 y GLIP31 en vectores T y se secuenciaron.

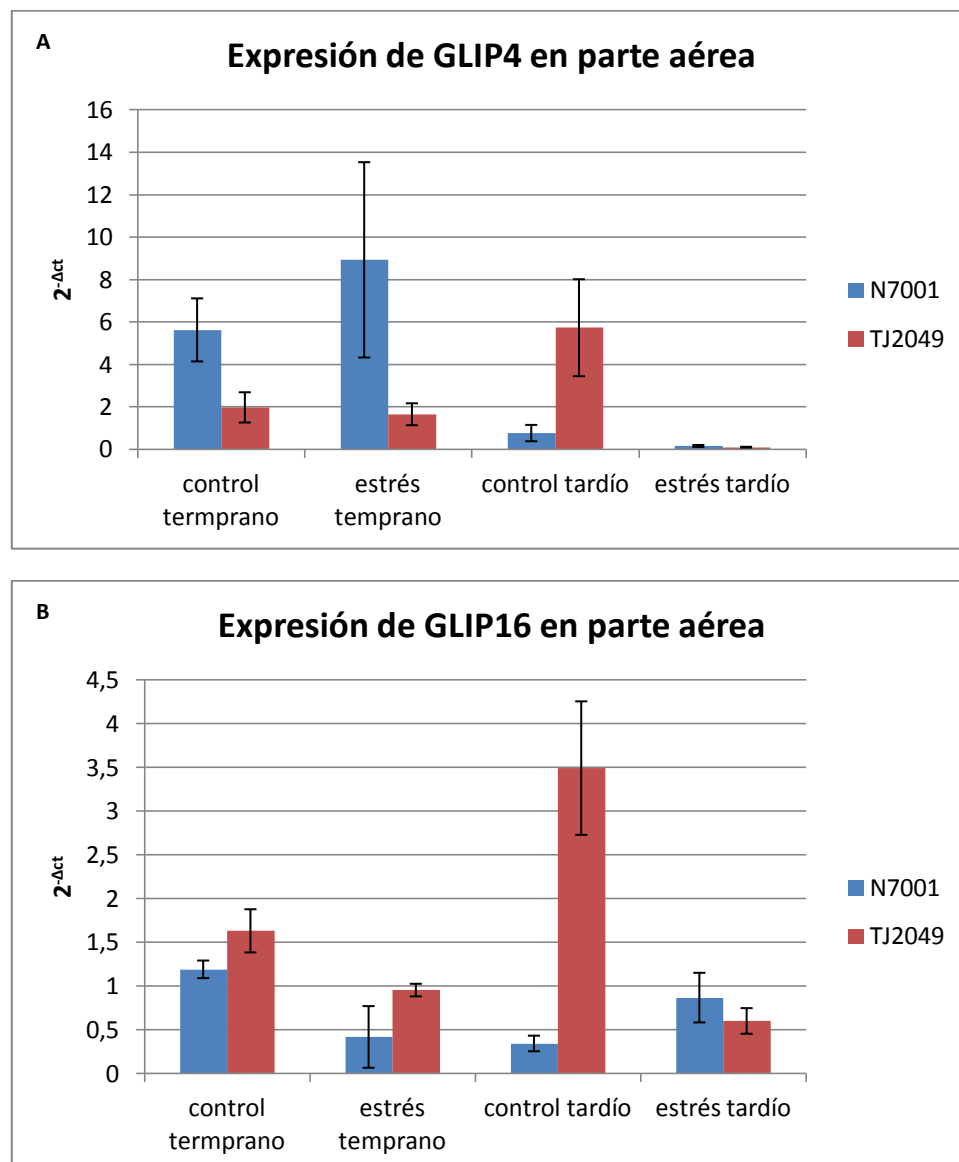
Debido al hallazgo de la lipasa GLIP16 en una biblioteca de SSH enriquecida en secuencias que se sobreexpresan durante el estrés hídrico realizada en el laboratorio se decidió explorar la relación entre algunas GDSLs y el estrés hídrico en soja.

En este sentido se realizaron estudios de RT-PCR en tiempo real para analizar la expresión de los genes GLIP4, GLIP16 en estrés hídrico temprano, estrés hídrico tardío en los dos cultivares y tanto en la parte aérea como en la raíz. Se realizaron cuatro réplicas en cada caso y se realizó una cuantificación relativa al gen codificante para el factor de elongación eucariota I-beta (ELF1B).

La expresión de GLIP16 no fue detectable en raíces en ninguna de las condiciones. En cuanto a su expresión en parte aérea, la misma sufre grandes variaciones y presenta un patrón complejo (figura 18B). Tanto en plantas resistentes como tolerantes se observó un descenso significativo de la expresión en condiciones de estrés inicial (2,8 veces para N7001 p-v: 0,0078 y 1,7 veces para TJ2049 p-v: 0,0019). En cuanto al estrés tardío, se observa un aumento en la expresión en plantas tolerantes (2,5 veces p-v: 0,0125) y un descenso en plantas susceptibles (5,8 veces p-v: 0,0015). A su vez, el patrón de expresión de las plantas en condiciones control varía significativamente con el tiempo (entre estrés inicial y estrés final). Si bien es imposible a partir de estos datos de expresión inferir el tipo de relación de GLIP16 y la respuesta al estrés es evidente que esta relación existe dadas las variaciones observadas entre las condiciones

control y las condiciones de estrés. La variación temporal de la expresión de este gen es indicativa de que además el mismo está regulado o regula funciones durante el desarrollo.

En el caso de la expresión de GLIP4, no se observan cambios significativos con respecto al estrés en condiciones iniciales en la parte aérea, sí se observa un descenso abrupto tanto en plantas susceptibles como en plantas tolerantes en condiciones de estrés tardío (4,8 veces para N7001 p-v: 0,0203 y 69 veces para TJ2049 p-v: 0,0131), pasando la expresión a ser casi nula (figura 18A). En raíces, los niveles de expresión de este gen fueron mucho menores que en la parte aérea y se observa aumento de la expresión en condiciones de estrés en ambos cultivares, aunque el aumento en plantas tolerantes se produce en estrés inicial en tanto que en cultivares susceptibles se produce en estrés tardío, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas (figura 18C). Los resultados indican que existe una inducción diferencial de este gen entre las plantas tolerantes y susceptibles, lo que sugiere una participación de este gen en la respuesta de resistencia a la sequía.



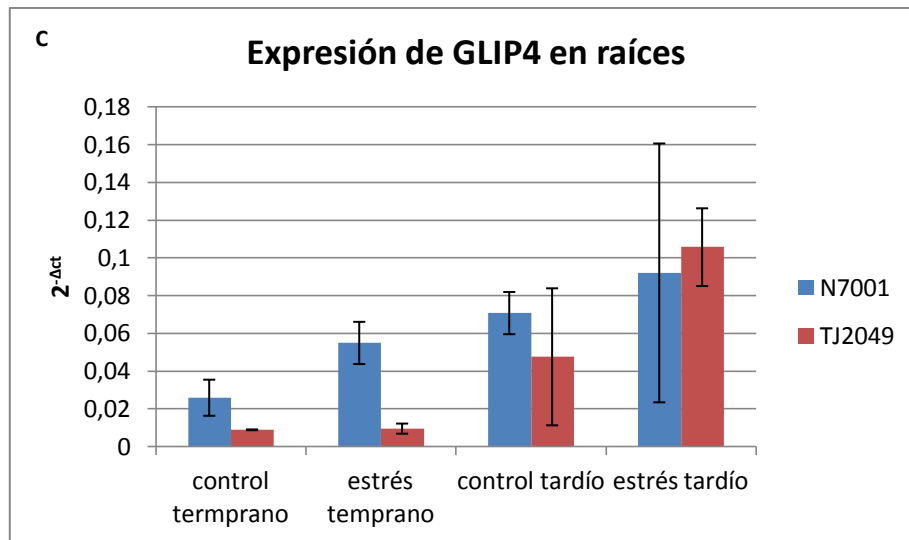


Figura 18: Expresión de GLIP4 y GLIP16. La expresión de estos genes fue medida tanto en raíces como en parte aérea. La expresión de GLIP16 no fue detectable en las raíces. A: Expresión de GLIP4 en la parte aérea, se observa una importante disminución de la expresión durante el estrés tardío en ambos cultivares. B. GLIP16: Expresión de GLIP16 en parte aérea, durante el estrés temprano la expresión de estos genes disminuye, y durante el estrés tardío aumenta para el cultivar tolerante (N7001) y disminuye para el susceptible (TJ2049). C: Expresión de GLIP4 en raíces, si bien pareciera observarse un aumento en la expresión en respuesta al estrés, las diferencias no son estadísticamente significativas.

GLIP 4 podría estar involucrada en la resistencia a patógenos.

Con el objetivo de obtener herramientas para la posterior caracterización de los genes GLIP4 y GLIP16 se clonaron las secuencias codificantes de GLIP4 y GLIP16 en el vector pCRII. Este vector permite el clonado simple de DNA amplificado con polimerasas Taq y que contiene los promotores T7 y Sp6 flanqueando el sitio de clonado, lo que permite la expresión en ciertas cepas bacterianas o *in vitro*. Las construcciones generadas se denominaron pCRGLIP4 (figura 19 A) y pCRGLIP16, también se generó un vector pCRII cerrado, para usar como control negativo en posteriores experimentos.

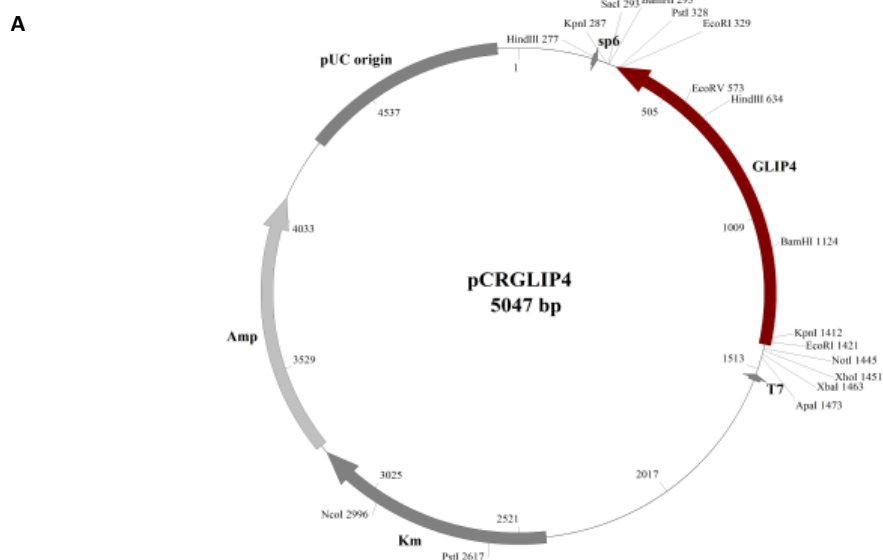
Con el objetivo de analizar la actividad lipasa de GLIP4 el vector pCRGLIP4 fue transformado en células de *E. coli* BL21 (DE3), las cuales codifican la polimerasa T7 en un sistema inducible por IPTG. Se observó que la inducción con IPTG de esta lipasa tenía un efecto bacteriostático en las células que la contenían (figura 19 C). Siendo estas incapaces de crecer en forma de colonias aisladas en medios conteniendo IPTG, en condiciones de expresión de GLIP4. JNP1 una lipasa GDGL encontrada en el néctar del *Jacaranda mimosifolia*, mostró previamente un comportamiento similar (Kram et al., 2008). En el trabajo en que es descrita, no fue posible obtener colonias luego de la transformación con los vectores que las expresaban, aunque si se obtuvieron colonias en ausencia de IPTG (es decir sin inducir la expresión) y con el vector vacío e IPTG. El néctar de esta planta y la expresión ectópica de JPN1 mostraron por su parte tener actividad antimicrobiana. Alentados por la posibilidad de encontrar una acción directamente antimicrobiana de la proteína GLIP4 se estudiaron las curvas de crecimiento de la cepa de BL21 transformadas por el vector pCRII vacío, con el vector pCRGLIP4, en presencia o ausencia de IPTG. Si bien ambos cultivos llegan a una concentración bacteriana similar en fase estacionaria se notó un enlentecimiento en la velocidad de crecimiento de las células conteniendo GLIP4 y

más aún en aquellas inducidas por IPTG (figura 19 B). También ha sido reportada una proteína GDLS humana capaz de inhibir la formación de biofilms (Xiong et al., 2009), coincidente con la incapacidad que muestran las células que expresan GLIP4 de crecer en colonias aisladas en placa. Por otro lado se han reportado algunas GDLS de plantas que actúan directamente sobre los patógenos, por ejemplo promoviendo la degradación de esporas (Oh et al., 2005).

Estas observaciones se ajustan con los datos de expresión basados en los ESTs encontrados de este gen, que muestran una expresión diferencial en condiciones de estrés biótico (tabla 4). En el caso particular de este ensayo, se desvincula la actividad de GLIP4 de los procesos de señalización de la planta y se lo vincula más a un papel activo en la inhibición del crecimiento de estas bacteria. Basándose en estas observaciones y en la localización extracelular predicha para esta proteína puede proponerse que la misma podría tener actividad antimicrobiana inhibiendo directamente el crecimiento de posibles patógenos.

Se requiere una descripción y análisis más exhaustivo de este fenómeno para confirmar la acción de GLIP4 en el crecimiento bacteriano y para explicar el mecanismo mediante el cual inhibe el crecimiento de colonias aisladas en medios sólidos y enlentece el crecimiento en medio líquido.

El primer paso es el estudio de expresión de GLIP4 en condiciones de estrés biótico, la obtención de distintas fracciones de lisados bacterianos que expresen la proteína y estudios de sus efectos en organismos patógenos propios de la soja. De obtenerse resultados positivos se plantea la obtención de esta proteína de manera aislada para el estudio de su mecanismo de acción.



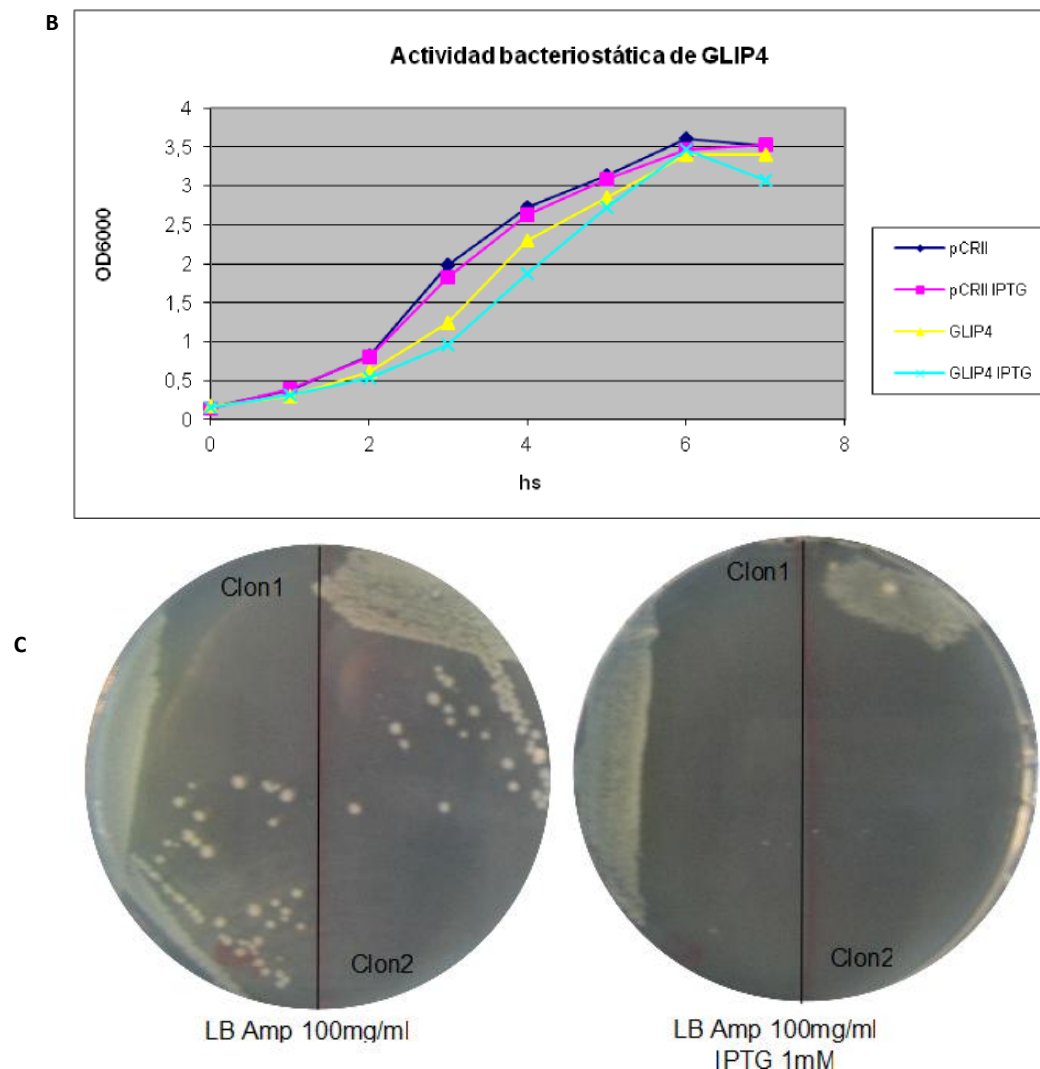


Figura 19: Acción de GLIP4 en el crecimiento bacteriano. A: vector de expresión pCRGLIP4, este vector permite la expresión de GLIP4 bajo la dirección del promotor T7 inducible por IPTG. B: Curvas de crecimiento en cultivo líquido *E. coli* expresando o no GLIP4. Si bien los cultivos alcanzan la misma concentración en estado estacionario, en la fase exponencial se observa un enlentecimiento en el crecimiento de las bacterias que expresan GLIP4. C: Crecimiento en medio sólido de *E. coli* transformado con pCRGLIP4, se observa que al inducirse la expresión de GLIP4 con IPTG las células independientes pierden la capacidad de generar colonias.

Las secuencias codificantes de GLIP4 y GLIP16 también fueron clonadas en el vector pENTR1A (Invitrogen), que posibilitará la construcción de vectores mediante recombinación sitio específica por el sistema Gateway para la posterior caracterización de la función de estos genes. Estos vectores se denominaron pEG4 y pEG16 (figura 20) y posibilitarán tanto la expresión como el silenciamiento antisentido de estos genes en modelos vegetales y no vegetales dependiendo del vector de destino en el que se recombinen.

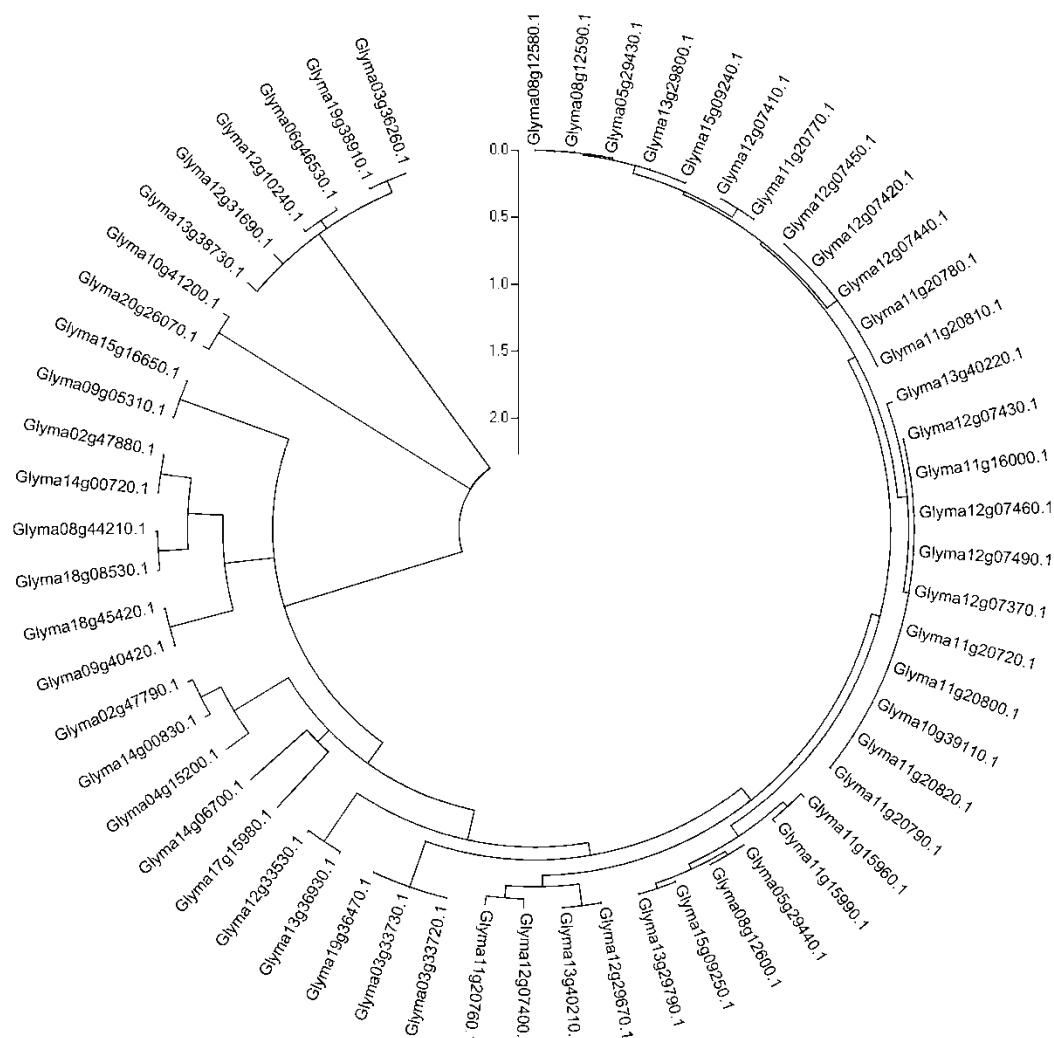


Figura 21: Árbol filogenético de los genes con dominio fasciclina presentes en el genoma de soja. Los genes de fasciclinas de soja se encuentran distribuidos en todo el genoma con familias ordenadas en tándem.

En base al patrón de expresión deducido a partir de la presencia de EST en condiciones de estrés, se seleccionó uno de los genes, FAS28 (Glyma18g45420), para un estudio más exhaustivo. El mismo se expresa diferencialmente a las 5 horas de aplicado el estrés hídrico, en el segmento más distal de las raíces (Valliyodan et al., 2005), que actúa como sensor de varios estímulos (Tsay et al., 2011), además se expresa en respuesta a la aplicación de ácido salicílico. La secuencia del mismo fue clonada en el vector pCRII y secuenciada (figura 22 A). También se clonó esta secuencia en el vector pENTR1A, para facilitar posteriores estudios (figura 22 B)

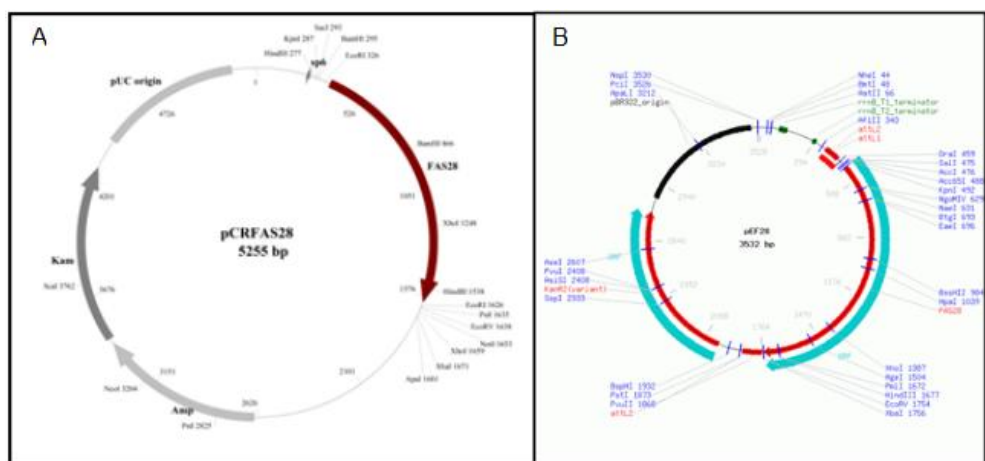


Figura 22. Construcciones generadas para el estudio de FAS28. A: pCRFAS28: construcción que contiene la secuencia codificante del gen FAS28 inserta en el vector T pCRII, este vector permite la expresión de este gen en bacterias. B: pEF28, construcción que contiene la secuencia codificante del gen FAS28 en el vector pENTR 1A. El mismo tiene sitios AttL que recombinan en vectores de destino del tipo Gateway y permiten generar una gran variedad de vectores relacionados.

Se realizó un estudio de la expresión de FAS28 en estrés hídrico usando northern blot, observándose un mayor expresión en las raíces y en tejidos aéreos jóvenes no sometidos a estrés. En raíces, durante el estrés inicial, parece haber un aumento de la expresión de este gen en la línea N7001, descrita como tolerante a la sequía. Si bien las condiciones basales de expresión parecen ser menores en N7001, la expresión en estrés supera a la observada en TJ2049 que no presenta ninguna inducción (figura 23).

Esto apoya la suposición de que FAS28 cumple una función en las raíces durante el estrés y podría estar involucrada en las diferencias en la respuesta entre estos cultivares.

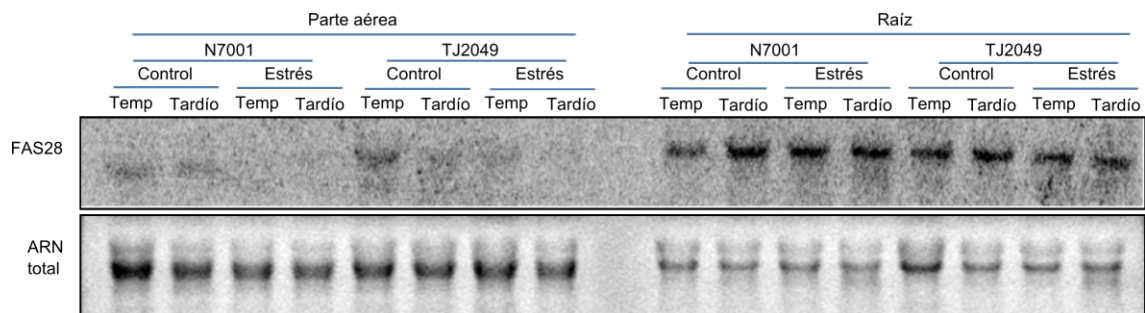


Figura 23: Expresión de FAS28 durante el estrés hídrico. En el northern blot se observa que la expresión de este gen es mayor en raíces. En parte aérea su expresión disminuye tanto a consecuencia del tiempo (control inicial vs. control final) como a consecuencia del estrés. FAS28 se induce en el estrés inicial en raíces de la línea N7001.

Para estudiar más en detalle la función de esta proteína y su implicación en la respuesta al estrés hídrico en raíces, se plantea la sobreexpresión de la misma en raíces de soja, usando *Agrobacterium rhizogenes*. Esta bacteria, es un patógeno vegetal que promueve la generación de raíces adventicias. Es posible promover la inserción de secuencias de interés por parte de la bacteria obteniéndose raíces transgénicas con la construcción de interés (Cheon et al, 1993). Este sistema permite la obtención de plantas híbridas en las cuales la parte aérea pertenece al genotipo salvaje y las raíces contienen la mutación en cuestión.

Por otro lado son necesarios estudios de localización de esta proteína tanto a nivel de tejidos y órganos como a nivel subcelular.

Conclusiones y perspectivas

Este trabajo se centró en la caracterización funcional de dos genes de *Physcomitrella patens* (PpABR100 y PpABR170) y la búsqueda y análisis preliminar de genes homólogos a estos en el genoma de soja, como modelo de traqueofita.

En *Physcomitrella patens* no se obtuvieron líneas con expresión alterada del gen PpABR170, pero se obtuvieron líneas con expresión nula y constitutiva del gen PpABR100. La caracterización fenotípica de las mismas sugiere una función de esta proteína relacionada al estrés por metales pesados.

Durante el estudio de genes ortólogos a PpABR170 en soja se identificaron genes de dominio lipasa GDSL que parecen estar involucrados tanto en el desarrollo como en la respuesta al estrés hídrico en esta planta. Además se constató la expresión en raíces de la fasciclina FAS28 y una inducción de la misma en raíces de plantas tolerantes durante el estrés temprano. Por otro lado se obtuvieron datos preliminares que indican que la proteína GLIP4 interfiere con crecimiento bacteriano.

Para la continuación de estos estudios se plantea el análisis de la localización subcelular tanto de PpABR100 como de PpABR170, la obtención de un mutante inducible de PpABR170 para caracterizar su función y la obtención de modelos de líneas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes para el estudio de los genes GLIP4 y GLIP16.

Asimismo se propone estudiar la expresión GLIP4 en condiciones de estrés biótico y el análisis de la actividad antibacteriana de esta proteína en fitopatógenos.

También se preve analizar la localización subcelular y a nivel de tejidos y órganos de FAS28 y estudiar la función de esta fasciclina mediante el uso de mutantes híbridos de soja inducidos por *Agrobacterium rhizogenes*.

Bibliografía

Adams KL y Wendel JF (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2): 135-41.

Acharya BR y Assmann SM (2009) Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology*, 69: 451-462.

Akoh C, Lee G, Liaw Y, Huang T y Shaw J (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*, 43: 534-552.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.

Anterola A, Göbel C, Hornung E, Sellhorn G, Feussner I y Grimes H. (2009) *Physcomitrella patens* has lipoxygenases for both eicosanoid and octadecanoid pathways. *Phytochemistry*, 70(1): 40-52.

Ashton NW y Cove DJ (1977) The isolation and preliminary characterization of auxotrophic and analogue resistant mutants in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics*, 154: 87-95.

Battaglia M, Olvera-Carrillo, Garcarrubio Y, Campos A, Covarrubias F y Covarrubia AA (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148: 6-24.

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G y Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340: 783-795.

Bies-Ethève N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R y Delseny M (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 67: 107-124.

Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali Ch, Paquet N, Ravier F, Sanchez J-Ch, Frutiger S y Hochstrasser DF (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, 14: 1023-1031.

Bjellqvist B, Basse B, Olsen E y Celis JE (1994) Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, 15: 529-539.

Breesan RA, Hasegawa PM y Pardo JM (1998) Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends in Plant Science*, 3: 411-412.

Böhmer M y Schroeder JI (2011) Quantitative transcriptomic analysis of abscisic acid-induced and reactive oxygen species-dependent expression changes and proteomic profiling in *Arabidopsis* suspension cells. *The Plant Journal*, 67(1): 105-18.

- Bota J, Flexas J y Medrano H (2004)** Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist*, 162: 671–681.
- Bowler C, Montagu MV e Inze D (1992)** Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 83–116.
- Campbell SA y Close TJ (1997)** Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytologist*, 137: 61–74
- Cao D, Hou W, Song S, Sun H, Wu C, Gao Y y Han T (2009)** Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean Plant Cell. *Tissue and Organ Culture*, 96: 45–52
- Carvalho V (2006)** Estudio y caracterización de genes inducidos por estrés inducidos por estrés osmótico y ácido abscísico en *Physcomitrella patens*. Tesis de Maestría. Laboratorio de Biología Molecular Vegetal. PEDECIBA, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- Chandler PM y Robertson M (1994)** Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Reviews in Plant Biology*, 45: 113–141
- Chang RZ, Chen YW, Shao GH y Wan CW (1994)** Effect of salt stress on agronomic characters and chemical quality of seeds in soybean. *Soybean Sciences*, 13: 101–105.
- Cheon C, Lee N, Siddique AM, Bal AK y Verma DPS (1993)** Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis. *The EMBO Journal*, 12(11):4125–4135.
- Chinnusamy V, Schumaker K y Zhu J (2004)** Molecular genetics perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55(395): 225–236, January
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y y Grill E (2006)** Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biology* 8, 314–325.
- Close TJ (1997)** Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*. 100: 291–296.
- Copeland A, Lucas S, Lapidus A, Barry K, Detter JC, Glavina del Rio T, Dalin E, Tice H, Pitluck S, Saunders E, Brettin T, Bruce D, Han C, Tapia R, Gilna P, Schmutz J, Larimer F, Land M, Hauser L, Kyrpides N, Mikhailova N, Anderson I, Sieprawska-Lupa M, Whitman W, Woese C y Richardson P (2007)** Complete sequence of *Methanoculleus marisnigri* JR1. Datos sin publicar.
- Cove DJ, Knight CD y Lamparter T (1997)** Mosses as model systems. *Trends in Plant Science*, 2(3): 99–105.
- Cove DJ, Perroud P, Charron, McDaniel SF, Khandelwal A y Quatrano RS (2009)** Transformation of the Moss *Physcomitrella patens* Using Direct DNA Uptake by Protoplasts. Cold Spring Harbor protocols.

- Cuming A, Cho S, Kamisugi Y, Graham H y Quatrano R (2007)** Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*, 176: 275-287.
- Cushman JC y Bohnert HJ (2000)** Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 117–124.
- Derewenda ZS (1994)** Structure and function of lipases. *Advances in protein chemistry*, 45: 1-52.
- Dosztányi Z, Csizmók Z, Tompa P y Simon István (2005)** The Pairwise Energy Content Estimated from Amino Acid Composition Discriminates between Folded and Intrinsically Unstructured Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 347: 827-839.
- Dosztányi S, Csizmók V, Tompa P y Simon I (2005)** IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, 21: 3433-3434.
- Dure L y Chlan C (1981)** Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. *Plant Physiology*, 68.
- Dure L, Crouch M, Harada JJ, Ho T, Mundy J, Quatrano RS, Thomas TL y Sung ZR (1989)** Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 12: 475–486.
- Dure L (1993).** III, A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant Journal*, 3: 363–369.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G (1999)** ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science*, 8, 978-984.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S y von Heijne G (2000)** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300: 1005-1016.
- Erxleben A, Gessler A, Vervliet-Scheebaum M y Reski R (2011)** Metabolite profiling of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionary conservation of osmoprotective substances. *Plant Cell Reports*, DOI 10.1007/s00299-011-1177-9.
- Flowers TJ, Troke PF y Yeo AR (1977)** The mechanisms of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 28: 89–121.
- Flowers TJ y Yeo AR (1992)** *Solute Transport in plants*, Glasgow, Scotland, Blackie, 176: 45.
- Finkelstein RR, Gampala SS y Rock CD (2002)** Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 14: S15–S45.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T y Steber C (2008)** Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review in Plant Biology*, 59:387–415.

Ford CW (1984) Accumulation of low molecular weight solutes in water stress tropical legumes. *Phytochemistry*, 22: 875–884.

Frank W, Ratnadewi D y Reski R (2005) *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*, 220: 384-394.

Friedman M y Brandon DL (2001) Nutritional and health benefits of soy proteins *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3): 1069-1086

Foyer CH y Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119: 355–364.

Furuki T, Shimizu T, Kikawada T, Okuda T y Sakurai M (2011) Salt Effects on the structural and thermodynamic properties of a group 3 LEA protein model peptide. *Biochemistry*, 23;50(33): 7093-7103.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD y Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press
Full text - Copyright Humana Press.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48: 909- 930.

Goyal K, Tisi L, Basran A, Browne J, Burnell A, Zurdo J y Tunnacliffe A (2003) Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 12977-12984

Greenway H y Munns R (1980). Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 31: 149–190.

Hanada K, Shinozaki K, Hase T, Toyoda T y Okamoto M (2011) Origin and evolution of genes related to ABA metabolism and its signaling pathways. *Journal of plant research*, 4: 455-465.

Hand SC, Menze MA, Toner M, Boswell L y Moore D (2011) LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annual Review of Physiology*, 17;73 115-34

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41: 95-98.

Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2004) Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 657–662.

Hartmann E y Jenkins GI (1984) *The Experimental Biology of Bryophytes* (Dyer AF y Duckett JD, eds.) Academic Press, New York, London, 203-228.

Hirsch R, Hartung W, Gimmler H (1989) Absciscic acid content in algae under stress. *Botánica Acta*, 102(44): 326-334.

Hoekstra FA, Golovina EA y Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance, Trends in Plant Science. 6: 431–438.

Hohe A y Reski R (2003) A tool for understanding homologous recombination in plants. Plant Cell Reports, 21: 1135–1142

Hong JK, Choi HW, Hwang IS, Kim DS, Kim NH, Choi du S, Kim YJ y Hwang BK (2007) Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. Planta, 227(3): 539-58.

Hoth S, Morgante M, Sanchez JP, Hanafey MK, Tingey SV y Chua NH (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscísico acid and largely impaired gene regulation in the abi1-1 mutant. Journal of Cell Science, 115: 4891-4900.

Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z y Xiong L (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. Plant molecular biology, 67: 169–181.

Ingram J y Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual Review of Plant Biology, 47: 377–403.

Inoue H, Takano A, Asano Y y Katoh Y (1995) Purification and characterization of a 22-kDa protein in chloroplasts from green spores of the fern *Osmunda japonica*. Physiologia Plantarum, 95: 465-471

Inoue H, Kamachi H, Yamaya D, Oguma M y Noguchi M (2000). Characterization of a protease that acts specifically on the 22-kDa protein in thylakoid membranes from green spores of the fern *Osmunda japonica*. Physiologia Plantarum, 109: 129-136

Inoue H, Yoshihira T y Tamura N (2005) Induction of photosynthetic activities during germination in green spores of the fern *Osmunda japonica*. Research in Photosynthesis, 2: 619-622.

Jiang QW, Kiyoharu O, y Ryozyo I (2002) Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in Rice1. Plant Physiology, 129: 1880–1891.

Jian B, Liu B, Bi Y, Hou W, Wu C y Han T (2008) Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. BMC Molecular Biology, 23; 9: 59.

Kacperska A (1989) Metabolic consequences of low temperature stress in chilling-insensitive plants, in: P.H. Li (Ed.), Low Temperature Stress Physiology in Crops, CRC Press, Boca Raton, FL 27–40.

Kamisugi Y, Cumming AC y Cove D (2005) Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. Nucleic Acids Research, 33: 19 e173.

Kamisugui Y, Schlink K, Rensing S, Schween G, von Stackelberg M, Cumming A, Reski R y Cove D (2006) The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous

recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic Acids Research*, 34(21): 6205-6214.

Kammerer W y Cove DJ (1996) Genetic analysis of the effects of re-transformation of transgenic lines of the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics*, 250: 380–82.

Karpinska B, Wingsle G y Karpinski S (2000) Antagonistic effects of hydrogen peroxide and glutathione on acclimation to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *IUBMB Life*, 50: 21–26.

Katsir L, Chung HS, Koo AJK y Howe GA (2008) Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4): 428-435

Kim K, Lima TH, Kima MJ, Kimb T, Chungb HM y Paek K (2008) GDSL-lipase1 (CaGL1) contributes to wound stress resistance by modulation of CaPR-4 expression in hot pepper. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374: 693-698.

Ko TS Korban SS y Somers DA (2006) Soybean (*Glycine max*) transformation using immature cotyledon explants. *Methods in Molecular Biology*, 43: 397-405.

Kovacs D, Agoston B y Tompa P (2008) Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones. *Plant Signal Behavior*, 3: 710-713.

Kram BW, Bainbridge EA, Perera MA y Carter C (2008) Identification, cloning and characterization of a GDSL lipase secreted into the nectar of *Jacaranda mimosifolia*. *Plant Molecular Biology*, 68(1-2): 173-83.

Kroemer K, Reski R y Frank W (2004) Abiotic stress response in the moss *Physcomitrella patens*: evidence for an evolutionary alteration in signaling pathways in land plants. *Plant Cell Reports*, 22: 864-870.

Kyte J y Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157: 105-132.

Lang D, Eisinger J, Reski R and Rensing S (2005) Representation and high-quality annotation of the *Physcomitrella patens* transcriptome demonstrates a high proportion of proteins involved in metabolism among mosses. *Plant Biology*, 7: 238-250.

Le Page-Degivry MT, Bidard JN, Rouvier E, Bulard C, Lazdunski M (1986) Presence of abscisic acid, a phytohormone, in the mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(4): 1155-1158.

Lee DS, Kim BK, Kwon SJ, Jin HC y Park OK (2009) Arabidopsis GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370: 1038-1042.

- Li H y Sherman LA (2000)** A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 182: 4268–4277.
- Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G y Bevan MW (2006)** Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Research*, 16(3): 414-427.
- Libault, M, Farmer A, Joshi T, Takahashi K, Langley RJ, Franklin LD, He J, Xu D, May G y Stacey G (2010)** An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants. *The Plant Journal*, 63, 86: 99
- Lin C y Thomashow MF (1992)** A cold-regulated Arabidopsis gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 183: 1103–1108
- Linding R, Jensen LJ, Diella F, Bork P, Gibson TJ y Russell RB (2003)** Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* 11(11):1453- 1459.
- Liu G, Xu H, Zhang L y Zheng Y (2011).** Fe binding properties of two soybean (*Glycine max* L.) LEA4 proteins associated with antioxidant activity. *Plant Cell Physiology*, 52(6): 994-1002.
- Livak KJ y Schmittgen TD (2001)** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402–408
- Lockton S y Gaut BS (2005)** Plant conserved non-coding sequences and paralogue evolution. *Trends in Genetics*, 21(1): 60-5.
- Loreto F, Tricoli D y G. Di Marco D (1995)** On the relationship between electron transport rate and photosynthesis in leaves of the C4 plant *Sorghum bicolor* exposed to water stress, temperature changes and carbon metabolism inhibition. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 885–892.
- Lynch DV (1990)** Chilling injury in plants: the relevance of membrane lipids. F. Katterman (Ed.), *Environmental Injury to Plants*, Academic press, New York, 17-34.
- Masterson J (1999)** Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 15;264 (5157): 421-4.
- Meyer S y Genty B (1998)** Mapping intercellular CO₂ mole fraction (C_i) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging: significance of C_i estimated from leaf gas exchange. *Plant Physiologist*, 116: 947–957.
- Minami A, Nagao M, Arakawa K, Fujikawa S y Takezawa D (2003)** Abscisic acid- induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *Journal of Plant Physiology*, 160(5): 475-483.

- Minami A, Nagao M, Ikegami K, Koshiba T, Arakawa K, Fujikawa S y Takezawa D (2005)** Cold acclimation in bryophytes: low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid. *Planta*, 220(3): 414-423.
- Mishler BD, Lewis LA, Buchheim MA, Renzaglia KS, Garbarg DJ, Delwiche CF, Zechman FW, Kantz TS y Chapman RL (1994)** Phylogenetic relationships of the green “algae” and “bryophytes”. *Annal of the Missouri Botanical Garden*, 81(3): 451-483.
- Nair, R y Rost, B (2005)** Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization. *Journal of Molecular Biology*, 348 (1), 85-100.
- Nambara E y Marion-Poll A (2003)** ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Science*, 8: 213–217.
- Nambara E y Marion-Poll A (2005)** Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review in Plant Biology*, 56: 165–18.
- Naranjo MA, Forment J, Roldán M, Serrano R y Vicente O (2006)** Overexpression of *Arabidopsis thaliana* LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. *Plant Cell Environment*, 29(10): 1890-1900.
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM y Pardo JM (1995)** Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*, 109: 735–742.
- Oh IS, Park AR, Bae MS, Kwon SJ, Kim YS, Lee JE, Kang NY, Lee S, Cheong H y Park OK (2005)** Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell*, 17(10): 2832-47.
- Oldenhof H, Wolkers WH, Bowman JL, Tablin F y Crowe JH (2006)** Freezing and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: An in situ Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochimica et biophysica acta*, 1760: 1226–1234.
- Oliver MJ, Wood AJ (1997)** Desiccation tolerance in mosses: Stress-inducible processes in higher eukaryotic cells. Plenum Publishing Corp. New York, 1-26.
- Okamoto M, Tatematsu K, Matsui A, Morosawa T, Ishida J, Tanaka M, Endo TA, Mochizuki Y, Toyoda T, Kamiya Y, Shinozaki K, Nambara E y Seki M (2010)** Genome-wide analysis of endogenous abscisic acid-mediated transcription in dry and imbibed seeds of *Arabidopsis* using tiling arrays. *The Plant Journal*, 1;62(1): 39-51.
- Patel NH, Snow PM y Goodman CS (1987)** Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell*, 48:975-988.
- Paponov IA, Teale W, Lang D, Paponov M, Reski R, Rensing SA y Palme K (2009)** The evolution of nuclear auxin signaling. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 126.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G y Nielsen H (2011)** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 29;8(10): 785-6.

Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A y Grill E (2010) ABA perception and signaling. Trends in plant science, 15: 395-401.

Ramanjulu S y Bartels D (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. Plant Cell Environment, 25: 141-151.

Ratnayaka HH, Molin WT y Sterling TM (2003) Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought, Journal of Experimental Botany, 54: 2293–2305.

Rensing S, Lang D, Zimmer A, Terry A, Salamo A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud P, Lindquist E, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin-I T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aok S, Asmon N, Barbazuk B, Barker E, Bennetzen J, Blankenship R, Cho S H, Dateher S, Estelle M, Fawcett J, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks K, Hughes J, Nohr M, Mayer K, Molkozernov A, Murata T, Nelson D, Pds D, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushten P, sanderfoot A, Schween G, Shin S, Sheker K, Teodouloy F, Tu H, Van de Peer Y, Verrier P, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming A, Hasebe M, Lucas S, Mishler B, Reski R, Grigoriev I, Quatrano R y Boore J (2008) The *Physcomitrella patens* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. Sciencexpress, 5859: 64-69.

Reski R (1998) Development, genetics and molecular biology of mosses. Botanic Acta, 111(1): 1-15.

Reyes JL, Rodrigo MJ, Colmenero-Flores JM, Gil JV, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D y Covarrubias AA (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. Plant, Cell and Environment, 28: 709–718

Rigaud J y A. Puppo (1975) Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. Journal of General Microbiology, 88: 223-228.

Rock CD (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. New Phytologist, 148(3): 357-396.

Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Wellin B y Vidal S (2006). A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for sal and osmotic stress tolerance. Plant Journal 45: 237-249.

Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A y Sakurai T (2002) Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full- length cDNA microarray. Functional & Integrative Genomics, 2(6): 282-291.

Schaefer DG y Zryd JP (1997) Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. Plant Journal, 11(6): 1195-206

Schaefer DG (2001) Gene targeting in *Physcomitrella patens*. Current Opinion y Plant Biology, 52: 143-150.

Schlessinger A y Rost B (2005) Protein flexibility and rigidity predicted from sequence. *Proteins*, 1;61(1): 115-26.

Schlessinger A, Yachdav G y Rost B (2006) PROFbval: predict flexible and rigid residues in proteins. *Bioinformatics*, 1;22(7): 891-3.

Schlessinger A, Punta M, Rost B (2007) Natively unstructured regions in proteins identified from contact predictions. *Bioinformatics*, 23(18): 2376-2384.

Schlessinger A, Punta M, Yachdav G, Kajan L y Rost B (2009) Improved Disorder Prediction by Combination of Orthogonal Approaches. *PLoS ONE* 4(2): e4433. doi: 10.1371/journal.pone.0004433

Schlueter JA, Scheffler BE, Schlueter SD, Schween G, Hohe A, Koprivova A, Reski R (2003) Effects of nutrients, cell density and culture techniques on protoplast regeneration and early protonema development in a moss, *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Physiology*, 160(2): 209-12.

Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May GD, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya M, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, shu S, Goodstein , Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang X, Shinozaki K, Nguyen HT, Wing RA, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker RC y Jackson SA (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 14(463): 178 -83.

Schween G, Hohe A, Koprivova A y Reski R (2003) Effects of nutrients, cell density and culture techniques on protoplast regeneration and early protonema development in a moss, *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Physiology*, 160:209 –12

Shi H, Kim Y, Guo Y, Stevenson B y Zhu JK (2003) The Arabidopsis SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell*, 15(1): 19-32.

Shoemaker RC (2006) Sequence conservation of homeologous bacterial artificial chromosomes and transcription of homeologous genes in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Genetics*, 74(2): 1017-28.

Shoemaker R, Keim P, Vodkin L, Erpelding J, Coryell V, Khanna A, Bolla B, Marra M, Hillier L, Kucaba T, Martin J, Beck C, Wylie T, Underwood K, Steptoe M, Theising B, Allen M, Bowers Y, Person B, Swaller T, Gibbons M, Pape D, Harvey N, Schurk R, Ritter E, Kohn S, Shin T, Jackson Y, Cardenas M, McCann R, Waterston R y Wilson R (1999) Public Soybean EST Project. Unpublished data.

Skonier J, Neubauer M, Madisen L, Bennett K, Plowman GD y Purchio AF (1992) cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. *DNA and Cell Biology*, 11: 511-522

Specht JE, Williams JH y Pearson DR (1985) Near-isogenic analyses of soybean pubescence genes. *Crop Science*, 25: 92-96.

Steponkus PL (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review in Plant Physiology*, 35: 543–584.

Summers LA (1980) *The Bipyrindinium Herbicides*. Academic Press, New York, NY

Sunkar R, Bartels D, Kirch HH (2003) Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant Journal*, 35: 452-464.

Svensson J, Palva ET, Welin B (2000) Purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* dehydrins by metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification* 20: 169 - 178.

Takahashi K, Shimada T, Kondo M, Tamai A, Mori M, Nishimura M y Hara-Nishimura I (2010) Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 51(1): 123-31.

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.

Thomashow MF (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology*, 118: 1–8

Tsay Y, Ho C, Chen H y Lin S (2011) Signaling Integration of Nitrogen and Potassium. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 207-226.

Updegraff EP, Zhao F y Preuss D (2009) The extracellular lipase EXL4 is required for efficient hydration of *Arabidopsis* pollen. *Sex Plant Reprod*, 22: 197–204.

Valliyodan B, Huang S, Joshi T, Hernandez A, Spollen WG, Bohnert HJ, Duke MV, Liu X, Scheffler BE, Sharp RE, Xu D, Springer GK, Stacey G y Nguyen HT (2005) EST analysis of soybean root tip under drought stress: MSMC Grant 002245 - Development and Deployment of Biotechnology Tools for Soybean Improvement. Unpublished data

Wang X, Kuang T y He Y (2010) Conservation between higher plants and the moss *Physcomitrella patens* in response to the phytohormone abscisic acid: a proteomics analysis. *BMC Plant Biology*, 10: 192-203.

Wang RS, Pandey S, Li S. Gookin TE, Zhao Z, Albert R y Assmann SM (2011) Common and unique elements of the ABA-regulated transcriptome of *Arabidopsis* guard cells. *BMC Genomics*, 9;12: 216.

Xiong N, Hu C, Zhang Y y Chen S (2009) Interaction of sortase A and lipase 2 in the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Archives of microbiology*, 191(12): 879 -884.

Yadav RK, Girke T, Pasala S, Xie M y Reddy GV (2009) Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 24; 106(12): 4941-6.

Yamamoto H, Inomata M, Tsuchiya S, Nakamura M, Uchiyama T, Oritani T (2000) Early biosynthetic pathway to abscisic acid in *Cercospora cruenta*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(10): 2075-2082.

Yamamoto K y Momonoki YS (2008) Subcellular localization of overexpressed maize AChE gene in rice plant. *Plant Signaling & Behavior*, 3(8): 576-577.

Yeats TH, Howe KJ, Matas AJ, Buda GJ, Thannhauser TW y Rose JK (2010) Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 61(13): 3759-71.

Yeo AR (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of whole plant Physiology. *Journal of Experimental Botany*, 49: 915–929.

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants, *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 53: 247–273.

Anexos

Anexo 1. GLIPS presentes en el genoma de soja. Se observan el código de identificación (ID) asociado a cada proteína, se determina con la palabra sí o no la presencia de péptido señal (SP), está anotada la referencia del EST con el que el transcripto presentó más similitud y las condiciones en las cuales el mismo fue aislado (ND: no descripto)

Nombre	ID del transcripto	Presencia de SP	EST con mayor similitud	Condición de expresión
GLIP1	Glyma04g02480.1	Si	-	
GLIP2	Glyma04g02490.1	Si	DT084031.1	ND
GLIP3	Glyma06g02520.1	Si	gb FK002773.1	ND
GLIP4	Glyma14g05560.1	Si	gb BQ628672.1	SDS (Sudden Death Syndrome)
GLIP5	Glyma17g37900.1	Si	gb BM121473.1	Infección por nematodos
GLIP6	Glyma06g02530.1	No	gb DT084031.1	Estrés salino
GLIP7	Glyma14g40200.1	Si	gb FG990226.1	ND
GLIP8	Glyma14g40210.1	Si	dbj DB965862.1	ND
GLIP9	Glyma14g40220.1	Si	gb BI893130.1	ND
GLIP10	Glyma14g40230.1	Si	gb BE329924.1	ND
GLIP11	Glyma17g37910.1	Si	gb FK006851.1	ND
GLIP12	Glyma17g37920.1	Si	dbj DB965862.1	ND
GLIP13	Glyma17g37930.1	Si	gb FG990920.1	ND
GLIP14	Glyma13g03300.1	Si	-	
GLIP15	Glyma13g03320.1	No	-	
GLIP16	Glyma14g05550.1	Si	gb CA785380.1	Tejido desdiferenciado
GLIP17	Glyma04g43480.1	Si	gb EV263930.1	ND
GLIP18	Glyma14g23780.1	Si	gb GR852683.1	Callos crecidos en oscuridad
GLIP19	Glyma14g23820.1	Si	gb CA801505.1	ND
GLIP20	Glyma01g30390.1	No	gb BG045431.1	ND
GLIP21	Glyma03g07880.1	No	gb BG239285.1	ND
GLIP22	Glyma07g18170.1	No	-	
GLIP23	Glyma07g18200.1	No	gb GR842075.1	Callos crecidos en oscuridad
GLIP24	Glyma07g18210.1	Si	gb EV263995.1	ND
GLIP25	Glyma07g18230.1	No	-	
GLIP26	Glyma16g19240.1	No	-	
GLIP27	Glyma18g43040.1	No	gb FK018041.1	ND
GLIP28	Glyma18g43070.1	Si	gb BU762900.1	ND
GLIP29	Glyma18g43080.1	No	-	
GLIP30	Glyma10g34860.1	No	-	
GLIP31	Glyma09g36850.1	Si	gb EV263135.1	Raíces con nódulos
GLIP32	Glyma05g24330.1	Si	-	
GLIP33	Glyma13g07770.1	Si	gb EV266277.1	ND

GLIP34	Glyma13g07840.1	Si	gb EV266277.1	ND
GLIP35	Glyma19g06890.1	Si	gb FG989075.1	ND
GLIP36	Glyma19g07000.1	Si	gb FG989075.1	ND
GLIP37	Glyma08g13990.1	Si	gb EV271900.1	ND
GLIP38	Glyma07g04930.1	Si	-	
GLIP39	Glyma20g37510.1	Si	-	
GLIP40	Glyma19g07030.1	Si	-	
GLIP41	Glyma19g07070.1	No	gb AW100486.1	ND
GLIP42	Glyma19g07080.1	Si	gb FG986239.1	ND
GLIP43	Glyma04g35090.1	Si	-	
GLIP44	Glyma04g37660.1	Si	gb FG991353.1	ND
GLIP45	Glyma10g08880.1	Si	-	
GLIP46	Glyma10g08930.1	Si	-	
GLIP47	Glyma19g07330.1	No	-	
GLIP48	Glyma07g36790.1	No	-	
GLIP49	Glyma09g03950.1	No	-	
GLIP50	Glyma15g14900.1	No	gb BI425790.1	ND
GLIP51	Glyma15g14930.1	Si	gb EV282817.1	ND
GLIP52	Glyma17g03750.1	Si	-	
GLIP53	Glyma02g05150.1	Si	-	
GLIP54	Glyma06g44950.1	No	-	
GLIP55	Glyma06g44970.1	No	gb BE661611.1	ND
GLIP56	Glyma11g08420.1	Si	gb EV268802.1	ND
GLIP57	Glyma16g23290.1	No	-	
GLIP58	Glyma05g29610.1	No	-	
GLIP59	Glyma06g44100.1	Si	-	
GLIP60	Glyma13g29500.1	Si	gb CO983356.1	ND
GLIP61	Glyma15g09520.1	No	gb CO980874.1	ND
GLIP62	Glyma15g09530.1	No	-	
GLIP63	Glyma15g09540.1	Si	gb CF922628.1	Pelos radiculares
GLIP64	Glyma15g09550.1	No	-	
GLIP65	Glyma13g30460.1	Si	dbj DB962445.1	ND
GLIP66	Glyma13g30470.1	No	-	
GLIP67	Glyma13g30500.1	Si	gb BI969457.1	ND
GLIP68	Glyma15g08720.1	Si	gb FG991813.1	
GLIP69	Glyma15g08730.1	Si	gb CA800068.1	ND
GLIP70	Glyma03g41310.1	Si	gb FG989129.1	ND
GLIP71	Glyma03g41320.1	Si	dbj DB960233.1	ND
GLIP72	Glyma03g41330.1	Si	gb EV265335.1	ND
GLIP73	Glyma19g43920.1	Si	gb EV265335.1	ND
GLIP74	Glyma19g43930.1	Si	dbj BW679995.1	ND
GLIP75	Glyma08g43080.1	Si	gb EV267082.1	ND

GLIP76	Glyma14g02570.1	Si	gb EV281155.1	ND
GLIP77	Glyma18g10820.1	Si	-	
GLIP78	Glyma13g24020.1	No	gb FK016573.1	ND
GLIP79	Glyma13g30540.1	No	gb EV263979.1	ND
GLIP80	Glyma15g08700.1	No	gb AW597817.1	ND
GLIP81	Glyma02g43440.1	Si	-	
GLIP82	Glyma13g13300.1	Si	dbj BW655544.1	ND
GLIP83	Glyma02g05210.1	No	-	
GLIP84	Glyma16g23260.1	No	-	
GLIP85	Glyma10g31160.1	Si	gb FG990463.1	ND
GLIP86	Glyma07g32450.1	Si	-	
GLIP87	Glyma13g24130.1	Si	gb BE611611.1	ND
GLIP88	Glyma13g30690.1	Si	-	
GLIP89	Glyma15g08590.1	Si	gb FK001996.1	ND
GLIP90	Glyma05g08540.1	Si	dbj DB956477.1	ND
GLIP91	Glyma19g01090.1	Si	gb EV266166.1	ND
GLIP92	Glyma02g04910.1	Si	gb BE661564.1	Tegumento
GLIP93	Glyma16g22860.1	No	-	
GLIP94	Glyma03g35150.1	Si	gb CO981609.1	ND
GLIP95	Glyma10g08210.1	Si	gb CF806561.1	Infección con <i>Phytophthora soyae</i>
GLIP96	Glyma13g21970.1	Si	gb CX711459.1	48HS2
GLIP97	Glyma15g14950.1	No	-	
GLIP98	Glyma07g04940.1	Si	gb CF845433.1	Infección con <i>Phytophthora soyae</i>
GLIP99	Glyma16g01480.1	No	-	
GLIP100	Glyma16g01490.1	Si	gb FK026350.1	ND
GLIP101	Glyma13g30450.1	Si	gb BE611277.1	ND
GLIP102	Glyma15g08770.1	Si	gb CO982957.1	ND
GLIP103	Glyma02g43430.1	Si	gb FK006785.1	ND
GLIP104	Glyma05g02950.1	Si	dbj BW657495.1	ND
GLIP105	Glyma17g13600.1	Si	gb EV266626.1	ND
GLIP106	Glyma03g41580.1	Si	gb BE822073.1	ND
GLIP107	Glyma17g18170.1	Si	gb FG988193.1	ND
GLIP108	Glyma04g43490.1	No	gb CO980441.1	ND
GLIP109	Glyma06g48240.1	No	-	
GLIP110	Glyma03g00860.1	No	gb FK454248.1	Semillas con nódulo
GLIP111	Glyma19g29810.1	Si	gb FK007858.1	ND
GLIP112	Glyma03g40020.1	No	gb FK019278.1	ND
GLIP113	Glyma19g42560.1	Si	gb CD409722.1	Ácido salicílico
GLIP114	Glyma01g43590.1	No	-	
GLIP115	Glyma11g01880.1	No	-	
GLIP116	Glyma13g42960.1	No	gb EH223396.1	Infección con <i>Phakopsora pachyrhizi</i>
GLIP117	Glyma15g02430.1	Si	-	

GLIP118	Glyma03g38890.1	Si	gb CO979597.1	ND
GLIP119	Glyma19g41470.1	Si	dbj BW675280.1	ND
GLIP120	Glyma03g42460.1	Si	-	
GLIP121	Glyma19g45230.1	Si	gb GR828144.1	Callos crecidos en oscuridad
GLIP122	Glyma09g08640.1	No	-	
GLIP123	Glyma15g20230.1	No	-	
GLIP124	Glyma15g20240.1	No	-	
GLIP125	Glyma12g30480.1	Si	gb BM309166.1	Embriones somáticos
GLIP126	Glyma17g05450.1	Si	gb BU927013.1	Embriones somáticos
GLIP127	Glyma02g39800.1	No	gb BF067644.1	ND
GLIP128	Glyma02g39820.1	Si	gb FK452514.1	Semillas con nódulos
GLIP129	Glyma07g06640.1	Si	gb EV266890.1	ND
GLIP130	Glyma16g03210.1	Si	gb BU761256.1	ND
GLIP131	Glyma02g41210.1	Si	gb AW348454.1	ND
GLIP132	Glyma14g39490.1	Si	gb FK018562.1	ND
GLIP133	Glyma06g48250.1	Si	gb CO979109.1	ND
GLIP134	Glyma05g29630.1	Si	gb EV265681.1	ND
GLIP135	Glyma08g12750.1	Si	gb DT082994.1	ND
GLIP136	Glyma10g29820.1	Si	gb EV264943.1	ND
GLIP137	Glyma20g37510.1	Si	-	
GLIP138	Glyma15g41840.1	Si	gb FK009910.1	ND
GLIP139	Glyma15g41850.1	Si	gb EV275069.1	Raíces
GLIP140	Glyma03g41340.1	Si	gb CD394483.1	Ácido salicílico
GLIP141	Glyma19g43950.1	Si	gb FK000506.1	ND
GLIP142	Glyma07g01680.1	Si	gb EV266499.1	ND
GLIP143	Glyma08g21340.1	Si	dbj BW655416.1	ND
GLIP144	Glyma10g31170.1	Si	-	
GLIP145	Glyma20g36350.1	Si	gb AI416771.1	ND
GLIP146	Glyma01g09190.1	Si	gb BF219577.1	ND
GLIP147	Glyma02g13720.1	Si	gb FK418533.1	ND
GLIP148	Glyma14g40190.1	No	gb AI496578.1	Raíces
GLIP149	Glyma17g37940.1	No	gb GD701207.1	Semillas en estado globular
GLIP150	Glyma11g35240.1	Si	gb EV266551.1	ND
GLIP151	Glyma18g03160.1	Si	gb FK012508.1	ND
GLIP152	Glyma16g07430.1	Si	gb CO980975.1	ND
GLIP153	Glyma16g07440.1	No	-	
GLIP154	Glyma10g04830.1	Si	-	
GLIP155	Glyma13g19220.1	Si	gb FK002165.1	ND
GLIP156	Glyma01g38850.1	Si	-	
GLIP157	Glyma11g06360.1	Si	gb EV271970.1	ND
GLIP158	Glyma06g16970.1	Si	gb EV264051.1	ND
GLIP159	Glyma02g43180.1	No	-	

GLIP160	Glyma16g07230.1	No	-	
GLIP161	Glyma19g23450.1	No	gb CX703901.1	S1H5
GLIP162	Glyma11g19600.1	Si	gb CO979894.1	ND
GLIP163	Glyma12g08910.1	No	-	
GLIP164	Glyma02g44140.1	No	-	
GLIP165	Glyma05g02290.1	No	-	
GLIP166	Glyma17g09650.1	No	gb CD487696.1	Ácido salicílico
GLIP167	Glyma06g02540.1	Si	-	
GLIP168	Glyma04g33430.1	Si	-	
GLIP169	Glyma06g20900.1	Si	-	
GLIP170	Glyma01g26580.1	Si	-	
GLIP171	Glyma03g16140.1	Si	gb CD417700.1	Ácido salicílico
GLIP172	Glyma08g42010.1	Si	gb EV265102.1	ND
GLIP173	Glyma18g13540.1	Si	-	
GLIP174	Glyma04g34920.1	No	-	
GLIP175	Glyma06g19650.1	No	-	
GLIP176	Glyma02g06960.1	Si	-	
GLIP177	Glyma16g26020.1	Si	gb EV278627.1	ND
GLIP178	Glyma09g37640.1	No	-	
GLIP179	Glyma18g48980.1	Si	gb CD398539.1	Ácido salicílico
GLIP180	Glyma13g30680.1	No	gb FG997396.1	ND
GLIP181	Glyma15g08600.1	Si	dbj BW658052.1	
GLIP182	Glyma05g00990.1	Si	gb FG991904.1	ND
GLIP183	Glyma17g10900.1	Si	gb FK017346.1	ND
GLIP184	Glyma08g34760.1	No	-	
GLIP185	Glyma16g07450.1	Si	gb FG987031.1	ND
GLIP186	Glyma19g43940.1	Si	gb EH262514.1	Estrés biótico
GLIP187	Glyma15g09560.1	Si	gb FK012794.1	ND
GLIP188	Glyma19g01870.1	No	-	
GLIP189	Glyma04g02500.1	No	gb CD413839.1	Ácido salicílico
GLIP190	Glyma03g22000.1	Si	-	
GLIP191	Glyma03g32690.1	No	-	
GLIP192	Glyma13g29490.1	Si	gb EV274004.1	ND
GLIP193	Glyma14g33360.1	No	-	
GLIP194	Glyma19g04890.1	Si	-	

Anexo 2. Fasciclinas presentes en el genoma de soja. Se observan el código de identificación (ID) asociado a cada proteína, se determina con la palabra sí o no la presencia de péptido señal y la presencia o no de datos ESTs asociados. Se encuentran anotadas las condiciones en que los EST fueron aislados en los casos en las que las mismas hayan sido descriptas.

Nombre	ID del transcripto	EST	Datos expresión	Péptido señal
FAS1	Glyma02g47790.1	si	5H.S1	Si
FAS2	Glyma02g47880.1	si	5H.S1 y S2	Si
FAS3	Glyma03g33720.1	si	5H.S2	Si
FAS4	Glyma03g33730.1	si		Si
FAS5	Glyma03g36260.1	si	5H.S1 y semillas	Si
FAS6	Glyma04g15200.1	no		Si
FAS7	Glyma05g29430.1	si	Raíces	Si
FAS8	Glyma05g29440.1	si		Si
FAS9	Glyma06g46530.1	si		Si
FAS10	Glyma08g12580.1	si		Si
FAS11	Glyma08g12590.1	si		Si
FAS12	Glyma08g12600.1	no		Si
FAS13	Glyma08g44210.1	si	48H.S2	Si
FAS14	Glyma09g05310.1	no		Si
FAS15	Glyma09g40420.1	si		Si
FAS16	Glyma10g39110.1	no		No
FAS17	Glyma10g41200.1	no		Si
FAS18	Glyma11g15960.1	no		Si
FAS19	Glyma11g15990.1	si		Si
FAS20	Glyma11g16000.1	no		Si
FAS21	Glyma11g20720.1	si		Si
FAS22	Glyma11g20760.1	no		Si
FAS23	Glyma11g20770.1	no		No
FAS24	Glyma11g20780.1	no		No
FAS25	Glyma11g20790.1	no		No
FAS26	Glyma11g20800.1	no		No
FAS27	Glyma11g20810.1	no		Si
FAS28	Glyma18g45420.1	si	5H.S1 y SA	Si
FAS29	Glyma11g20820.1	si		Si
FAS30	Glyma12g07370.1	si		Si
FAS31	Glyma12g07400.1	si	SA, raíces	Si
FAS32	Glyma12g07410.1	no		Si
FAS33	Glyma12g07420.1	si	exclusivo raíz	Si
FAS34	Glyma12g07430.1	si		Si
FAS35	Glyma12g07440.1	si	exclusivo raíz	Si
FAS36	Glyma12g07450.1	si		Si
FAS37	Glyma12g07460.1	si		Si
FAS38	Glyma12g07490.1	si		Si
FAS39	Glyma12g10240.1	no	Pelo radicular	Si
FAS40	Glyma12g29670.1	si		Si

FAS41	Glyma12g31690.1	si	SA	Si
FAS42	Glyma12g33530.1	si	Infección con <i>P. soyae</i>	Si
FAS43	Glyma13g29790.1	no		No
FAS44	Glyma13g29800.1	no		No
FAS45	Glyma13g36930.1	si		Si
FAS46	Glyma13g38730.1	si		Si
FAS47	Glyma13g40210.1	si		Si
FAS48	Glyma13g40220.1	si		No
FAS49	Glyma14g00720.1	si	5H.S1	Si
FAS50	Glyma14g00830.1	si		Si
FAS51	Glyma14g06700.1	no	Pelo Radicular	No
FAS52	Glyma15g09240.1	si		Si
FAS53	Glyma15g09250.1	no		No
FAS54	Glyma15g16650.1	si		Si
FAS55	Glyma15g22010.1	no		No
FAS56	Glyma17g15980.1	no		Si
FAS57	Glyma18g08530.1	si		Si
FAS58	Glyma19g36470.1	si		Si
FAS59	Glyma19g38910.1	si		Si
FAS60	Glyma20g26070.1	no		Si