

**EXPRESIÓN DE LA ENZIMA PROTEÍNA QUINASA CALCIO CALMODULINA
DEPENDIENTE EN BRACHYPODIUM DISTACHYON**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 1 de febrero de 2019

**EXPRESIÓN DE LA ENZIMA PROTEÍNA QUINASA CALCIO CALMODULINA
DEPENDIENTE EN BRACHYPODIUM DISTACHYON**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

ANA EDITH FERNÁNDEZ

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Ing. Agr. *M.sc*
Carla Delucchi
Evaluador

Dra. Cecilia
Mandolino
Evaluador

Dra. Mariana
Bracco
Evaluador

Ing. Agr. Antonio
Díaz Paleo
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 1 de febrero de 2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, expreso mi agradecimiento al Director de esta tesis de grado, Ing. Agr. Antonio Díaz Paleo, por su dedicación y apoyo brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la confianza ofrecida desde el comienzo.

Asimismo, agradezco a la Directora del Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales Ing. Agr. Susana M. Pistorale de ésta universidad por su apoyo personal y humano.

Por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología, mi agradecimiento al equipo de trabajo del Laboratorio Regional de Biotecnología INTA Pergamino y a la institución en general por brindarme su espacio para el desarrollo de ésta tesis.

Gracias a mis compañeros de universidad por las anécdotas y momentos compartidos.

Gracias a mis amigos por su apoyo en los momentos difíciles de éste trabajo.

Gracias a mi pareja por el aliento, comprensión y solidaridad con este proyecto.

Pero sobre todo gracias a mis padres por haberme dado la posibilidad de elegir estudiar ésta hermosa carrera, y por apoyarme en cada decisión de mi vida.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
REFERENCIA DE FIGURA	3
REFERENCIA DE TABLAS	4
INTRODUCCIÓN	5
I. Marco teórico	6
I.A. Relaciones simbióticas y captación de nitrógeno	6
I.B. Transcripción reversa y cuantificación de RNA	16
II. Antecedentes	18
III. Objetivos	22
HIPÓTESIS	24
MATERIALES & MÉTODOS	26
I. Material vegetal	27
II. Genes de referencia en trigo y <i>Brachypodium</i>	30
III. Cuantificación de transcritos del gen BdCCaMK en <i>Brachypodium distachyon</i>	31
IV. Extracción de RNA y síntesis de cDNA. Transcripción Reversa	31
V. Visualización del DNA extraído y de los productos de PCR en gel	33
VI. RT-qPCR y cuantificación a través de Real Time PCR	33
VII. Análisis de expresión relativa del transcrito BdCCaMK a través del programa REST© (Relative expression software tool)	34
VIII. Clonado de secuencias	35

IX. Vector de clonado	36
X. Análisis bioinformático	38
RESULTADOS & DISCUSIÓN	39
I. Secuencia de CCaMK en <i>Brachypodium</i> y trigo	40
II. Selección de cebadores para cuantificación	41
III. Búsqueda de SamDC en genoma de trigo	45
IV. Curva estándar cuantificación	46
V. Análisis de los resultados de cuantificación de BdCCaMK a través del software REST© (Relative expression software tool)	47
VI. Amplificación y ligación de secuencias de trigo y <i>Brachypodium</i>	49
VI.A. Amplificación de los transcritos correspondientes a TaCCaMK	50
VI.B Amplificación de las secuencias promotoras de <i>Brachypodium</i>	52
VII. Ligamiento de amplicones a plásmido de clonado	53
CONCLUSIÓN	55
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXO I	62

RESUMEN

La proteína quinasa calcio calmodulina dependiente (CCaMK) es una enzima clave en el establecimiento de las relaciones simbióticas en gramíneas y leguminosas. Se encuentra codificada en leguminosas por el gen *DMI3* (del inglés: *Does not Make Infection*) cuya expresión es imprescindible para la formación de nódulos. Se ha demostrado que, una mutante del gen con ganancia de función (del inglés: *Gain Of Function*), sin el dominio de autoinhibición de esta proteína, induce la formación espontánea de nódulos en *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*.

En gramíneas, se pudo determinar que los ortólogos correspondientes a *DMI3* se encuentran presentes y participan en la interacción con micorrizas arbusculares (MA), siendo asimismo necesarios en el establecimiento de la relación simbiótica. Actualmente se interpreta que *DMI3* forma parte de una ruta ancestral compartida (del inglés: *Common Symbiotic Pathway*) para el establecimiento de las relaciones simbióticas con bacterias y hongos en plantas.

Se estudió la expresión diferencial a nivel de transcritos en cDNA de *BdCCaMK* (proteína quinasa calcio calmodulina dependiente de *Brachypodium distachyon*) en la línea de *B. distachyon* Bd 21-3. Las extracciones de RNA, se realizaron en tres momentos del crecimiento: fase vegetativa tardía, fase de transición y fase reproductiva. Se observó un mayor nivel de transcritos en raíces que en hojas y en la fase tardía que en la de transición. No se logró cuantificar en la etapa reproductiva, por lo que se especula que la presencia de transcritos en esta etapa es muy escasa.

Además, se realizó el clonado de la secuencia codificadora de *TaCCaMK* (proteína quinasa calcio calmodulina dependiente de *Triticum aestivum*) y de la región 5' de *BdCCaMK*. Ambas secuencias podrían ser utilizadas para la obtención de plantas transgénicas, con el fin de comprobar la funcionalidad en expresión heteróloga de la enzima.

El estudio de la enzima, involucrada en la formación de nódulos en leguminosas sin la participación de rizobios podría contribuir a alcanzar el objetivo de expresar genes propios de la bacteria, como la enzima nitrogenasa, en plantas.

REFERENCIA DE FIGURAS

Figura 1.1. Pasos en el desarrollo de las micorrizas arbusculares (MA)	7
Figura 1.2. Rizobios interactuando con leguminosas	8
Figura 1.3. Esquema comparativo de nódulos indeterminados y determinados	10
Figura 1.4. Regulación de CCaMK	14
Figura 1.5. Transducción de señal simbiótica en las células de raíz	15
Figura 3.1. Imágenes de plántulas de <i>Brachypodium</i> durante su crecimiento	28
Figura 3.2. Etapas del desarrollo de <i>B. distachyon</i>	29
Figura 3.3. Esquema del vector <i>Zero Blunt TOPO</i>	37
Figura 4.1. Alineamiento de las secuencias proteicas CCaMK de <i>Brachypodium</i> y alfalfa	41
Figura 4.2. Vista gráfica de los pares de cebadores diseñados	42
Figura 4.3. Amplificación de pares de cebadores BdCCaMK3 y BdCCaMK	43
Figura 4.4. Producto de amplificación de cebadores combinados	44
Figura 4.5. Resultados de las amplificaciones producto de PCR a partir de gDNA de trigo y <i>Brachypodium</i> para los cebadores SAM y SAM1	45
Figura 4.6. Curva de amplificación por PCR en tiempo real de los cebadores candidatos BdCCaMK3 y BdCCaMK4	47
Figura 4.7. Tasa de expresión relativa (Media \pm DS)	49
Figura 4.8. Gel con amplificaciones de los cebadores <i>Nest1</i> , <i>Nest2</i> y <i>RealTAF/TAR</i> a partir de cDNA de trigo	52
Figura 4.9. Región putativa 5' del gen <i>BdCCaMK</i>	53

REFERENCIA DE TABLAS

Tabla 3.1. Solución <i>Hoagland</i> : componentes y soluciones de reserva para su preparación	28
Tabla 3.2. Componentes y volúmenes de reacción de PCR	36
Tabla 3.3. Componentes de la reacción de ligación en vector <i>TOPO</i>	37
Tabla 4.1. Cebadores diseñados para la cuantificación del transcripto BdCCaMK	43
Tabla 4.2. Cebadores diseñados para amplificación del gen de referencia	45
Tabla 4.3. Resultados de la cuantificación relativa mediante qPCR del transcripto de BdCCaMK	48
Tabla 4.4. Cebadores utilizados en la amplificación de secuencias de trigo y <i>Brachypodium distachyon</i>	50

1. INTRODUCCIÓN

I. Marco teórico

I.A. Relaciones simbióticas y captación de nitrógeno

Las simbiosis formadas entre las plantas terrestres con micorrizas arbusculares (MA) y las que ocurren entre las leguminosas con bacterias fijadoras de nitrógeno, son consideradas importantes para una agricultura sustentable (Chen *et al.* 2008). La fijación de nitrógeno por parte de las leguminosas ha sido un foco importante de investigación, y el conocimiento de cómo las bacterias y las plantas pueden interactuar ha avanzado considerablemente (Haag *et al.* 2012). Las micorrizas (del griego: *mykes*-hongo, *rhiza*-raíz) son una asociación mutualista entre los hongos formadores de MA y las plantas (Sosa *et al.* 2006). La simbiosis MA es probablemente la más extendida y la que ocurrió de manera temprana en el linaje de las plantas (Parniske, 2008; Wang *et al.* 2010). Permite la interacción de las raíces con la red de hifas del hongo en el suelo, lo que mejora en gran medida la absorción de nutrientes minerales (principalmente fósforo y nitrógeno) y el suministro de agua. Además, mejora la tolerancia al estrés abiótico y biótico, aumenta la resistencia a patógenos, como también a componentes tóxicos del suelo, salinidad y sequía (Gianinazzi *et al.* 2010). Las raíces producen y liberan estrigolactonas (carotenoides derivados de fitohormonas), que además de desencadenar la respuesta para el desarrollo de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), también influyen de manera secundaria en las oscilaciones de calcio en las células epidérmicas de raíz, necesarias para la colonización (Genre *et al.* 2013). Las estrigolactonas estimulan la producción de los denominados factores “*Myc*”, una mezcla de moléculas de señalización, que desencadenan diversas respuestas en el huésped relacionadas con la

simbiosis, incluyendo la activación transcripcional (Kuhn *et al.* 2010), y la formación de raíces laterales (Oláh *et al.* 2005). La célula vegetal estimulada mecánicamente prepara la captación del hongo mediante la construcción del llamado aparato de pre-penetración (APP), un puente citoplasmático compuesto por filamentos del citoesqueleto y componentes del retículo endoplasmático (Genre *et al.* 2013). Guiado por el APP, el hongo atraviesa las células de la corteza externa hasta que alcanza la capa interna de las células corticales. Ahí, las hifas del hongo se propagan longitudinalmente en el apoplasto y penetran en las células de la capa interna de la corteza, donde finalmente se forman los órganos de intercambio simbiótico, los arbuscúlos.

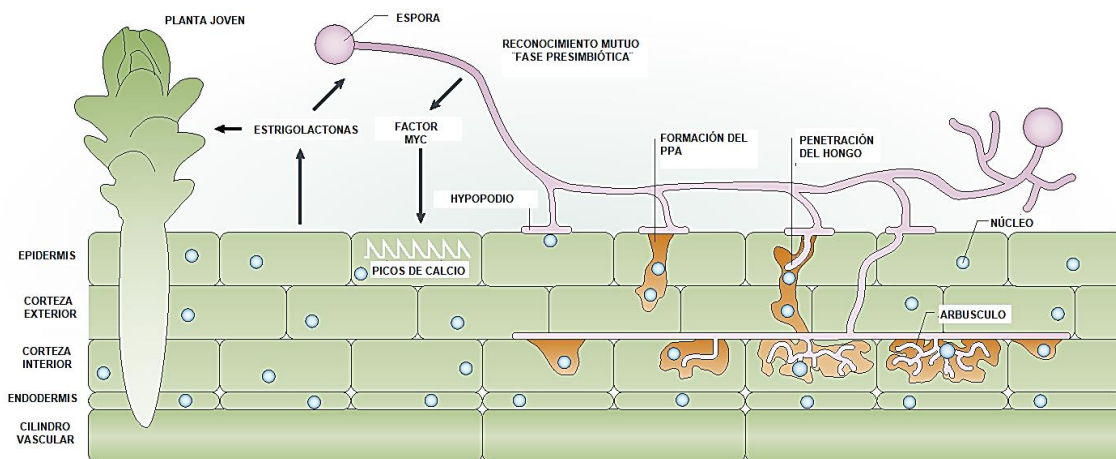


Figura 1.1: Pasos en el desarrollo de las micorrizas arbusculares (MA) en raíz. Modificada a partir de Parniske, 2008.

Más recientemente aparece en la evolución la simbiosis de fijación de nitrógeno a partir de estructuras de nódulos en las raíces de leguminosas en interacción con bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, comúnmente llamadas rizobios. Este tipo de simbiosis se inicia con el establecimiento de señales de tipo moleculares entre el huésped y la bacteria (**Figura 1.2**).

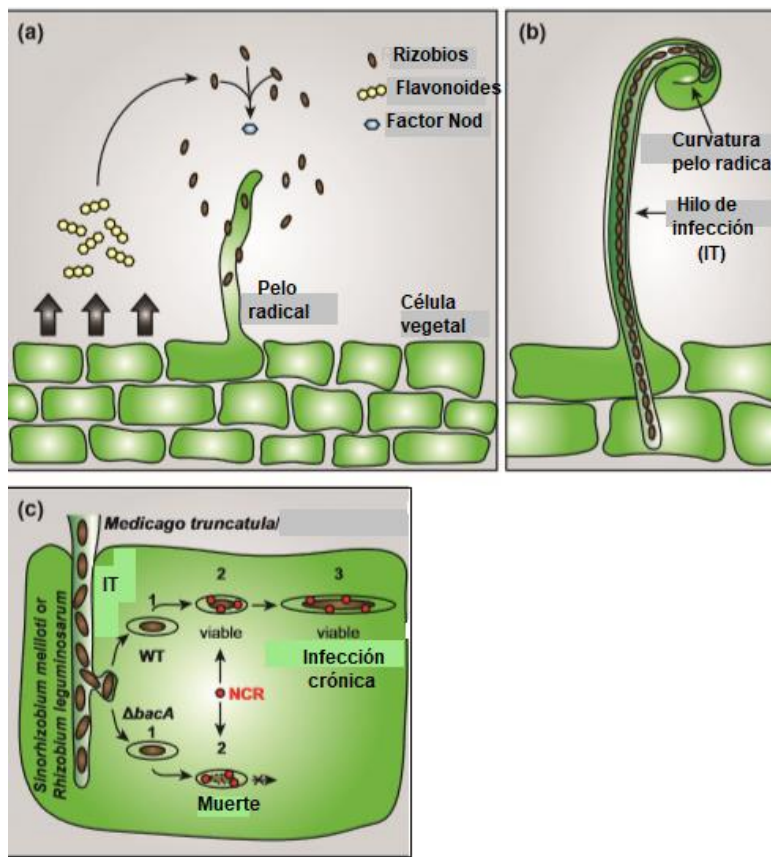


Figura 1.2: Rizobios interactuando con leguminosas. (a)

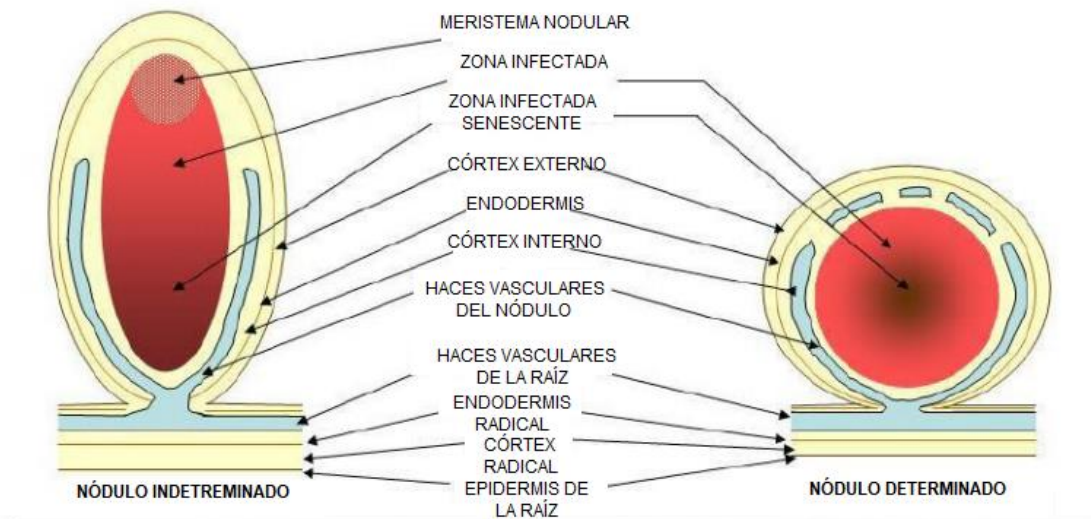
Las leguminosas secretan flavonoides que inducen en los rizobios la producción de factores *Nod*. **b)** La señalización de los factores *Nod* desencadena cambios en el desarrollo, incluidos la captura de rizobios en la curvatura de los pelos radicales. El crecimiento de la punta del pelo radical hacia el interior, da como resultado estructuras

tubulares llamadas hilos de infección (del inglés: *Infection Threads*) (IT), permitiendo que los rizobios entren en las células corticales de la raíz. **c)** Los rizobios escapan del hilo de infección y son llevados a la célula huésped a través de un proceso similar al de endocitosis encerrados por una membrana derivada del huésped. Estos compartimentos intracelulares se conocen como simbiosomas (1). En ciertas leguminosas como *Medicago truncatula*, los rizobios son rodeados con péptidos NCR (secretados por la planta) y diferenciados en bacteroides alargados (3). La proteína bacteriana $\Delta bacA$ es esencial para proteger a los rizobios contra la actividad antimicrobiana de los péptidos NCR (2). *WT*- *wild-type*. **Modificada de Haag et al. 2012.**

Para fijar el nitrógeno atmosférico, la planta necesita proporcionar un ambiente microanaeróbico, ya que la nitrogenasa bacteriana se inactiva irreversiblemente ante la presencia del oxígeno. Las células del nódulo de las leguminosas son permeables al oxígeno que atraviesa la barrera celular por difusión, permitiendo así que la planta reaccione al oxígeno disponible en el ambiente de la rizósfera. El mecanismo necesario para un ambiente microanaeróbico es la expresión de

la leghemoglobina en las células del nódulo infectadas, que reduce la concentración de oxígeno libre en el sistema de fijación de nitrógeno, siendo la responsable del color rosado del nódulo (Haag *et al.* 2012).

La localización de las divisiones celulares iniciales determina que el nódulo sea de tipo indeterminado (con meristema persistente) o determinado (sin meristema persistente) (**Figura 1.3**). Los nódulos de tipo indeterminados se caracterizan por la presencia de un meristema nodular persistente, constituido por un grupo de células que se dividen activamente por mitosis. Algunas de las células derivadas permanecerán como parte del meristema, mientras que otras se diferenciarán en células específicas. La existencia de un meristema persistente provoca que los nódulos indeterminados tengan generalmente forma alargada, ya que se forman continuamente nuevas células en el extremo distal del nódulo. Esto hace que todos los estadios del desarrollo nodular estén representados en un único nódulo, existiendo un gradiente de edad desde la zona apical o distal (células más jóvenes) a la zona basal o proximal (células más viejas). Cerca del meristema nodular se encuentra la zona de invasión. Algunas células de esta zona son invadidas por cordones de infección, generalmente son células más grandes. En el borde proximal de la zona de invasión se encuentran los bacteroides recientemente liberados de los cordones de infección. Éstos tienen forma alargada, todavía conservan la capacidad de dividirse y están rodeados por la membrana peribacteroidal.



Medicago truncatula



Lotus japonicus



Figura 1.3: Esquema comparativo de nódulos indeterminados y determinados. Modificada de Buchanan *et al.* 2000.

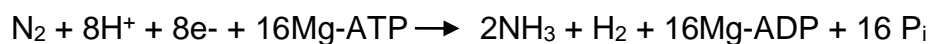
Luego de infectar la célula huésped, las bacterias se diferencian en un bacteroide, estructura capaz de fijar nitrógeno (**Figura 1.2**). Los rizobios desencadenan la formación de un nuevo órgano, el nódulo, en las raíces y tallos de las plantas leguminosas a través de una compleja comunicación cruzada entre la bacteria y el huésped. Toda la información genética necesaria para la formación de la estructura del nódulo se encuentra codificada en la planta huésped.

Cuando los hilos de infección (del inglés: *Infection Threads*) (*IT*) alcanzan las células huésped del primordio nodular en crecimiento, las bacterias se desplazan dentro del *IT* e incluso se dividen en su trayectoria al interior del pelo radical. Cuando las bacterias llegan a las células del primordio del nódulo, son

~ 10 ~

exocitadas del *IT* y al mismo tiempo son endocitadas por las células vegetales que forman el primordio. Esto da como resultado una nueva estructura llamada simbiosoma, que contiene intracelularmente a los rizobios (Haag *et al.* 2012). El simbiosoma presenta una serie de características que son indispensables para realizar la actividad fijadora de nitrógeno. En él se pueden distinguir la membrana peribacteroidea (Mpb), el fluido peribacteroideo (Fpb) y el bacteroide.

La fijación biológica de nitrógeno se lleva a cabo en los bacteroides que se encuentran en el citoplasma de las células del nódulo. La enzima nitrogenasa cataliza la reacción:



La nitrogenasa de los nódulos radicales posee características similares a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre: la capacidad de reducir acetileno y N_2 . Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación biológica de nitrógeno. Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos como succinato, malato y fumarato. Éstos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP. El amonio es el primer producto estable que se obtiene de la fijación de N_2 y puede ser asimilado por los bacteroides y transferido a la planta en forma de alanina. Durante el proceso de simbiosis, la planta también expresa la leghemoglobina. El nódulo fija nitrógeno atmosférico por un periodo de tiempo determinado después del cual ésta actividad decrece dando lugar a la lisis y luego la muerte del mismo. La senescencia nodular es un conjunto de

alteraciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales que termina en la muerte del nódulo, y puede desencadenarse, cuando las plantas son sometidas a estrés.

A pesar de las diferencias notables entre la simbiosis MA y la simbiosis nodular, ambas comparten la activación de la transcripción de un conjunto común de genes del huésped. Éstos genes requeridos por ambos tipos de simbiosis se denominan genes de simbiosis común "SYM" (del inglés: *Common Symbiosis Genes*) (Chen *et al.* 2007). Dentro del conjunto de genes comunes se encuentra el gen de la enzima proteína quinasa calcio calmodulina dependiente (CCaMK), clave en el establecimiento de las relaciones simbióticas en gramíneas y leguminosas (Chen *et al.* 2007; Santi *et al.* 2013). CCaMK es un regulador central en el desarrollo de la simbiosis. Consta de un dominio de autoinhibición "ID" (del inglés: *Autoinhibition Domain*), que se superpone parcialmente con el dominio de unión a calmodulina CaMBD (del inglés: *Calmodulin Binding Domain*) y un centro activo tipo quinasa. La presencia de un dominio de unión a calmodulina (CaM) y tres dominios de manos EF C-terminales de unión a calcio (del inglés: *EF C-terminal Hand Domains of Calcium Binding*) es una característica única que no ocurre en otras quinasas reguladoras. Un análisis de función estructural basado en la quinasa CaMKII, proteína animal implicada en la transmisión de señales neuronales, permitió la construcción de un modelo de activación de CCaMK. En ausencia de calcio, CCaMK se autoinhibe. El dominio ID asume una estructura helicoidal y actúa como un freno molecular alterando la actividad de la quinasa. Shimoda *et al.* (2012) postularon que, en ausencia de calcio, el sitio de autofosforilación conservado T265 de *L. japonicus* localizado en el dominio quinasa, participa en

una red de enlaces de hidrógeno (que implica los residuos S237, K264, E313 y R317), estabilizando la estructura helicoidal inhibitoria del *ID* (**Figura 1.4.a**). La fosforilación, o ciertas sustituciones de aminoácidos en T265 interrumpen esa red y liberan el freno molecular que resulta en organogénesis espontánea. En presencia de iones calcio (Ca^{+2}), que están unidos por los motivos de mano EF C-terminales, CCaMK se autofosforila en T265. Se considera que, en la autofosforilación, la carga negativa del grupo fosfato interrumpe la red de hidrógeno desestabilizando así el estado autoinhibitorio (**Figura 1.4.b**). La autofosforilación de CCaMK aumenta su afinidad de unión $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$, lo que indica una mayor accesibilidad del dominio de unión a calmodulina, *CaMBD*. Se cree que la unión $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ conduce a una reorganización estructural de los dominios autoinhibición/*CaMBD*, por lo que el segmento inhibidor adopta una conformación extendida y *CaMBD* no estructurado se convierte en helicoidal. Este cambio conformacional inducido abre la accesibilidad a la hendidura catalítica que resulta en una elevada actividad de fosforilación de sustrato de CCaMK (**Figura 1.4c**). La autofosforilación en S337 perjudica la unión $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ y previene la reorganización estructural del dominio autoinhibición *CaMBD*, estabilizando así el estado autoinhibido (**Figura 1.4d**).

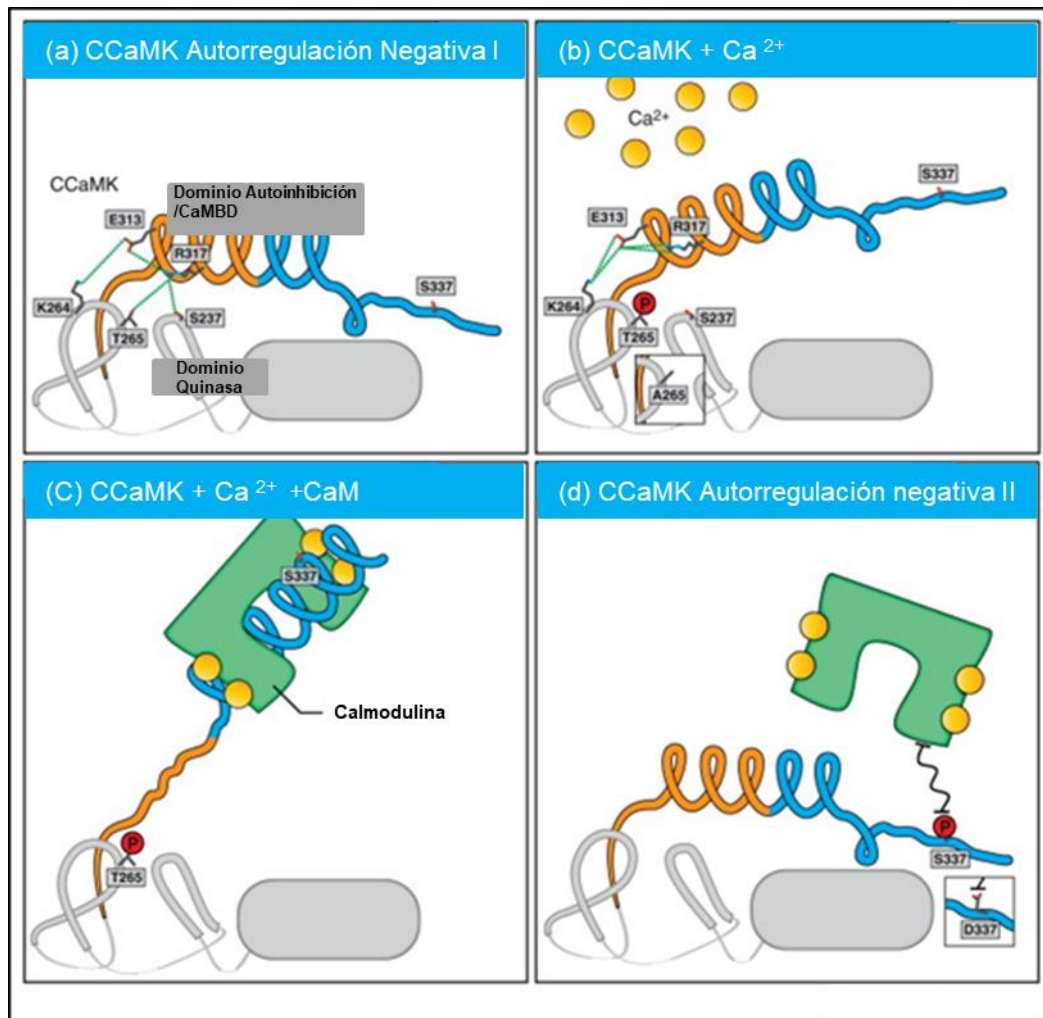


Figura 1.4: Regulación de CCaMK. Modificada a partir de Singh & Parniske 2012.

Los picos de calcio consisten en repetidos incrementos de la concentración del ion en los núcleos y en el citoplasma perinuclear. Dos canales iónicos no selectivos muy similares (con preferencia en potasio por sobre otros cationes) CASTOR y POLLUX, funcionan como canales compensadores equilibrando la pérdida de carga positiva por liberación de Ca^{+2} . Las oscilaciones de calcio son autónomas (propias de cada célula), con picos no sincrónicos entre células vecinas. Mediante la monitorización de los perfiles de oscilaciones de las células corticales sometidas a infección por rizobios u hongos MA, se registraron distintos perfiles oscilatorios de Ca^{+2} que caracterizan la fase previa, y durante la infección. Un cambio distintivo en la señal de calcio de baja a alta

frecuencia en las oscilaciones es exclusivo de células infectadas y durante la fase inicial de penetración y elongación de los *IT*

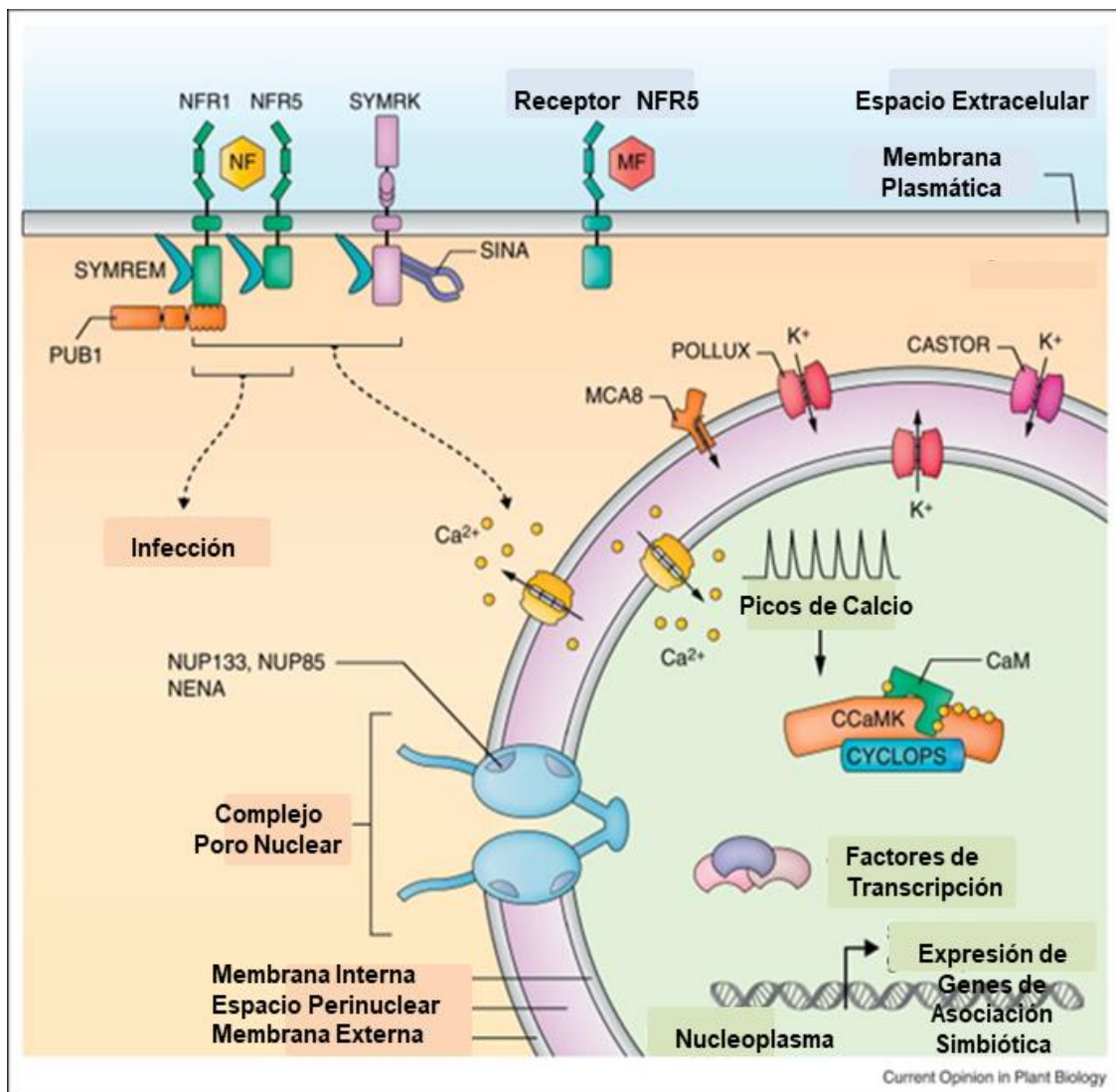


Figura 1.5: Transducción de señal simbiótica en las células de raíz. Percepción de Factores Nod de rizobios (FNs), en la membrana plasmática (MP), mediados por los receptores tipo quinasa incluyendo los receptores de *L. japonicus* (NFR1-NFR5) y en *M. truncatula* LYK3 y NFP. Un receptor tipo NFR5 puede mediar la percepción de un factor "Myc" (MF) derivado de hongos MA. PUB1: proteína U-box1 de *M. truncatula*, es una ubiquitina ligasa que al interactuar con otra proteína (no mostrada), ejerce una regulación negativa en la señalización de la nodulación. Los receptores simbióticos de la membrana plasmática interactúan con SYMREM1, una proteína específica que, aguas arriba, regula la nodulación y es requerida para la formación de los *IT*. En minutos, la percepción de los factores "Myc" por la membrana plasmática, conduce a una respuesta nuclear de calcio sostenida, la generación, decodificación y transducción de la misma es mediada por componentes comunes a ambos tipos de simbiosis. Posicionadas aguas arriba (SYMRK/DMI2, CASTOR/ POLLUX/ DMI1, NUP85, NUP133, NENA) o aguas abajo

(CCaMK/ DMI3, CYCLOPS/ IPD3) de la respuesta de calcio. **Modificada a partir de Singh & Parniske 2012.**

I.B. Transcripción reversa y cuantificación de RNA

La transcripción reversa RT (del inglés: *Reverse Transcription*) permite el uso del RNA como molde mediante la utilización de una transcriptasa reversa, transcribiendo el RNA a DNA complementario (*cDNA*). La integridad y pureza del RNA molde es muy importante para el éxito final. El primer paso es la síntesis de un híbrido DNA/ RNA. El cebador utilizado es un oligo DNA que unido al RNA es reconocido por la transcriptasa reversa comenzando la elongación de DNA complementario al RNA. La enzima también cuenta con una función RNasaH, que degrada la porción de RNA del híbrido. El DNA de simple cadena restante (*ssDNA*) sirve como molde para la formación de cDNA, mediante la actividad DNA polimerasa dependiente de DNA de la transcriptasa inversa.

La PCR cuantitativa (*qPCR*) se utiliza para detectar, caracterizar y cuantificar ácidos nucleicos. De manera habitual, en RT-*qPCR*, los transcritos de RNA se cuantifican por transcripción reversa en cDNA en primer lugar, y luego se lleva a cabo la *qPCR*. Sin embargo, en la *qPCR*, el marcaje con compuestos fluorescentes permite la cuantificación del DNA de doble cadena a medida que la PCR avanza. En la *qPCR* basada en fluorescencia permite la cuantificación de las moléculas de DNA amplificadas empleando el uso de un fluoróforo de unión al DNA doble cadena. Durante cada ciclo, se mide la fluorescencia y la señal de fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de DNA replicado, por lo cual, el DNA se cuantifica en "tiempo real". Cuando se utiliza *SYBR Green*, como colorante fluorescente sólo se puede examinar un solo

DNA blanco a la vez ya que el colorante se unirá a cualquier DNA doble cadena presente en la muestra (<https://www.e-allscience.com/blogs/news/cuales-son-las-diferencias-entre-pcr-rt-pcr-qpcr-y-rt-qpcr>).

II. Antecedentes

Para aumentar la productividad en los cultivos extensivos, se utilizan de manera continua grandes cantidades de sustancias agroquímicas, en particular los fertilizantes sintéticos. El uso continuo de estas sustancias químicas en la agricultura produce daños en el suelo, disminuyendo la capacidad de supervivencia de microorganismos beneficiosos, alterando las propiedades físico-químicas del mismo. Para lograr un cultivo de alto rendimiento, es necesario, un suelo con alto porcentaje de materia orgánica y microorganismos (Castillo, 2016).

El uso de microorganismos conjuntamente con fertilizantes genera una respuesta positiva en el proceso de crecimiento celular y segmentación de materia orgánica disponible en el suelo, generando nutrientes que van a ser asimilados por la planta (Núñez *et al.* 2012).

Desde hace más de una década, se propuso a *Brachypodium distachyon* como especie modelo, especialmente de las *poaceae* como trigo, ya que presenta características particulares como: un ciclo de vida corto y facilidad de cultivo, reproducción principalmente autógama, capacidad de ser transformada genéticamente y un genoma pequeño, lo que ha permitido completar su secuenciación con relativa facilidad. Con todo esto, se abrió un amplio abanico de posibilidades para la identificación de genes de interés agronómico, en los cereales cultivados de mayor importancia económica (Draper *et al.* 2001).

Dentro de la variedad de genes de interés agronómicos estudiados, el gen de la proteína quinasa calcio calmodulina dependiente (CCaMK) tiene la importancia de participar en la vía de activación de la señalización que conduce a la simbiosis arbuscular y en el proceso de desarrollo de la nodulación en

leguminosas para la fijación de nitrógeno. Los avances en la investigación de este gen proporcionan un método para regular y comprender dichos procesos de expresión y/o actividad de CCaMK en la planta.

La iniciación de la infección intracelular en leguminosas por simbiosis con rizobios y por MA es precedido por la inducción de oscilaciones de calcio alrededor y dentro del núcleo en las células epidérmicas de raíz. La quinasa calcio-calmodulina dependiente (CCaMK) es un mediador clave de la respuesta simbiótica en raíz, y aunque se han logrado muchos avances en el entendimiento de su funcionamiento, la decodificación de las señales de calcio y los eventos aguas abajo son poco conocidos. Las investigaciones se centraron en la caracterización de mutantes (Yano *et al.* 2008).

Una de las mutantes halladas en *Medicago truncatula* (Lévy *et al.* 2004) induce nódulos espontáneos, y fue denominada *DMI* (del inglés: *Does not Make Infection*).

Se comprobó que el gen *DMI3* de *Medicago truncatula* es homólogo a *CCaMK*. Además de analizar la similitud de secuencia genómica, se estudiaron los efectos de los mutantes *DMI1*, *DMI2* y *DMI3*, requeridos tanto para la nodulación como para la formación de la simbiosis MA. Los mutantes *DMI1*, *DMI2* y *DMI3* se encuentran bloqueados para la mayoría de las respuestas a factores *Nod*: tienen un fenotipo similar y no inducen ramificación del pelo radicular (sino que en su lugar provocan hinchamiento del pelo), ni expresión génica de nodulina temprana, ni división celular cortical. Sin embargo, se diferencian en su capacidad para responder a los factores *Nod* mediante la iniciación de los picos de calcio citoplasmático que se pierde en los mutantes

dmi1 y *dmi2*, pero no en *dmi3*. Esto, sumado al análisis comparativo de secuencia, indicaron que *DMI3* pertenece al grupo *CCaMK* (Lévy *et al.* 2004).

La percepción de los factores *Nod* en la planta, conduce a la inducción de las oscilaciones de calcio y la consecuente traducción de estas señales requieren del gen *DMI3* el cual codifica la proteína quinasa *CCaMK*. La regulación central de *CCaMK* es autoinhibida por un dominio que regula negativamente la actividad de la enzima. Gleason *et al.* (2006) demostraron que la eliminación del dominio de autoinhibición conduce a la autoactivación de la vía de señalización en la planta, con la resultante inducción de la nodulación y la expresión de los genes de nodulación en ausencia de bacterias. Numerosas deleciones en el dominio autoinhibición y en el dominio de unión a *CaM* entre los residuos 326-355 fueron realizadas para poner a prueba esta hipótesis. Estas construcciones fueron dirigidas por el promotor 35S en líneas de tipo *WT* y líneas *dmi3-1*, de *Medicago truncatula*. El análisis de todos estos datos, indican que *DMI3* coordina la expresión de los genes de nodulación y que la regulación de la quinasa a través de su autoinhibición es central para la regulación de la proteína (Gleason *et al.* 2006).

Los nódulos espontáneos formados a partir de líneas mutantes *snf* (del inglés: *spontaneous nodule formation*) en *Lotus japonicus* muestran ontogenia y características histológicas equivalentes a las descritas para los nódulos inducidos a partir de rizobios en plantas de tipo silvestres. La activación del programa de desarrollo de nódulos espontáneos fue demostrada por la expresión temprana de los genes *Enod2* y *Nin*, ambos con expresión aumentada en nódulos espontáneos y en nódulos por rizobios, y habitualmente usados como indicadores del proceso de nodulación (Tirichine *et al.* 2006).

La organogénesis se desencadena por los rizobios simbios, pero el huésped, es el que codifica el programa responsable de desarrollo y regulación de la construcción de los tejidos de nódulos (Tirichine *et al.* 2006).

A partir de una base de datos *ESTs* (del inglés: *Expressed Sequence Tags*) se obtuvieron los genes de referencia candidatos para la normalización de los datos de expresión génica en *Brachypodium*. Para la selección de los mismos se tuvo en cuenta la estabilidad de la expresión génica en los distintos tejidos de la planta y bajo diferentes condiciones de crecimiento (por ejemplo: tratamiento con hormonas, diferentes tipos de estrés ambiental). A partir de este estudio se seleccionó para este trabajo a *SamDC* como gen de referencia para la cuantificación de los transcritos de CCaMK en la qPCR. Los niveles de expresión de el gen de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (*SamDC*) presentaron más estabilidad frente a las diferentes condiciones de estrés ambiental (Hong *et al.* 2008).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- ◆ Contribuir al conocimiento de las asociaciones beneficiosas que se establecen entre plantas y microorganismos simbiotes a través del estudio del gen *CCaMK* en gramíneas.

Objetivos específicos

- ◆ Estudiar la expresión diferencial a nivel de transcritos de *BdCCaMK* (Bradi2g21790.1), ortólogo putativo de *DMI3* en *Brachypodium distachyon*.
- ◆ Clonación de las secuencias codificadoras de *TaCCaMK* y la región reguladora 5' de *BdCCaMK*.

2. HIPÓTESIS

- ◆ Existen diferencias en la expresión transcripcional del gen *CCaMK* codificador de la proteína quinasa calcio calmodulina dependiente, en los diferentes momentos del desarrollo y entre raíces y hojas de *Brachypodium distachyon*.

3. MATERIALES & MÉTODOS

I. Material vegetal

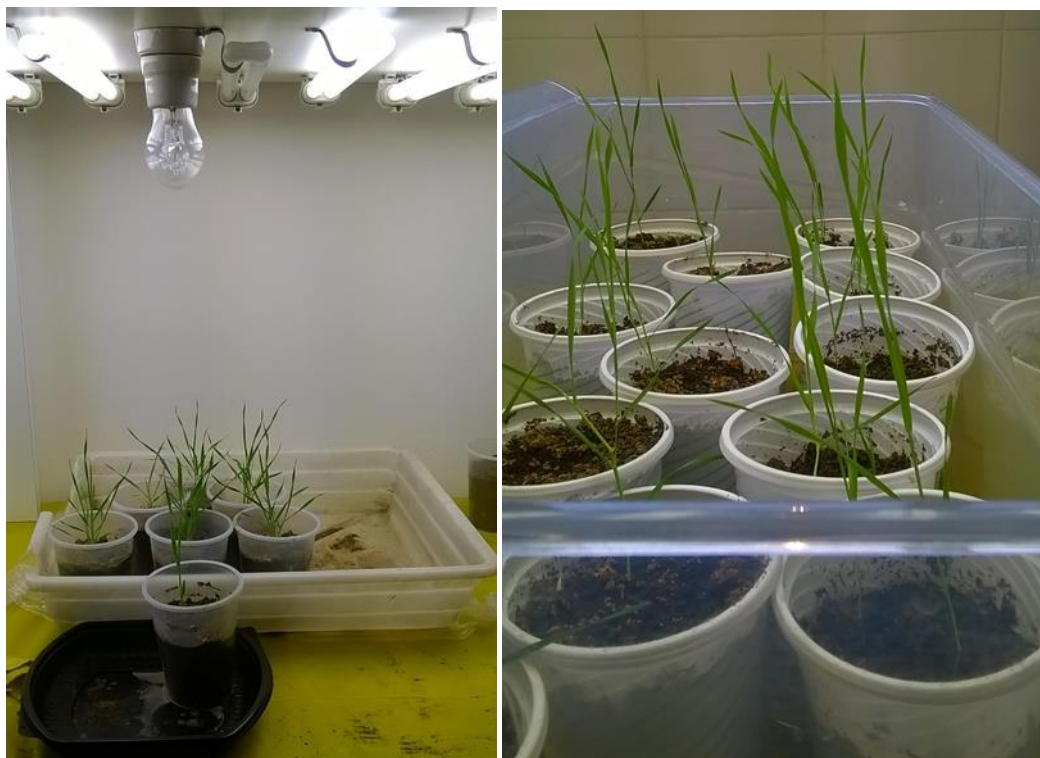
Para este estudio se utilizaron una línea diploide de *Brachypodium distachyon* Bd 21-3 ($2n=10$) y el cultivar ProINTA Federal de *Triticum aestivum* ($2n=42$).

Germinación de las semillas de *Brachypodium*

A las semillas de *Brachypodium* se les extrajo cuidadosamente con pinzas finas la palea y la lema. Luego se desinfectaron superficialmente por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (lavandina) 2% suplementado con 0,1% de *Tween* 20 durante 10 min. Las semillas se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril y fueron colocadas en placas de Petri con agua bidestilada estéril sobre un papel, bajo condiciones de esterilidad. Las semillas se trataron en frío a 4°C durante 2 días para sincronizar la germinación y cubrir los requerimientos de vernalización.

Condiciones de crecimiento

Tanto las plántulas de trigo como las de *Brachypodium* crecieron bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad en una sala controlada a temperatura ambiente. Como fuente de luz se utilizaron lámparas fluorescentes e incandescentes a una intensidad aproximada de 3000 a 4000 lux a la altura de las plantas. El sustrato fue una mezcla de tierra y arena en una proporción 3:2 con riegos regulares de solución *Hoagland*.



Figuras 3.1: Imágenes de plántulas de *Brachypodium* durante su crecimiento.

Tabla 3.1: Solución *Hoagland*: componentes y soluciones de reserva para su preparación†

COMPONENTE	SOLUCIÓN DE RESERVA	ml SOLUCION DE RESERVA/1L
Macronutrientes		
2M KNO ₃	202 g/L	2,5
1M Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	236g/0,5L	2,5
EDTA Hierro	15 g/L	1,5
2M MgSO ₄ *7H ₂ O	493 g/L	1
1M NH ₄ NO ₃	80 g/L	1
1M KH ₂ PO ₄	136 g/L	0,5
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	2,86 g/L	1
MnCL ₂ *4H ₂ O	1,81 g/L	1
ZnO ₄ *7H ₂ O	0,22 g/L	1
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,051 g/L	1
H ₃ MoO ₄ *H ₂ O	0,09 g/L	1
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,12 g/L	1

† La solución se ajusta a pH 6. Preparada según (Hoagland, D.R., and Arnon, D.I. 1938) con modificaciones menores.

Selección de los ejemplares

Para los estudios de expresión génica en *Brachypodium* se realizaron las extracciones en distintas etapas del desarrollo de las plantas. Se seleccionaron 10 plantas de trigo y 4 de *Brachypodium* por cada etapa del desarrollo. Los periodos del desarrollo de *Brachypodium* considerados fueron tres: la fase vegetativa tardía, en la que las plántulas fueron cosechadas a los 14 días después de la germinación (ddg) la fase de transición que transcurrió a los 21 días posteriores a la germinación y la fase reproductiva a los 39 días posteriores a la germinación. Para tener una referencia objetiva del momento de muestreo en las diferentes etapas se siguió el estado de desarrollo según se ve en la **Figura 3.2**.



Figura 3.2: Etapas del desarrollo de *B. distachyon*. 1) Fase vegetativa tardía. 2) Fase de transición. 3) Fase reproductiva. Tomada y modificada a partir de Hong *et al.* 2008.

Toma de muestras

Una vez elegidos los ejemplares de ambas especies se procedió al muestreo del material vegetal fresco. De todas las plantas se pesaron 0,1gr de lámina

foliar y de raíz. Para asegurar que la toma de muestra de raíz fuese limpia se realizaron lavados con agua corriente.

II. Genes de referencia en trigo y *Brachypodium*

La PCR cuantitativa (qPCR) aplicada en este trabajo permite cuantificar los niveles de mRNA en relación a niveles del transcrito de un gen que se denomina de referencia. Así se normalizan los datos para evitar errores o desviaciones durante los procedimientos de preparación de muestras y análisis de datos. Un gen de referencia ideal se expresa a un nivel constante en todos los tejidos de las plantas bajo diferentes condiciones de crecimiento. Los genes de referencia más utilizados participan en procesos celulares básicos, tales como el mantenimiento de la estructura celular y el metabolismo celular primario, y por lo general no deberían verse afectados por factores externos (Hong *et al.* 2008).

El gen de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (*SamDC*) es considerado un gen de mantenimiento (del inglés: *housekeeping gene*) (Hong *et al.* 2008). Comúnmente, los genes de mantenimiento tienen expresión constitutiva. La *SamDC* cataliza la reacción:



utilizando como cofactor al piruvato (<http://www.uniprot.org/uniprot/O24575>):

la S-adenosilmetionina (SAM) es convertida a S-adenosilmetioninamina, la forma decarboxilada de SAM (dcSAM). El SAM decarboxilado es un dador aminopropílico en la síntesis de poliaminas (Mellidou *et al.* 2016). La acumulación de transcritos de *SamDC* es omnipresente en diferentes órganos en *Brachypodium*, incluidos el callo, la espiga, la raíz, la hoja y la vaina (Hong *et al.* 2008).

III. Cuantificación de transcritos del gen *BdCCaMK* en *Brachypodium distachyon*

La cuantificación relativa de los transcritos de CCaMK en *Brachypodium* se realizó a nivel de cDNA previa transcripción reversa del RNA a cDNA. Posteriormente los cDNA correspondientes a los transcritos fueron cuantificados mediante qPCR.

IV. Extracción de RNA y síntesis de cDNA. Transcripción Reversa

El RNA total fue extraído a partir de muestras frescas de hojas y raíces en ambas especies con Trizol (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento completo de extracción fue realizado según el siguiente protocolo:

1. Pesar 100mg de hojas frescas, colocarlas en un microtubo de 1,5ml y congelar en N₂ líquido.
2. Moler en frío con pistón.
3. Agregar 500µl de Trizol frío.
4. Continuar moliendo.
5. Agregar 500µl de Trizol frío.
6. Mezclar con Vortex.
7. Dejar reposar 5min. a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 10min. a 12000rpm, en frío (4°C).
9. Conservar el sobrenadante.
10. Agregar 200µl de cloroformo.
11. Mezclar con Vortex, por 15seg.
12. Reposar 3min. a temperatura ambiente.
13. Centrifugar 10min. a 12000rpm en frío (4°C).
14. Conservar el sobrenadante.
15. Agregar 250µl de isopropanol.
16. Mezclar por inversión.
17. Centrifugar 10min. a 12000rpm en frío (4°C).
18. Descartar el sobrenadante con micropipeta.
19. Agregar 1ml de EtOH 70% (preparado con H₂O DEPC 0,1%).
20. Centrifugar 5min. a 7200rpm en frío (4°C).
21. Descartar el sobrenadante con micropipeta.
22. Secar en flujo 10min.

23. Agregar 50µl de H₂O DEPC, colocar 15min. a 55°C.
24. Mezclar con Vortex.
25. Guardar a -20°C.

Luego de cada extracción se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para verificar la cantidad y calidad del RNA extraído.

El RNA posteriormente se transcribió a cDNA por acción de la enzima *SuperscriptIII* (Lifetech, USA). La transcriptasa reversa utilizada es una forma genéticamente modificada de la RT- M-MLV del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) y, de acuerdo al fabricante, mejoraría la vida media y la estabilidad térmica de la original. *SuperScript™* tiene la particularidad de poseer la actividad RNasaH reducida.

La síntesis de DNA copia (cDNA) se realizó utilizando oligodT como cebador. Los oligodT se unen por complementariedad de bases a las secuencias poli A, producto de la poliadenilación, que ocurre al final de la transcripción efectuada por la RNA polimerasa II.

El procedimiento de síntesis de cDNA se realizó según el siguiente protocolo:

1. Agregar los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga:
 - 1µl de oligo(dT) 20 [200-500ng] o de oligonucleótido gen específico [2pmol] 10pg-5µg de RNA total.
 - 1µl de mezcla de dNTP [10mM] (10 Mm de dATP, dGTP, dCTP y dTTP).
 - Ajustar el volumen en 13µl con H₂O DEPC.
 2. Calentar la mezcla a 65°C por 5min. e incubar en hielo por 1min.
 3. Colectar el contenido del tubo por centrifugación y añadir:
 - 4µl de buffer de síntesis de primera cadena [5X].
 - 1µl de DTT [0,1M].
 - 1µl RNaseOUT™ (Invitrogen, Cat# 10777-019).
 - 1µl de enzima SuperScript™ III RT (200 U/µl).
 4. Homogenizar con micropipeta.
 5. Incubar a 50°C por 30-60min.
- Inactivar la enzima calentando la reacción a 70°C por 15min.

V. Visualización del DNA extraído y de los productos de PCR en gel

El DNA extraído como así también los productos de la amplificación de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 0,8-1,0% teñidos con bromuro de etidio (0,1µg/ml) o *SYBR Safe* (1µl *Sybr green* 1x10000 por ml de *buffer*). En cada pocillo del gel se sembró un volumen de 2µl de muestra con 6 µl de azul de bromofenol (BPB). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 Volts/cm durante aproximadamente 30 minutos en *buffer* TAE 1X (40mM Tris, 5mM de ácido acético glacial (NaOAc) y 0,7mM EDTA, en un volumen final de 100ml de agua destilada y ajustado a pH 8.0 con ácido acético glacial). La visualización del ADN se realizó con luz ultravioleta en un transiluminador UVP Modelo M-20. La concentración de DNA se determinó visualmente y como referencia se utilizaron muestras de DNA con concentraciones conocidas.

VI. RT-qPCR y cuantificación a través de *Real Time PCR*

El cDNA correspondiente a cada transcripto fue posteriormente cuantificado mediante PCR en Tiempo real (*Real Time PCR*). Cada muestra de tejido fue tomada por duplicado (dos repeticiones biológicas). A su vez cada repetición biológica se examinó por duplicado, en dos repeticiones técnicas.

En el caso de *Brachypodium* el gen de referencia que se utilizó fue el *SamDC*: S-adenosilmetionina descarboxilasa.

El equipo *7500 Real-Time PCR System*, (ABI 7500 de *Applied Biosystem*, USA) fue utilizado para realizar la cuantificación de los transcriptos a través de *SYBR Green*. Este colorante emite fluorescencia cuando está unido al DNA de doble cadena (en inglés, *dsDNA*) y la intensidad de la misma aumenta de manera proporcional a la concentración de *dsDNA* presente en la reacción. El volumen total de reacción fue de 13µl. Se utilizó la *FastStart Universal SYBR Green*

Master (Rox)mix (Roche, USA) a la cual se le agrego el cDNA de la muestra. La master mix contiene todos los elementos necesarios para la amplificación, incluidos los colorantes *SYBR Green* y el *Rox*. El fluoróforo *Rox* se agrega como colorante fluorescente de referencia pasiva y permite que las lecturas de fluorescencia del equipo ABI7500 se modifiquen al contenido real de reactivos en la solución de reacción.

VII. Análisis de expresión relativa del transcripto BdCCaMK a través del programa *REST*[®] (*Relative expression software tool*)

Para establecer una relación de expresión basada en la eficiencia de la PCR en tiempo real y la desviación del punto de cruce (CP) (del inglés: *Crossing Point*) de una muestra desconocida versus un control se ha desarrollado una herramienta de software denominada *REST*[®] (del inglés: *Relative Expression Software Tool*) (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/>) que compara dos grupos con hasta 16 datos en una muestra y 16 en un grupo control (Pfaffl *et al.* 2002). El valor de CP o CT corresponde al ciclo umbral donde el nivel de fluorescencia alcanza la línea umbral determinada por el equipo *real time*. El umbral de detección se establece de acuerdo a la fluorescencia de fondo y equivale a 10 veces la desviación estándar del valor de emisión.

$$ratio = \frac{E_{Blanco}^{\Delta CP_{blanco}(control-muestra)}}{E_{Referencia}^{\Delta CP_{preferencia}(control-muestra)}}$$

Modelo matemático utilizado en *REST*[®] (Pfaffl 2001)

Éste modelo matemático permite determinar la cuantificación relativa de un gen blanco en comparación a un gen de referencia. La proporción de expresión relativa ($R=Ratio$) de un gen blanco, es calculada en base a los valores de E (Eficiencia de Amplificación) y la desviación de CP de una muestra desconocida versus un control, y la expresión en comparación a un gen de referencia.

- ◆ E_{target} : es la eficiencia del transcripto correspondiente al gen blanco en la RT-PCR.
- ◆ E_{Ref} : es la eficiencia del transcripto correspondiente al gen de referencia en la RT-PCR.
- ◆ ΔCP_{blanco} : es la diferencia de CP entre los transcriptos de la secuencia blanco en los tratamientos, considerando a uno de ellos el control
- ◆ $\Delta CP_{Referencia}$: es la diferencia de CP entre los transcriptos de la secuencia del gen de referencia en los tratamientos, considerando a uno de ellos el control.

Para el cálculo de R deben ser conocidos los valores individuales de las eficiencias y de las desviaciones (ΔCP) de los transcriptos investigados. Los valores de E son calculados en función de la concentración de cDNA y de cantidad de ciclos correspondientes al umbral de detección (CP). A mayor concentración de cDNA son necesarios un menor número de ciclos para llegar a ese umbral (Pfaffl 2001).

VIII. Clonado de secuencias

Las secuencias de la región codificadora de *CCaMK* en trigo y de la región 5' de *CCaMK* en Bd 21-3 fueron amplificadas a través de PCR con la enzima *Pfu* (*Invitrogen, USA*) a partir de cDNA de hojas de trigo y de DNA genómico de hojas de Bd 21-3 respectivamente. La enzima *Pfu* DNA Polimerasa mediante su actividad exonucleasa 3'→5 produce una tasa de error 10 veces inferior a la *Taq* DNA polimerasa en el copiado por complementariedad. Otra diferencia práctica importante entre ambas DNA polimerasas es que la *Pfu* genera extremos romos de *dsDNA* y la *Taq* extremos cohesivos por incorporación de un dinucleótido A en su extremo.

Las proporciones de los distintos componentes de la PCR se detallan en la siguiente **Tabla 3.2**:

Tabla 3.2: Componentes y volúmenes de reacción de PCR

COMPONENTES DE REACCIÓN	VOLUMEN
Agua	6µl
Buffer 10X con MgSO ₄	1,3µl
Solución de dNTP	1,3µl
Cebador Forward	0,5µl
Cebador Reverse	0,5µl
DNA	3µl
<i>Pfu</i> DNA polymerase	0,325µl
VOLUMEN FINAL	13µl

IX. Vector de clonado.

Se utilizó el plásmido vector *Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning* (**Figura 3.5.**) para el clonado separado de la secuencia codificadora de *CCaMK* de trigo y la región 5' de *CCaMK* de *Brachypodium*. Se utilizaron los productos de PCR obtenidos con *Pfu*.

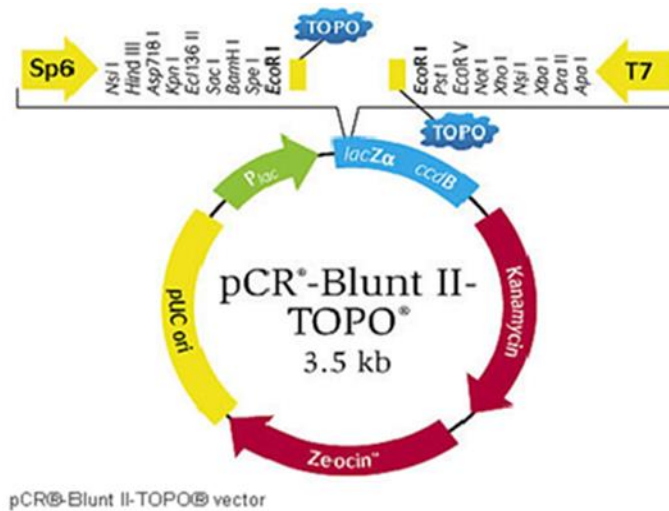


Figura 3.3: Esquema del vector *Zero Blunt TOPO*

Se realizó la mezcla de reacción a través de la inclusión del producto de amplificación de *Pfu* con el plásmido mencionado según los componentes de la **Tabla 3.3**. Se procedió a mezclarla suavemente y posteriormente se conservó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La inserción se produjo de manera directa en el plásmido por acción de la enzima Topoisomerasa I, que se encuentra covalentemente unida a los extremos del plásmido linearizado comercial. El producto de la ligación se guardó a -20°C .

Tabla3.3: Componentes de la reacción de ligación en vector *TOPO*

REACTIVOS	VOLUMEN
Producto de PCR	1 a 3 μl
Solución salina	1 μl
Agua	Hasta vol. Final
PCR II Blunt-TOPO	1 μl
VOLUMEN FINAL	6μl

X. Análisis bioinformático.

La información referida a accesiones, secuencias nucleotídicas y/o proteicas se obtuvieron de las bases de datos presentes en el *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los análisis incluyeron la utilización de programas de uso libre del mismo *NCBI* como *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool* (Zhang *et al.* 2000), *ClustalW* (Larkin *et al.* 2007) y *Rest* (Pfaffl *et al.* 2002).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que las plántulas de *Brachypodium* fueron muy susceptibles al ataque de un hongo, posiblemente *Fusarium*, lo que dificultó la manipulación y los tiempos para la obtención de los ejemplares sanos.

I. Secuencia de CCaMK en *Brachypodium* y trigo

La secuencia de la enzima CCaMK en *Brachypodium* se localizó a través de *BLAST* de la proteína conocida en alfalfa (*Medicago sativa*, GenBank: ACX47471.1) de 524 aminoácidos, con proteínas de *Brachypodium* publicadas en *NCBI*. El máximo *score* se obtuvo con la secuencia XP_003566106.1 de *Brachypodium* (**Figura 4.1.**), con una identidad de 70% y coincidencia del 84%. A partir de la secuencia predicha se llega al gen del locus LOC100830001, en el cromosoma 2.

Alignments

PREDICTED: calcium and calcium/calmodulin-dependent serine/threonine-protein kinase-like [Brachypodium distachyon]

Sequence ID: ref|XP_003566106.1| Length: 524 Number of Matches: 1

Range 1: 6 to 514

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
760 bits(1962) 0.0() Compositional matrix adjust. 364/518(70%) 438/518(84%) 9/518(1%)						
Features:						
Query	5	TRKLSDEYEVSEILGRGGFSVVRKGTKKSSIEEEKSQVAIKTLRRLGASNNPSSGLPRK				64
		+R+LSD+YEV ++LGRGGFS+VR+G KS + QVAIKTLRRLG P+ + +				
Sbjct	6	SRRLSDDYEVVDVLRGGFSIVRRGVSKS-----EGNIQVAIKTLRRLG----PAMMGMQ				56
Query	65	KDVGEKSTIGFPTMRQVSVSDTLTNEILVMRRIVENVSPHPNVIDLYDVYEDTNGVHLV				124
		+ + G P +QVS+SD LLTNEILVMRRIVENV+PHPNVI+L+DVYED +GVHLV				
Sbjct	57	QGSKGAPSSGLPVWKQVVISDALLTNEILVMRRIVENVAPHPNVIINLHDVYEDVHGVHLV				116
Query	125	LELCSGGELFDRIVAQDKYSETEAATVVHQIASGLEAVHRANIVHRDLKPENCLFLDVRK				184
		LELCSGGELFDRI+ +D+YSE +AA V+ QIASGL+A+H+ANI+HRDLKPENCLFLD ++				
Sbjct	117	LELCSGGELFDRIIGRDYSEFDAAVISQIASGLKALHKANIHRDLKPENCLFLDRKE				176
Query	185	DSPLKIMDFGLSSVEEFTDPVVGLFGSIDVVSPEALSQGGKITTKSDMWSLGVILYILLSG				244
		+S LKIMDFGLSSVE+F+DP+V LFGS+DYVSPEALS+ +++ SDMWS+GVILYILLSG				
Sbjct	177	NSTLKIMDFGLSSVEFSDPIVALFGSVDVVSPEALSQGEVSAASDMWSVGVILYILLSG				236
Query	245	YPPFIAQNNRQKQOMIMNGNFSFYKTKWKGISQAAKDLISSLLTVDPKRPASALELLSDP				304
		PPF A NR+KQQ I+ G FSF E TWK IS +AKDLISSLL+V+P KRP+A +LL P				
Sbjct	237	CPPFHAATNREKQQRILQGEFSSQEHWTKTISSSAKDLISSLLSVEPYKRPASDLLLHP				296
Query	305	WVKGEKAKDVQMDPEIVSRLQSFNARRKLRAAAIASVWSSTIFLRTKKLKSIVGSDYLKE				364
		WV G+ AK MD E+VS+LQ FNARRKLRAAAIASV SS + LRTK+L+SL+G++DL				
Sbjct	297	WVIGDCAKQDLMDAEVSKLQRFNARRKLRAAAIASVLSKVALRTRKRLSLLGTHDLTS				356
Query	365	DEIENLRMHFKKICADRNATLSEFEVVKAMNMLSLIPFASRIFDLFDNDRDGTVMRE				424
		+E++NLR+HF +ICAD +NATLSEFE+VLKAM M SL P A R+FDLFDNDRDGTVMRE				
Sbjct	357	EELDNLRHLHFSRICADGENATLSEFEQVLKAMKMDSLAPLAPRVDFDLFDNDRDGTVMRE				416
Query	425	IILGFSLLKNSKGEDALRLCFQMYDTRSGCISKEEVASMLRALPYDCLPIDITEPGKLD				484
		IILG SSL+NS+G+DALRLCFQMYDTRSGCISKEE+ASMLRALP +CLP DI EPGKLD				
Sbjct	417	IILGLSSLRNSRGDDALRLCFQMYDTRSGCISKEELASMLRALPEECLPGDIAEPGKLD				476
Query	485	EIFDLMDANNNDGKVTDFEFKAAMQRDSSLQDVVLLSSIR		522		
		E+FD MDAN DG+VTFDEFKAAMQ+DSSLQDV+LSS+R				
Sbjct	477	EVFDEMDANGDGEVTFDEFKAAMQRDSSLQDVVLLSSLR		514		

Figura 4.1: Alineamiento de las secuencias proteicas CCaMK de *Brachypodium* y alfalfa.

Luego, a partir de la secuencia nucleotídica de *Medicago sativa* GQ890699 se realizó un nuevo *BLAST* con toda la colección de las gramíneas identificándose nuevamente la secuencia de *Brachypodium* mencionada y la de trigo HM595635.1.

II. Selección de cebadores para cuantificación

A partir de secuencias del locus LOC100830001 se diseñaron con el programa *NCBI/Primer-BLAST*, 6 pares de cebadores posibles para cuantificación designados BdCCaMK1 al BdCCaMK6. La ubicación de cinco pares de

cebadores se encuentra esquematizada en la **Figura 4.2.**, obtenida del programa mencionado. En la parte superior se grafica la hebra templado de la secuencia usada para la elección de los cebadores, correspondiente a la secuencia predicha XP_003566106 codificadora de la CCaMK presente en el LOC100830001 en la base de datos *Gene*. El programa *NCBI/ Primer-BLAST* elabora una vista gráfica que distingue a los exones que forman el transcrito. En este caso hay 7 exones.

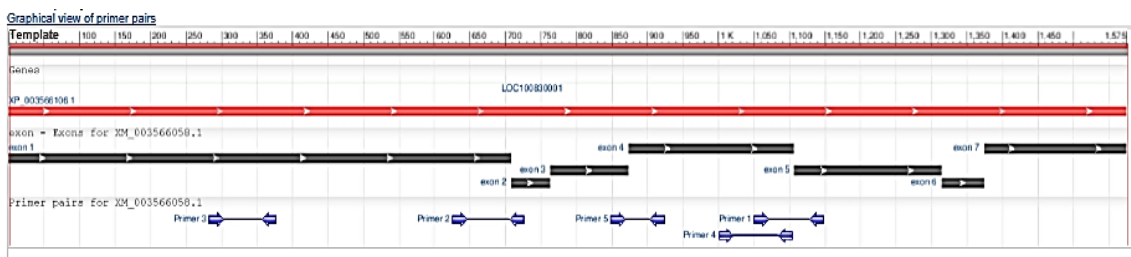


Figura 4.2: Vista gráfica de los pares de cebadores diseñados. En azul los fragmentos que se amplificarían con cada uno de los pares de cebadores, ubicados en posición a los exones (en negro). Se agrega para información el código del Locus y la longitud de la secuencia blanco para el diseño de los cebadores. En la gráfica no se encuentra BdCCaMK6 que se diseñó posteriormente.

Estos cebadores se probaron para elegir aquel que se usaría en la cuantificación de la secuencia blanco CCaMK. Los cebadores se encuentran descritos en la **Tabla 4.1.**, con la longitud de amplificación esperada sobre cDNA. Los pares de cebadores BdCCaMK3 (en el exón 1) y BdCCaMK4 (en el exón 4) están contenidos dentro de un solo exón y por lo tanto podrían amplificar fragmentos similares en el DNA copia (cDNA) o en el DNA genómico (gDNA) de *Brachypodium*. El resto de los pares de cebadores comparten dos exones. Como se observa en la **Figura 4.2.** amplifican de acuerdo a lo esperado 94 y 104pb tanto en cDNA como en el gDNA de *Brachypodium*.

Tabla 4.1: Cebadores diseñados para la cuantificación del transcrito BdCCaMK

Designación	Secuencia5'→3'	Tm	Producto de PCR en pb
BdCCaMK1F	ACCCATGACCTTACCTCCGA	59.96	98
BdCCaMK1R	ACGAGCTTAAGACTGTCGCA	60.04	
BdCCaMK2F	CAGAAGCACTCTCGAGGCAA	60.04	100
BdCCaMK2R	CGTACTTTACCACCCGTAGG	59.89	
BdCCaMK3F	GCGCCGCATCCAAATGTTAT	59.97	94
BdCCaMK3R	TGTCAAGTGGTGGACTCGTG	60.18	
BdCCaMK4F	TGAGCAGCAAAGTGGCATTG	59.68	104
BdCCaMK4R	GGCACTTTTTACTTCGGCGT	60.04	
BdCCaMK5F	TTACAAAAGGCCCACTGCGA	60.18	75
BdCCaMK5R	TACTCTAGAACGAACCGCGT	60.39	
BdCCaMK6F	GGGAACCATGACCTTACCT	60	120
BdCCaMK6R	TTCATTGCTTTCAGCACCTG	59.9	

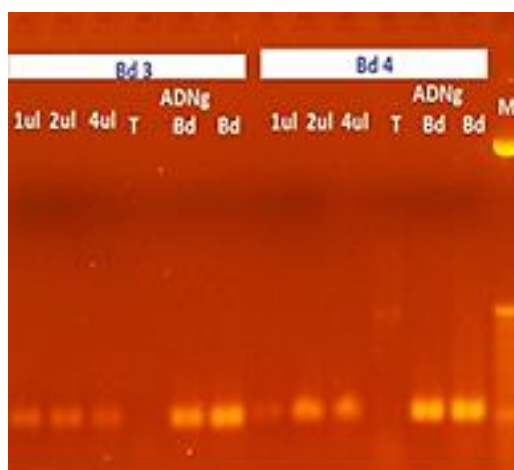


Figura 4.3: Amplificación de pares de cebadores BdCCaMK3 y BdCCaMK4: Bd3 y Bd4 refieren a los pares de cebadores BdCCaMK3 y BdCCaMK4 respectivamente. M corresponde a la calle con indicador de peso molecular de 100pb. Agregado a las calles se encuentran los volúmenes de los DNA utilizados.

Además, para confirmar que la secuencia sobre la que amplificaba, era efectivamente la secuencia blanco de CCaMK se realizaron PCR sobre el DNA

genómico, combinando los cebadores: BdCCaMK5F con BdCCaMK1R y anidada: BdCCaMK4 en el producto de amplificación BdCCaMK5F con BdCCaMK1R. El resultado fueron varias amplificaciones en distintos rangos de pares de bases, lo que confirmó que se trataba realmente del gen buscado y evitar así la secuenciación del mismo (**Figura 4.4.**).

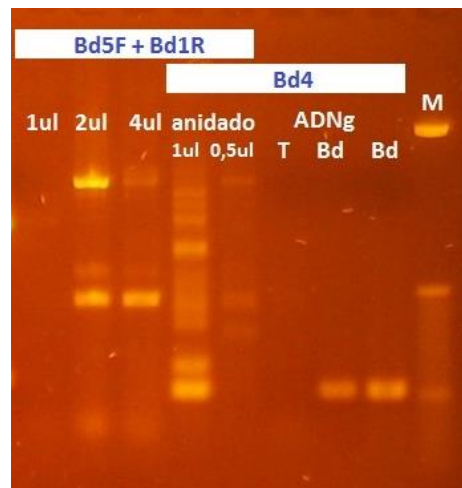


Figura 4.4: Producto de amplificación de cebadores combinados. Bd5F + Bd1R refieren a los pares de cebadores BdCCaMK5F y BdCCaMK1R. M corresponde a la calle con indicador de peso molecular de 100pb. Agregado a las calles se encuentran los volúmenes de los DNA utilizados.

De todas las amplificaciones producto de PCR a partir de DNA genómico de trigo y *Brachypodium* solo BdCCaMK3 y BdCCaMK4 fueron seleccionados como posibles candidatos para la cuantificación dado que presentan una única amplificación esperada en el rango de 100pb. Los pares de cebadores BdCCaMK1, BdCCaMK2 y BdCCaMK6 amplifican más bandas de la esperada en el rango de 100pb, lo que generaría errores por el apareamiento inespecífico en la cuantificación.

SAM y SAM1 fueron seleccionados como cebadores posibles del gen de referencia para cuantificación en la qPCR. Para llegar a la elección de SAM se

procedió a realizar una PCR a partir de gDNA y analizar los productos de amplificación.



Figura 4.5: Resultados de las amplificaciones producto de PCR a partir de gDNA de trigo y *Brachypodium* para los cebadores SAM y SAM1. De cada cebador se sembraron tres concentraciones de 1, 2 y 4µl de producto para analizar la efectividad de la amplificación. Además, se comprobó amplificación en trigo y *Brachypodium* al mismo tiempo. Gel de agarosa al 2%. Marker utilizado 100pb *DNA Ladder*.

Entre SAM y SAM1 se eligió el primero como par de cebadores candidatos para la qPCR dado que se expresa en trigo y en *Brachypodium* al mismo tiempo y además amplificó en un rango de pares de bases esperado.

Tabla 4.2: Cebadores diseñados para amplificación del gen de referencia.

Designación	Secuencia 5'→3'	Tm	Longitud producto de amplificación	Secuencia Blanco
SAMF	CGCCTTGAGATCACCTTCTC	59,9	107pb	EST GenBank DV48267 6.1
SAMR	CGTGCAAGATCCAGAACAGA	59,9		
SAM1F	GTCCGGCTTCTTGTTGCCTA	60,3	108bp	
SAM1R	TTCCTCTCCCTCAGAACGGG	60,6		

III. Búsqueda de *SamDC* en genoma de trigo

En el caso de *Brachypodium*, los datos sobre la ubicación de *SamDC* en el genoma se extrajeron a partir del ID publicado por Hong *et al.* 2008 (Tabla1).

Se realizó una búsqueda de homología de secuencia del gen de *Brachypodium* en secuencias de *Triticum aestivum* utilizando el programa *BLAST* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_024455597.1), encontrándose la secuencia HQ121401.1 con 86% de identidad y 91% de cobertura entre secuencias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A pesar de los intentos para amplificar fragmentos de este gen con los cebadores diseñados de *SamDC*, no fue posible llevarlo adelante y no se pudo finalmente cuantificar el transcripto.

IV. Curva estándar cuantificación

Para comprobar si los cebadores BdCCaMK3 y BdCCaMK4 fueron correctamente elegidos en la primera etapa de selección de acuerdo a las amplificaciones analizadas, se procedió a realizar una qPCR previa transcripción reversa utilizando a *SamDC* como gen de referencia. Se realizaron corridas electroforéticas de las amplificaciones a partir de cDNA de raíz, hoja y flor de *Brachypodium*.

Con respecto al gen de referencia *SamDC*, el par de cebadores SAM fue elegido. Las curvas en la **Figura 4.6.** muestra gráficamente que BdCCaMK3 tiene eficiencia de amplificación similar a SAM y arrojó valores estadísticos apropiados para realizar los estudios de cuantificación posteriores.

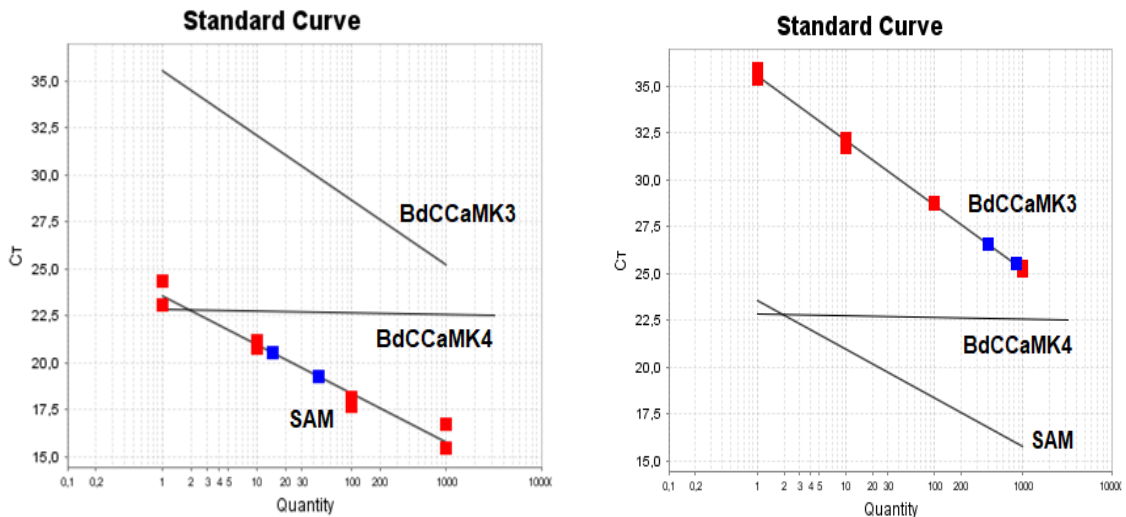


Figura 4.6: Curva de amplificación por PCR en tiempo real de los cebadores candidatos BdCCaMK3 y BdCCaMK4. SAM: R^2 : 0,964 EEF%: 142,2. BdCCa3: R^2 : 0,997 EEF%: 95,29. Las diluciones seriadas se realizaron 1/10 y los productos de amplificación se visualizan con el colorante *Sybr Green*.

Al analizar los valores estadísticos comprobamos que la pendiente de BdCCaMK4 (*slope*: 0,003) es muy diferente a los valores que arrojan las pendientes de BdCCaMK3 (*slope*: -2,392) y de SAM (*slope*: -2,603). Por lo tanto, de nuestros dos posibles candidatos, solo BdCCaMK3 es el par de cebadores elegido para realizar cuantificaciones posteriores.

V. Análisis de los resultados de cuantificación de BdCCaMK a través del software REST[®]

El programa informático REST[®] (*Relative expression software tool*) permitió analizar los niveles de expresión de CCaMK respecto al gen de referencia *SamDC* en las 16 muestras de *Brachypodium distachyon* analizadas (dos repeticiones biológicas, de las cuales, por cada una se examinaron dos repeticiones técnicas). Los Momentos 1 y 2 descritos en M&M corresponden a las etapas del desarrollo de *Brachypodium* vegetativa tardía y de transición respectivamente. El tercer momento corresponde al inicio de floración. En esta última etapa, no se pudo detectar transcritos y los resultados no se presentan.

Coincidentemente, la cantidad y calidad del cDNA extraído fueron menores a las de las etapas anteriores. Lo que indica que diversos factores influyeron en la obtención de resultados negativos.

En la **Tabla 4.3.** se destaca que la mayor cantidad del transcripto se expresa en el Momento 2 o fase de transición en hoja, pero no en raíz. Las raíces expresan el transcripto más que las hojas en ambos momentos de desarrollo (todas las diferencias son muy significativas, p-valor= 0,001). En la **Figura 4.7** se grafica en barras la tasa de expresión relativa obtenidas en las cuatro comparaciones con las correspondientes desviaciones estándar, que son muy amplias a pesar de las significaciones estadísticas. Se muestran solo las barras correspondientes a CCaMK porque el gen de referencia *SamDC* siempre conserva valor constante igual a 1.

Tabla 4.3: Resultados de la cuantificación relativa mediante qPCR del transcripto de BdCCaMK

Comparaciones	Número de repeticiones	Ratio de expresión CCaMK	Ratio de expresión normalizado CCaMK	p-valor	Factor de regulación	Conclusión
Momento 2/ Raíz vs Hoja	4	0,001	0,005	0,001	-1680	Mayor expresión de CCaMK en raíz que en hoja
Momento1/ Raíz vs Hoja	4	0,005	0,011	0,001	-1156	
Raíz/ Momento 1 vs Momento2	4	0,483	0,609	0,001	1653	Mayor expresión de CCaMK en M 2 que en M1
Hoja/ Momento1 vs Momento2	4	2,880	1,330	0,001	1137	

Referencia: La columna "Ratio de expresión normalizado" se refiere a datos tomados con la expresión de *CCaMK* normalizada en función de *SamDC*.

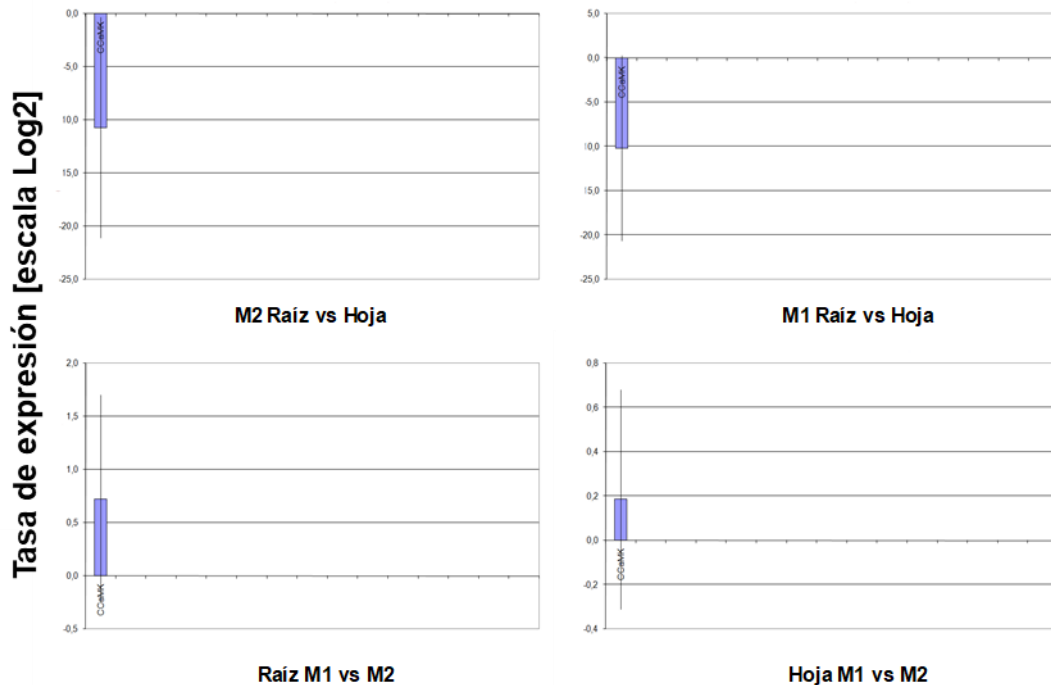


Figura 4.7: tasa de expresión relativa (media \pm DS)

VI. Amplificación y ligación de secuencias de trigo y *Brachypodium*

Se realizó el clonado de la secuencia codificadora del gen de trigo *TaCCaMK* a partir de DNA copia (cDNA) y la correspondiente a la región 5' del gen CCaMK presente en el DNA genómico (gDNA) de *Brachypodium distachyon*. A partir de ambas secuencias sería posible formular una construcción que expresara el gen *TaCCaMK* con y sin variaciones de las mismas. Es decir, entre otras posibles, se podrían comparar efectos de la expresión de la proteína completa con los efectos de la proteína deletionada en las posiciones correspondientes al dominio quinasa (Yang *et al.* 2010). Este cambio en la secuencia modificaría la autofosforilación de la proteína y la cascada de señales para inducir la formación de nódulos en forma constitutiva en leguminosas, es decir, sin intervención de rizobios.

Así mismo, el éxito de la expresión regulada de ambas variantes depende de que la región 5' contenga los elementos reguladores *cis* correspondientes a una zona promotora. El análisis *in silico* de la región 5' de *BdCCaMK* con programas bioinformáticos existentes podría destacar los motivos presentes en la región. Este análisis supera los objetivos de este trabajo.

Estas construcciones podrían utilizarse en la transformación genética de leguminosas o gramíneas.

VI.A. Amplificación de los transcritos correspondientes a *TaCCaMK*

Para amplificar el transcrito *TaCCaMK* a partir de cDNA de trigo se utilizaron diferentes combinaciones de cebadores (**Tabla 4.4.**) cuyas secuencias se obtuvieron de Yang *et al.* (2010).

Tabla 4.4: Cebadores utilizados en la amplificación de secuencias de trigo y *Brachypodium distachyon*

Designación	Secuencia	Tm	Origen	DNA blanco
RealTAF	5'-CTCCTGCCCTCCAAGGCTCTA-3'	62	Yang et al. 2010	cDNA trigo PIF
RealTAR	5'-AGTCGTCGGACAGCCTTCTA-3'	62	Yang et al. 2010	cDNA trigo PIF
Nest1F	5'-GCCAGTTGAAGCTGCTCTTT-3'	58	Yang et al. 2010	cDNA trigo PIF
Nest1R	5'-TTGGATCTGAATGGAGAAGC-3'	58	Yang et al. 2010	cDNA trigo PIF
Nest2F	5'-TGCTGAACAATGTCAACAACCTG-3'	58	Yang et al. 2010	cDNA trigo PIF
Nest2R	5'-TGAATGGAGAAGCCTACTGCTGC-3'	58	Yang et al. 2010	cDNA trigo PIF
Prom1F	5'-TGGGGATTAGTTTGCCTAGAGA-3'	60,8	Este TFG	gDNA Bd 21-3
Prom2F	5'-GCTGCTCTTTGCAGTGTGAC-3'	62,4	Este TFG	gDNA Bd 21-3
Prom1R	5'-GACATTGCGCAGCAAGATTA-3'	58,4	Este TFG	gDNA Bd 21-3

Referencia: cDNA, DNA copia; gDNA, DNA genómico.

Con los cebadores *Nest2F* y *Nest2R*, *forward* y *reverse* respectivamente, se amplificó el fragmento total correspondiente al ORF del gen *TaCCaMK*

presente en el cDNA de trigo, de una longitud de 1580pb. Con los cebadores *Nest1F* y *Nest1R* no hubo amplificación a partir del cDNA debido a que ambos cebadores se encuentran fuera de la región codificadora sobre las regiones no traducidas 5' y 3', como se confirma a partir de las amplificaciones negativas de la **Figura 4.8**. Por otra parte, fue posible amplificar las secuencias más cortas de 145pb, coincidiendo con el fragmento amplificado publicado del par de cebadores *RealTAF-RealTAR* (**Figura 4.8**., calles del gel marcadas como "TA"). Las amplificaciones de raíz con cebadores *Nest2* no dieron resultados positivos. Éste resultado negativo pudo haberse debido a poca concentración de transcripto, ya que no se prestó atención al momento de desarrollo de la planta porque el objetivo principal era clonar por amplificación la secuencia blanco. La realización de PCR anidadas *RealTAF* y *RealTAR* en los fragmentos amplificados por los cebadores *Nest2* confirmaron que efectivamente se trata del transcripto correspondiente a ORF del gen *TaCCaMK* buscado (resultado no documentado).

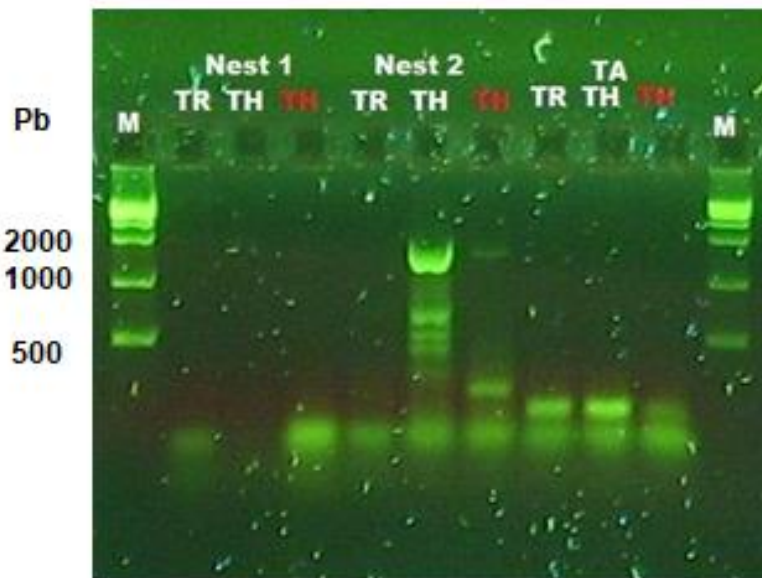


Figura 4.8: Gel con amplificaciones de los cebadores *Nest1*, *Nest2* y *RealTAF/TAR* a partir de cDNA de trigo. Las muestras corresponden a tejidos de hoja (TH) y raíz (TR). Las siglas en color rojo corresponden a una fecha de extracción de RNA diferente del resto de las muestras. Gel agarosa al 1%. El indicador de peso molecular utilizado fue *Sharp DNA Ladder RD001-Bio América*, cuyas bandas visibles en el gel de agarosa corresponden a 2000pb, 1000pb y 500pb.

VI.B. Amplificación de las secuencias promotoras de *Brachypodium*

Para llegar a obtener la amplificación de la región 5' correspondiente al gen de la proteína quinasa II dependiente de calcio en *Brachypodium distachyon*, CCaMK, se ingresó a la página del *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) con el LOC100830001. Para poder visualizar la región promotora en detalle se ingresó a la sección "regiones genómicas, transcripciones y productos" y para completar la vista de las bases y su correspondiente ubicación se ingresó a la solapa de "herramientas" sección "vista de texto de secuencia". En ella se determinó el codón ATG de comienzo de la transcripción correspondiente a la base 19161586. "Aguas arriba" de esa base se detectó para posteriormente amplificar el fragmento de 983 pares de bases entre 19160603 y 19161585 del cromosoma 2 que corresponde a la región 5' putativa del gen.

La amplificación de la región 5' de *Brachypodium* se realizó con los cebadores *Prom1F* y *Prom1R* sobre gDNA utilizando, como en el caso de trigo, la enzima polimerasa *Pfu*. Para asegurar que efectivamente se trataba del fragmento buscado, se realizó una PCR anidada sobre el producto de amplificación obtenido con los cebadores *Prom2F* y *Prom1R*. En la **Figura 4.9**. se muestra la secuencia de la región 5' putativa del *BdCCaMK* con la ubicación de los cebadores.

```

5' -TGGGGATTAGTTTGCCTAGAGA-3' Prom1F
1  gttttgccccattagtttccctagagaaatthaatatttgctgcattttttgggggggtgtt
61  accctagtgaaaacatctgtctggaaccatcaatataattatthaagcaggatataattcct
121 tgtttccatgagtaattttcgtttgctgatgtgcttaaatttttagtctcgtcatatt
181 cacccaattttctgaatctgatcacaatattcaggtcaatacccttgcattttttaaat
5' -GCTGCTCTTTGCAGTGTGAC-3' Prom2F
241 gtgtagcagtagtatttgccttgctcggaacagcccgcctgctctttgcagtgatgacatactgaa
301 tcagacgagagatcaaccgagggagtgctaagtaagaagcacgtggttaggccaagca
361 tacctaagatctgaattttttacactgctcactgcctgacgaaaaactcccataataa
421 tgtaacacaatgcaatagcaactaaactagccagggctcaccgagtggaagaccaaataca
481 agtagccacagagcagtggaacttggtcaacacaattatthttggcctggcatcttctt
541 cccatcatctaatttgctctattcttgctcatcttgccctctccgcaaaaataattacttga
601 tgagtttattccctttgttggttggtgcacatgtccctttcttctgcatcacaatctt
661 aagcatcccattggttgctctttgtataatggctcgatattagctgtttatataatgt
721 ctctttctggtttctactccaaccactgtttccagtttgctcctgctgtttccaatc
781 tttcttctccccagagacctctatgatcaatttgctcttctgtacagcttactatthttg
841 atttctgcatgaaacagacagagtgatgctggtttactgccaatthttgagtgcttgtgc
901 tctctattattacctgtatttgctccttcagtttaggtttttgttcaataaccagttg
5' -GACATTGCGCAGCAAGATTA-3' Prom1R
961 gggtttggtaatcttgcctcccaATGTCACAACCTGAAAGCAGAAGGCTGTCTGATGACT
Proteína M S T T E S R R L S D D Y

```

Figura 4.9: Región putativa 5' del gen *BdCCaMK*. Secuencia de 983 bases correspondiente a la región 5' del gen *BdCCaMK* en letras minúsculas, entre las bases 19160603 y 19161585 del cromosoma 2. Región codificadora en letras mayúsculas, a partir de 19161586. En rojo secuencias de cebadores con su ubicación en la secuencia subrayada. En azul, comienzo de la secuencia proteica codificada.

VII. Ligamiento de amplicones a plásmido de clonado

La región codificadora de trigo (aproximadamente 1580pb, amplificada con el par de cebadores *Nest2F* y *Nest2R*) y la región 5' de *Brachypodium* (de 984pb, amplificada con el par de cebadores *Prom1F* y *Prom1R*) fueron ligadas por separado al plásmido *pCR®-Blunt II-TOPO® vector* (Life technologies, USA).

Previamente a la ligación se verificó la cantidad y calidad de los productos de amplificación a través de electroforesis horizontal en gel de agarosa. El vector admite la ligación de fragmentos de DNA de extremos romos como los producidos por la polimerasa *Pfu*, utilizada en lugar de la polimerasa *Taq*, por producir menores tasas de error en la amplificación. La ligación se llevó adelante a través de la acción de la topoisomerasa I que se encuentra covalentemente unida en el extremo 3' de cada hebra del vector comercial linearizado.

El *kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning* utilizado provee los reactivos necesarios para realizar una reacción de PCR control que amplifica un fragmento de 800pb que se puede ligar al vector. El control de 800pb y el fragmento de interés ligados fueron detectados en geles de agarosa (2 UI por muestra diluidos a volúmenes de siembra finales de 10 µl).

5. CONCLUSION

- i. Se identificó a las secuencias codificadoras de CCaMK en *Brachypodium* y se cuantificaron los transcritos en hojas y raíces de distintos momentos del desarrollo de la planta. Se encontró mayor nivel de transcritos en raíces que en hojas y a 21 días de la siembra que a 14 días.
- ii. Se identificó, aisló y clonó separadamente la región 5' correspondiente al transcripto CCaMK (XP_003566106) de *Brachypodium* y la región codificadora del gen ortólogo en trigo. Se encuentran disponibles para realizar construcciones que permitan comprobar la funcionalidad de ambos elementos en genomas heterólogos, por ej. Lotus.
- iii. Partiendo del conocimiento de los dominios regulatorios de la enzima y de su secuencia se pueden realizar construcciones quiméricas que van a permitir analizar la expresión en distintas condiciones de crecimiento y en interacción con rizobios y micorrizas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AllScience. Ciencia, tecnología y ambiente. Actualizada: (2018). Fecha de consulta: junio de 2018. Disponible en: <https://www.e-allscience.com/>
- Buchanan, B.B; W. Gruissem; R. L. Jones. (2000). (eds) Biochemistry and molecular Biology of Plants. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists.1367.
- Castillo-Arteaga D., Burbano-Rosero M., Otero-Ramírez D., Fernández-Izquierdo P. (2016). Degradación de oxalato por bacterias oxalotróficas asociadas a plantas del género *Oxalis* sp. en regiones Andinas del departamento de Nariño, Colombia. Rev. Univ. Salud 1:69-78.
- Chen C., Gao M., Liu J., Zhu H. (2007). Fungal symbiosis in rice requires an ortholog of a legume common symbiosis gene encoding a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. Plant Physiology 145:1619–1628.
- Chen C., Ané J.M., Zhu H. (2008). *OsIPD3*, an ortholog of the *Medicago truncatula* DMI3 interacting protein IPD3, is required for mycorrhizal symbiosis in rice. New Phytologist 180:311–315.
- Draper J., Mur L., Jenkins G., Ghosh-Biswas G., Bablak P., Hasterok R., Routledge A. (2001). *Brachypodium distachyon*. A New Model System for Functional Genomics in Grasses. Plant Physiology 127:1539-1555.
- Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonafante P., Barker DG. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. Plant Cell 17:3489-3499.
- Genre A., Chabaud M., Balzergue C., Pagés V., Novero M., Rey T., Fournier J., Rochange S., Bécard G., Bonfante P., Barker D. (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. New Phytologist 198:179-189.
- Gianinazzi S., Gollotte A., Binet Marie-Noelle., Tuinen D., Redecker D., Wipf D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. Springer 20:519-530.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B.W., Oldroyd, G.E.D. (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. Nature 441:1149-1152.

- Gough C. and Cullimore J. (2011). Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 24:867-878.
- Hoagland D.R., & Arnon, D.I. (1938). The water-culture method for growing plants without soil. *Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Circ.* 347-353.
- Haag A., Arnold M., Mika K., Kerscher B., Dall 'Angelo S., Zanda M., Mergaert P., Ferguson G. (2012). Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*–legume symbiosis. *FEMS Microbiology Reviews* 37:364-383.
- Hong S.Y., Seo P.J., Yang M. S., Xiang F., Park M.C. (2008). Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology* 8:112.
- Mellidou I., Moschou P., Loannidis N., Pankou C., Gémes K., Valassakis C., Andronis E., Beris D., Haralampidis K., Roussis A., Karamanoli A., Matsi T., Kotzabasis K., Constantinidou H., Roubelakis-Angelakis K. (2016). Silencing S-Adenosyl-L-Methionine Decarboxylase (SAMDC) in *Nicotiana tabacum* Points at a Polyamine –Dependent Trade-Off between Growth and Tolerance Responses. *Frontiers in Plant Science* 7:379.
- Núñez-López V., Martínez-Damián M., Colinas-León M. (2012). Fisiología pos cosecha de albahaca (*Occimum basilicum L.*) con y sin acolchado. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18:307-315.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G. (2007). ClustalW and Clustal X versión 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-8. DOI: [10.1093/bioinformatics/btm404](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404).
- Lévy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet P.-E., Ané M.-J., Lauber E., Bisseling T., Dénairé J., Rosenberg C., Debelle F. (2004). A putative Ca⁺² and Calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303:1361-1363.
- Limpens E. and Bisseling T. (2014). Cyclops: A new vision on rhizobium-induced nodule organogenesis. *Cell Host & Microbe* 15:127-129.
- Oláh B., Brière C., Bécard G., Dénarié J., Gough C. (2005). Nod factors and a

- diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal* 44:195-207.
- Parniske M. (2008). Arbuscular mycorrhizal: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6:763-775.
- Pfaffl M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:2002-2007.
- Pfaffl M., Horgan G., Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30:1-10.
- Pirkouhi M., Nobahar A., Dadashi M. (2012). Effects of Variety, planting pattern and density of plant phenology traits basil plants (*Ocimum basilicum L.*). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 4:1221-1227.
- Kuhn H., Kuster H., Requena N. (2010). Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 185:716-733.
- SantiC., Bogusz D., Franche C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany* 111:743-767.
- Shimoda Y., Han L., Yamazaki T., Suzuki R., Hayashi M. Imaizumi-Anraku H. (2012). Rhizobial and fungal symbioses show different requirements for calmodulin binding to calcium calmodulin- dependent protein kinase in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 24: 304-321.
- Singh S. and Parniske M. (2012). Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Plant Biology* 15:444-453.
- Sosa-Rodríguez T., Nieves-Sánchez J., Gutiérrez-Morales E., Cortés-Cruz F. (2006). Interacción micorrizas Arbusculares *Trichoderma harzianum*(*Moniliaceae*) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens*(*Poaceae*). *Acta Biológica Colombiana* 11:43-54.
- Tirichine, L., James, E. K., Sandal, N., Stougaard, J. (2006). Spontaneous root-nodule formation in the model legume *Lotus japonicus*: a novel class of mutants nodulates in the absence of rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:373-382.
- Tirichine L., Anraku H., Yoshida S., Murakarmi Y., Madsen L., Miwa H.,

- Nakagawa T., Sandal N., Albrechtsen A., Kawaguchi M., Downie A., Sato S., Tabata S., Kouchi H., Parniske M., Kawasaki S., Stougaard J. (2006). Deregulation of a Ca^{+2} /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441:1153-1156.
- Yang C., Li A., Zhao Y., Zhang Z., Zhu Y., Tan X., Geng S., Guo H., Zhang X., Kang Z., Mao L. (2010). Overexpression of a Wheat CCaMK Gene reduces ABA sensitivity of *Arabidopsis thaliana* during seed germination and seedling growth. *Plant Molecular Biology Reporter* 29:681-692.
- Yano K., Yoshida S., Muller J., Singh S., Banba M., Vickers K., Markmann K., White C., Schuller B., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Murooka Y., Perry J., Wang T., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Parniske M. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *PNAS* 105:20540-20545.
- Wang B., Yeun L., Xue Jia-Yu., Liu Y., Ané Jean-Michel., Qiu Yin-Long. (2010). Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytologist* 186:514-525.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., & Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

ANEXO I

ABREVIATURAS

MA	Micorrizas Arbusculares
APP	Aparato de Pre-penetración
ATP	Trifosfato de Adenosina
BdCCaMK	Proteína quinasa calcio calmodulina dependiente de <i>Brachypodium distachyon</i>
Bd 21-3	<i>Brachypodium distachyon</i> accesión 21-3
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPB	azul de bromofenol
CaMBD	<i>Calmodulin Binding Domain</i> , Dominio de Unión a Calmodulina
CCaMK	Enzima proteína quinasa calcio calmodulina dependiente
cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia
CP	<i>Crossing Point</i> , Punto de Cruce
dcSAM	forma decarboxilada de SAM
ddg	días después de la germinación
DMI	<i>Does not Make Infection</i> , no genera infección
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
E	Eficiencia de amplificación
EF-C	Dominios de manos C-terminal
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i> , marcador de secuencia expresada
Fpb	Fluido peribacteroideo
HFMA	Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares
ID	<i>Autoinhibition Domain</i> , dominio de autoinhibición
IT	<i>Infection threads</i> , hilo de infección
M-MLV	Virus de la Leucemia Murina de Moloney
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	<i>Murashige Yskoog</i>
Mpb	Membrana peribacteroidea
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nod	<i>Factor nodulation</i> , factor de nodulación
qPCR	PCR cuantitativa
R	Ratio

REST [®]	<i>Relative Expression Software Tool</i> , Herramienta de Software de Expresión Relativa
RT-qPCR	Transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SamDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
snf	<i>spontaneous nodule formation</i> , formación de nódulos espontáneos
SYM	<i>Common Symbiosis Genes</i> , genes de simbiosis común
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de simple cadena
TaCCaMK	Proteína quinasa calcio calmodulina dependiente de trigo
WT	<i>Wild Type</i> , tipo salvaje