



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN EcROS1 VINCULADO A LA
APOMIXIS EN *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees**

TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTADA POR:

Damir Simón

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dr. Juan Pablo Selva

Bahía Blanca, Mayo 2023



Laboratorio de Biotecnología Vegetal

CERZOS (CONICET-UNS)

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN *EcROS1* VINCULADO A LA
APOMIXIS EN *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees**

TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS:



Damir Simón

Damir Simón

TESINISTA



Dr. Juan Pablo Selva

Juan Pablo Selva

DIRECTOR

AGRADECIMIENTOS

Como de costumbre, me caracteriza terminar las cosas justo en el último momento, así que lo más probable es que estos agradecimientos se queden escuetos. Voy a intentar resumir, aunque nunca se me da bien, como ya sabrán los afortunados que reciben mis mensajes de voz.

Agradezco con mi alma entera a mis padres que siempre estuvieron apoyándome en todo momento, a veces con más paciencia y a veces con menos (me hago cien por ciento responsable de esto último). Ellos supieron cuando comprender y cuando ponerse firmes. Si no hubiese sido así, aún no estaría escribiendo estas palabras. Nunca me faltó nada, ellos se aseguraron de que fuese de esa manera. No me alcanzan las palabras para expresar cuanto los quiero. Los amo con todo mi corazón.

Me considero afortunado de tener las amistades que hoy en día me acompañan. Algo bien habré hecho para rodearme de tan lindas personas. Muchas veces siento que no las merezco. Para todos y cada uno de ellos mis cariños más profundos.

Una mención especial para Cristian, mi compañero de aventuras, este viaje no hubiera sido el mismo sin este pequeño al lado. Gracias por todo negrito.

Pauli, mi roomie, mi segunda hermana. Me arrastró del brazo todo el famoso último tirón de la carrera, e incluso ya desde mucho antes. Gracias a ella me volví un profesional en batir claras para hacer merengue.

Abri, mi hermanita verdadera, la más grande, la inteligente de la familia (yo heredé la belleza). Un ejemplo de superación, de siempre querer estar mejor, pelearla, ir más allá, de nunca conformarse. Su felicidad es mi felicidad.

No podía no mencionar a mis nenes, mis bebotes, mis hermosos gatitos, peludos, compañeros, gritones, y últimamente pulgocitos. Son la dosis de serotonina diaria que uno necesita. Branca, Marto y Leny, dejen de querer salir a la noche que se está poniendo fresco como para dejar la ventana abierta.

Y principalmente quiero agradecer a mi director, el Dr. Juan Pablo Selva, por toda la dedicación e inmensa ayuda durante la realización de este trabajo. Fue un camino largo, pero acá estamos.

Quisiera dedicarles palabras a cada persona que quiero, porque sé que se lo merecen, pero realmente no me alcanzaría el tiempo ni las hojas. Vuelvo a agradecerles por todo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN	6
1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 Apomixis	8
1.2 Importancia de la Apomixis	9
1.3 Apomixis en <i>E. curvula</i>	11
1.4 Regulación de la apomixis	12
2 HIPÓTESIS	14
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos	14
4 MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1 Material vegetal	15
4.2 Extracción de ADN	15
4.3 Extracción de ARN	15
4.4 Búsqueda de ortólogos en bases de datos	16
4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
4.6 Diseño de cebadores	16
4.7 Ligación de los productos de PCR	17
4.8 Transformación bacteriana	17
4.9 Repique y PCR en colonia	18
4.10 Extracción de ADN plasmídico (Miniprep)	18
4.11 Secuenciación y análisis bioinformático	18
4.12 Reacción de retrotranscripción (RT)	19
4.13 PCR en tiempo real (PCR cuantitativa o qPCR)	19
5 RESULTADOS	20
5.1 Búsqueda de genes ortólogos	20

5.1.1 Búsqueda en bases de datos propias	20
5.1.1 Búsqueda en las bases de datos de NCBI.....	23
6 DISCUSIÓN	30
7 CONCIUSIÓN	31
8 BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

Apomixis se refiere a la formación de semillas evitando los procesos de meiosis femenina y fertilización, resultando en descendencias genéticamente idénticas a la planta madre. Este modo reproductivo no está presente en los principales cultivos y se especula que su incorporación podría traer grandes ventajas. Sin embargo, no se conocen aun las bases genéticas que lo determinan y regulan. El pasto llorón, *Eragrostis curvula*, es un modelo único para el estudio de la apomixis por sus características particulares como la ausencia total de meiosis, la conservación de la relación de ploidía embrión: endosperma entre semillas sexuales y apomícticas y la disponibilidad de genotipos, tanto con distintos modos reproductivos (sexuales, facultativos y apomícticos obligados) como con diferentes niveles de ploidía.

Recientemente, al analizar genes diferencialmente expresados en plantas apomícticas facultativas bajo situaciones de estrés hídrico, las cuales cambian su frecuencia de aparición de sacos embrionarios apomícticos, se encontró el gen EcROS1-like. Este gen codifica para una glicosilasa involucrada en la desmetilación del ADN, proceso por el cual se regula la expresión de genes. Con la evidencia del control epigenético de la apomixis en pasto llorón, se hipotetiza que además de la existencia de determinantes genéticos del carácter, existe un silenciamiento de la expresión de los mecanismos sexuales por metilación del ADN, donde este gen podría cumplir un rol importante.

Debido a esto, se planteó la búsqueda de secuencias homólogas a la familia de genes *dme/ros1* de *Arabidopsis thaliana* en las bases de datos de transcritos y del genoma de referencia de *E. curvula*. Luego se desarrollaron cebadores específicos para obtener amplicones de genotipos con distinto modo reproductivo (sexual: OTA-S, apomíctico facultativo: Don Walter y apomíctico obligado Tanganyika). Los amplicones fueron clonados y secuenciados y las secuencias fueron analizadas en busca de diferencias entre ellas. Finalmente se diseñaron cebadores de PCR en tiempo real para evaluar la expresión del gen EcROS1-like en inflorescencias de los distintos genotipos evaluados.

Se lograron identificar las secuencias homólogas al gen EcROS1-like en las bases de datos de transcriptomas y genoma de referencia de *E. curvula*. Con la secuencia a nivel genómico se estableció que la estructura del gen está compuesta por 17 exones, un sitio de inicio de la transcripción y un sitio de poliadenilación. El alineamiento de dicha secuencia genómica con el transcripto EcROS1-like permitió determinar que es una secuencia parcial de dicho gen compuesta por el intrón 10 y los exones 11, 12 y 13 del gen predicho en el genoma de referencia. El BLASTX con la base de datos SwissProt demostró que la secuencia del gen EcROS1-like presenta homología con las secuencias de DME y ROS1 de *Arabidopsis* coincidiendo en cantidad de exones y largo total con estos genes.

Si bien los estudios previos del gen EcROS1-like mostraron diferencias de expresión de este en el genotipo facultativo Don Walter bajo condiciones de estrés hídrico, relacionadas a variaciones en el nivel de expresión de apomixis, en este trabajo donde se comparó la estructura y la expresión de dicho

gen en genotipos con distinto modo reproductivo, no se observaron diferencias atribuibles al modo reproductivo.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Apomixis

El término apomixis proviene del griego, donde *apo* significa “ausencia” y *mixis* “mezcla”. Este se refiere a la formación de semillas que evita los procesos de meiosis femenina y fertilización, resultando en descendencias genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler 1984).

En la reproducción sexual típica (tipo *Polygonum*) el saco embrionario se desarrolla por sucesivas divisiones mitóticas, a partir de una de las cuatro megásporas producidas en la meiosis (Figura 1). Este saco contiene una ovocélula reducida, es decir, con un número haploide (n) de cromosomas. Cuando la ovocélula es fecundada por un núcleo generativo del polen (n) se produce la formación del cigoto ($2n$) que dará origen al embrión. En un organismo que se reproduce por *apomixis gametofítica*, si es diplospórico, la célula que formará el saco embrionario no reducido será la célula madre de la megáspora (CMM), y si es apospórico, será una célula adyacente a la célula madre de la megáspora, la cual luego de dos o tres mitosis forma un saco con un número variable de núcleos no reducidos ($2n$) (Figura 1). Finalmente, el o los núcleos polares se fecundan con un núcleo del polen (pseudogamia) para formar el endosperma ($3n$) o, en algunas especies apomícticas, el endosperma se desarrolla en forma autónoma (sin fertilización). Por lo tanto, la apomixis está formada por tres mecanismos que funcionan en forma conjunta: apomeiosis (falta de meiosis), partenogénesis (falta de fertilización) y pseudogamia o desarrollo autónomo del endosperma. El embrión de una semilla apomíctica contiene la misma información genética que la planta madre (Voigt y Bashaw, 1976).

En la naturaleza es poco frecuente encontrar plantas que solo posean procesos apomícticos en todas sus flores (apomícticos obligados), en general suelen ser facultativas, es decir que no todas las semillas que producen son clonales, algunas se originaron de procesos sexuales.

La apomixis es un carácter polifilético por lo que existen diversas formas y está presente en varias familias de angiospermas, sin embargo, este modo de reproducción no se encuentra en ninguno de los cultivos de relevancia económica.

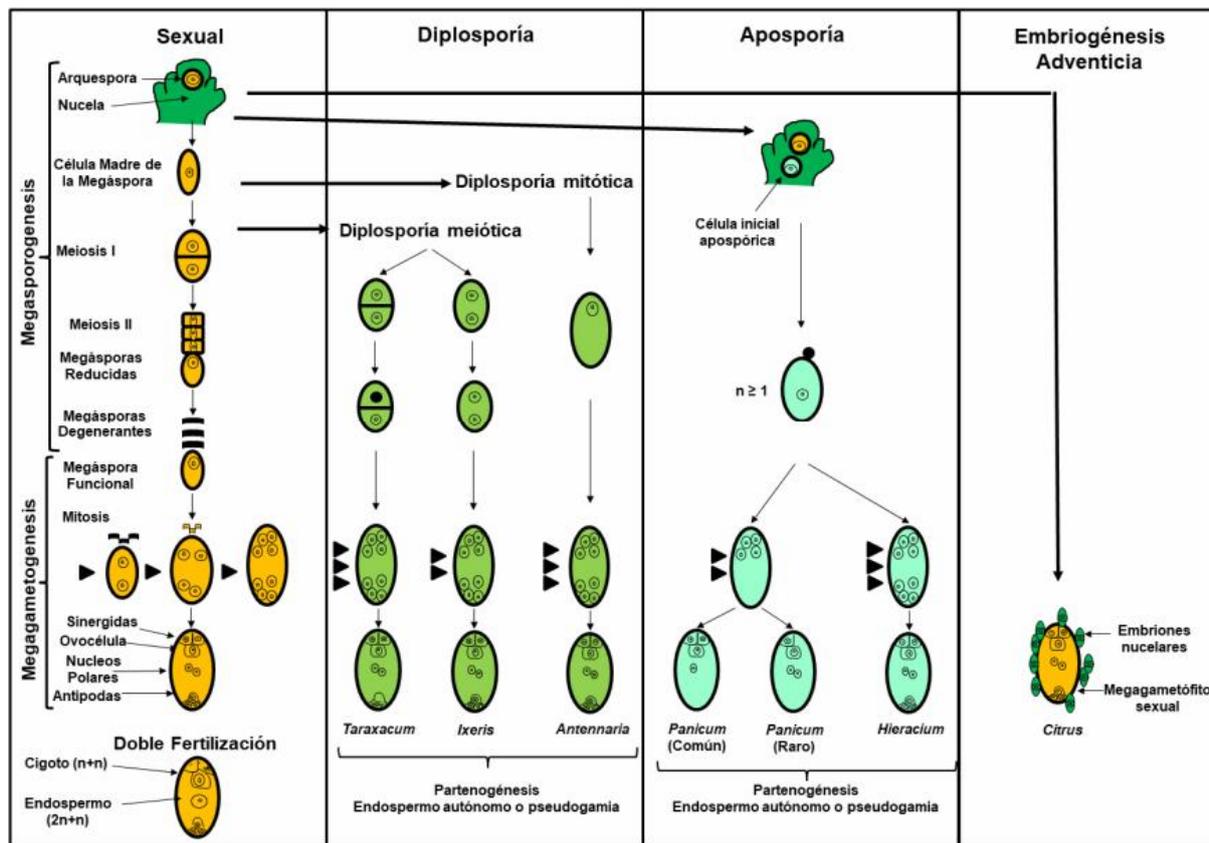


Figura 1. Mecanismos de apomixis (diplosporía, aposporía y embriogénesis adventicia) comparados con los eventos de la reproducción sexual de plantas (Tomado de Meier 2019, adaptado de Koltunow, 1993).

La apomixis es un carácter complejo, que puede explicarse por la genética mendeliana, pero todas las complicaciones concebibles para el análisis genético parecen acumularse en los genomas apomícticos, como interacciones epistáticas, componentes expresados esporofíticamente y gametofíticamente, modificadores de expresión, poliploidía, distorsiones en la segregación y supresión de la recombinación, además de complicaciones adicionales como la baja fertilidad del polen y las inestabilidades genómicas que ocurren en algunas especies (Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Por esta razón, existen varios modelos que explican la regulación de esta característica que abarca desde aspectos epigenéticos hasta diferentes formas de silenciamiento a nivel de expresión, splicing alternativo y degradación o compartimentalización de proteínas (Schmidt, 2020). Aunque la apomixis se ha estudiado ampliamente desde el punto de vista morfológico, los factores genéticos y epigenéticos responsables de la misma aún se desconocen o se conocen parcialmente en algunos modelos (Pupilli y Barcaccia, 2011; Hand y Koltunow, 2014).

1.2 Importancia de la Apomixis

Tradicionalmente en el mejoramiento vegetal, al cruzar dos líneas endogámicas (líneas autopolinizadas con alto grado de homocigosis, seleccionadas previamente por alguna característica deseada), una dadora y otra receptora de polen, se genera un híbrido que presenta cualidades superiores a los progenitores desde el punto de vista económico, usualmente con mayor rendimiento y biomasa. A

este suceso se lo define como *heterosis* o *vigor híbrido* y es el método por el que se obtienen los híbridos comerciales de ciertos cultivos (Figura 2). Toda la labor para generar un híbrido (selección de parentales, logro de homocigosis, multiplicación y cruzamiento) lleva aproximadamente entre 7 y 10 años y la cruce del híbrido para obtener la semilla comercial se realiza anualmente (MacRobert et al., 2015). Si se siembra la cosecha del híbrido comercial, la población resultante sería genética y morfológicamente heterogénea además de no poseer las características deseadas ya que segregan las características de los parentales (Figura 2).

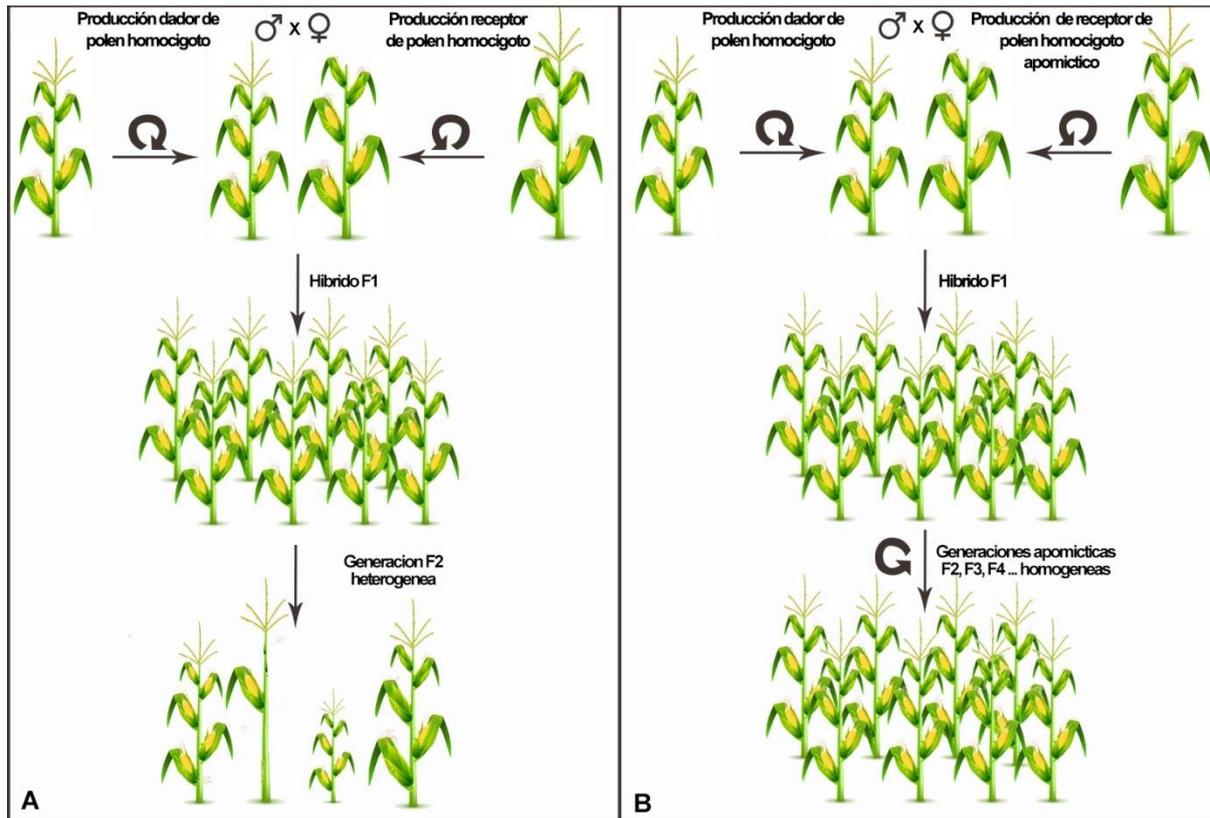


Figura 2. Producción híbrida de maíz con el fin de producir cultivares comerciales con vigor híbrido. A) Sistema tradicional de cruza entre padres homocigotos. B) Potencial sistema para la fijación del vigor híbrido en el cual se cruza un dador de polen que contiene el carácter de la apomixis produciendo progenie con el vigor híbrido de forma clonal en las próximas generaciones.

Si se incorpora la apomixis sería posible mantener el vigor híbrido por muchas generaciones sin que sea necesario realizar el cruzamiento todos los años, ahorrando tiempo y aumentando la superficie disponible para la producción (Kumar, 2017).

Esclarecer las bases genéticas y epigenéticas de la apomixis es importante no solo por su interés biológico, sino también para la tecnología agrícola. La apomixis produciría una gran reducción en el costo de producción de semillas híbridas, aumentaría el rendimiento de los cultivos endogámicos existentes al convertirlos en híbridos de alto rendimiento y permitiría la reproducción por semillas en

especies que actualmente son multiplicadas vegetativamente por ser altamente heterocigotas (Kumar, 2017).

1.3 Apomixis en *E. curvula*

El género *Eragrostis* comprende más de 250 especies distribuidas en diferentes regiones tropicales y subtropicales del mundo. *Eragrostis curvula* es una gramínea perenne de origen sudafricano utilizada como forrajera en algunos países del mundo, incluyendo Argentina. Tiene crecimiento tipo primavera-estival y es una especie C4. Los individuos diploides son muy infrecuentes en la naturaleza ($2n = 2x = 20$) y se reproducen sexualmente (Voigt y Bashaw 1976). La mayoría de los cultivares de interés son poliploides y se reproducen por apomixis. *Eragrostis curvula* es un modelo único para el estudio de la apomixis por sus características particulares como la ausencia total de meiosis y la falta de cambio en la relación de ploidía embrión: endosperma entre semillas sexuales y apomícticas (Carballo et al., 2021). El tipo de apomixis presente se denomina diplosporía tipo *Eragrostis*, en el cual el saco embrionario se desarrolla a partir de la célula madre megasporogénica (CMM) sin experimentar reducción cromosómica, sino que atraviesa dos divisiones mitóticas consecutivas. (Figura 3), formando un saco embrionario maduro tetranucleado no reducido ($2n$) con un núcleo polar, dos sinérgidas y la ovocélula (Rodrigo et al., 2017). El endosperma se forma por pseudogamia (unión de un núcleo generativo del polen con el núcleo polar del saco embrionario) resultando en $3n$ mientras que el embrión es $2n$. Gracias a este mecanismo, los individuos sexuales y apomícticos de *E. curvula* contienen el mismo balance de ploidías entre el embrión y el endosperma ($2n:3n$) que las semillas de origen sexual (Rodrigo et al., 2017). Esta última característica es muy relevante para su transferencia a otras especies, ya que desbalances en la relación de ploidías entre embrión: endosperma pueden llevar a la muerte de la semilla.

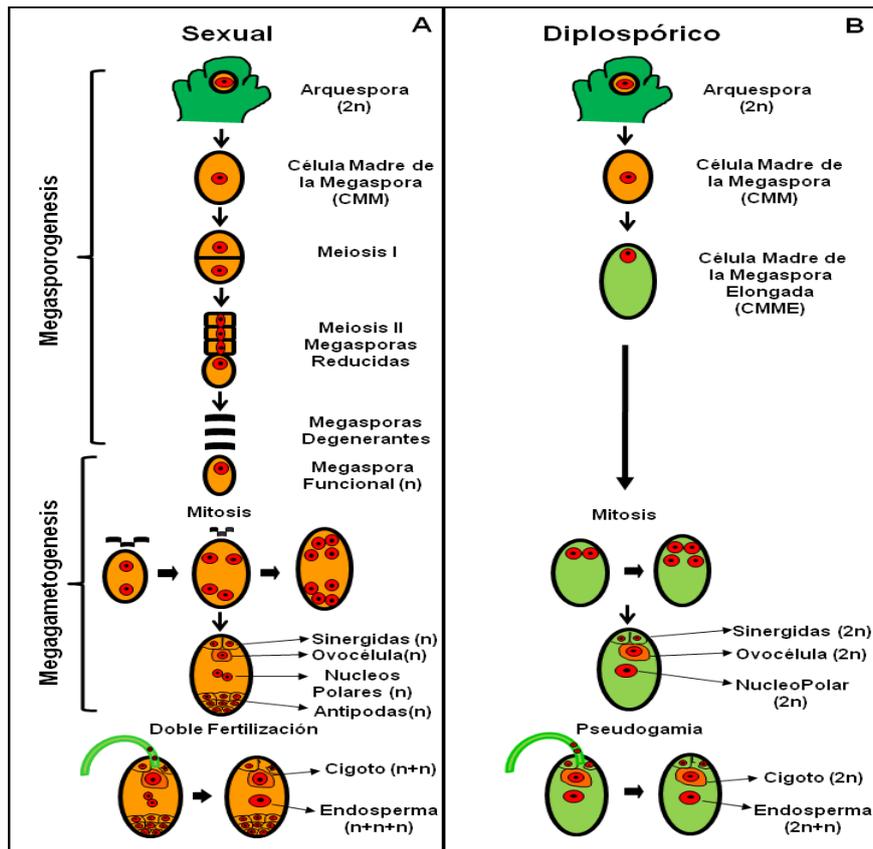


Figura 3. Megasporogénesis y megagametogénesis en pasto llorón. A) Proceso sexual y B) proceso apomítico diplospórico tipo *Eragrostis* (Modificado de Meier et al., 2008).

1.4 Regulación de la apomixis

El modo reproductivo de esta especie fue ampliamente estudiado utilizando diferentes enfoques como citoembriología (Meier et al., 2011), expresión diferencial (Cervigni et al., 2008; Garbus et al., 2017; Selva et al., 2012) y mapeo del locus de la apomixis (Zappacosta et al., 2019). También se logró un ensamblado del genoma de la especie a nivel diploide (Carballo et al., 2019) y se demostró que las situaciones de estrés, como cultivo *in vitro*, hibridación intraespecífica y estrés hídrico, incrementan el número de sacos embrionarios sexuales en plantas apomíticas facultativas, evidenciando la presencia de procesos epigenéticos en la regulación del carácter (Zappacosta et al., 2014; Rodrigo et al., 2017; Selva et al., 2017; Selva et al., 2020).

El cambio en la frecuencia de aparición de pistilos con sacos embrionarios sexuales y apomíticos bajo situaciones de estrés, indica que existen reguladores que podrían estar actuando a nivel de expresión, o posteriormente (Zappacosta et al., 2014; Rodrigo et al., 2017). Al someter a plantas apomíticas facultativas a situaciones de estrés y analizar los genes que se expresan diferencialmente, se hallaron transcritos relacionados con metilación, ubiquitinación, vías de transducción de señales y hormonas, regulación de la transcripción y biosíntesis de la pared celular (Selva et al., 2020). Uno de

los genes diferencialmente expresados y que despierta especial interés es el gen EcROS1-like (Selva et al., 2020) disponible en GenBank bajo la accesión GIQX01050486.

El gen ROS1 es una glicosilasa involucrada en la desmetilación del ADN, proceso por el cual se modula la expresión de genes (Ariza et al., 2009). Se observó que este gen es indispensable para el desarrollo del gametofito femenino y masculino en plantas de arroz (Ono et al., 2012) y cuando este gen no es funcional en la planta modelo *A. thaliana*, se observa una hipermetilación del ADN que afecta la expresión de varios genes (Qian et al., 2012).

Estudios indican que en *A. thaliana*, las enzimas que median la desmetilación del ADN, DEMETER (DME), REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1), DEMETER-LIKE 2 (DML2) y DEMETER-LIKE 3 (DML3) (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002; Gehring et al., 2006; Agius et al., 2006; Ortega-Galisteo et al., 2008) son ADN glicosilasas bifuncionales que no solo reconocen y eliminan la citocina metilada en el carbono 5 (5-meC) del ADN de doble cadena, sino también muestran actividad liasa, que corta el ADN de doble cadena en un sitio abásico (Gehring et al., 2009; Zhu, 2009; Law y Jacobsen, 2010). El gen de mayor longitud de esta familia de ADN glicosilasas es DME y se expresa predominantemente en la célula central del saco embrionario antes de la fertilización. Allí promueve la hipometilación general pero específica de los alelos maternos y una expresión de genes y elementos de imprinting, incluido transposones, en el endosperma (Choi et al., 2002; Gehring et al., 2006, 2009). Por el contrario, ROS1, DML2 y DML3 se expresan en tejidos vegetativos (Gong et al., 2002; Penterman et al., 2007; Ortega-Galisteo et al., 2008)

Como se mencionó anteriormente, además de la existencia de determinantes genéticos del carácter, se evidencian procesos epigenéticos regulatorios, por lo que es probable que exista un silenciamiento de la expresión de los mecanismos sexuales mediante metilación del ADN. En este punto, EcROS1-like es un candidato interesante cuya expresión podría ser determinante en la variación de la expresividad de la apomixis, mediante la desmetilación de un objetivo clave, desreprimiendo de esta forma uno o más genes involucrados en las vías de la sexualidad, silenciadas en las plantas apomícticas.

2 HIPÓTESIS

El gen *EcROS1-like* participa en la regulación del modo reproductivo en *E. curvula*, cumpliendo un rol en la determinación del destino de la arqueospora hacia un proceso apomítico o sexual.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar la estructura de *EcROS1* en *E. curvula* y evaluar su expresión en diferentes genotipos de la especie con distinto modo reproductivo.

3.2 Objetivos específicos

1. Buscar en bases de datos secuencias correspondientes al gen *ROS1* en especies de gramíneas emparentadas.
2. Comparar la estructura de estos con el gen hallado en pasto llorón mediante herramientas bioinformáticas.
3. Diseñar cebadores para amplificar regiones específicas del gen en distintos genotipos de pasto llorón.
4. Analizar la expresión del gen en individuos con distinta expresividad del carácter mediante PCR en tiempo real.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Se utilizaron los genotipos apomícticos Don Walter (tetraploide, facultativo) y Tanganyika (tetraploide, obligado) y sexuales OTA-S (tetraploide) y PI208214 (diploide), presentes en la colección de germoplasma existente en el CERZOS-CCT Bahía Blanca. A los primeros tres genotipos mencionados se le realizó tanto 4.2 Extracción de ADN (sección 4.2) como 4.3 Extracción de ARN (sección 4.3), mientras que al último solo se le 4.3 Extracción de ARN.

4.2 Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo de tejido foliar fresco y joven siguiendo un protocolo basado en CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) modificado (Murray y Thompson, 1980). Brevemente, el material vegetal (aprox. 100 mg) se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se congeló con nitrógeno (N₂) líquido y se pulverizó utilizando un lisador de tejidos (TissueLyser II, Qiagen). Luego, a cada tubo se le agregó 800 µl de buffer de extracción que contenía Tris HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8, CTAB al 2 % (p/v) y β-mercaptoetanol al 0,5 % (v/v) y se incubó durante 30 minutos a 65 °C. Posteriormente se agregaron 400 µl de cloroformo, se incubó 15 min a temperatura ambiente (invirtiendo la muestra periódicamente) y se centrifugó 10 min a 11.000 RPM. Se recogió el sobrenadante y para precipitar el ADN se agregó igual volumen (700 µl) de isopropanol y se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se obtuvo un pellet al que se le realizaron dos lavados, primero con etanol al 70% (v/v), cuyo fin es mantener precipitado el ADN, mientras que el agua lava las sales, luego con etanol absoluto para agilizar el secado del pellet. Finalmente, se resuspendió en agua ultrapura que contenía 20 µg/ml de ARNasa. La concentración y calidad del ADN se analizó en geles de agarosa al 1,5% (m/v) y con un espectrofotómetro DS-11 Series (DeNovix).

4.3 Extracción de ARN

Se aisló ARN total de espiguillas con flores basales en antesis, las cuales contienen sacos embrionarios en todas las etapas del desarrollo. Se tomaron dos replicas biológicas para cada genotipo. Se utilizó el kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega) utilizando 60 mg de tejido molido en TissueLyser con N₂ líquido, siguiendo las instrucciones del proveedor. Finalmente, se midió su concentración en un espectrofotómetro DS-11 Series (DeNovix), y se analizó su calidad mediante electroforesis sembrando 1 µg de ARN en un gel de agarosa 1,5%, disuelto en agua DEPC, y observándolo bajo luz UV. La cuba de electroforesis y el soporte del gel fueron tratados previamente con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M completando todo el volumen de la cuba con el soporte durante al menos una hora.

4.4 Búsqueda de ortólogos en bases de datos

Se utilizó la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1997). Este programa es capaz de comparar una secuencia “query” o incógnita contra otras que se encuentren en una base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido con el query. Se emplearon dos programas de la familia BLAST, el BLASTN que compara secuencias nucleotídicas entre sí y el BLASTX, que traduce la secuencia query de nucleótidos a aminoácidos y la compara con bases de datos de proteínas.

Se realizó la búsqueda en las bases de datos de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y también en bases de datos propias almacenadas en el servidor del grupo de biotecnología vegetal del CERZOS (<http://biotvegetal.cerzos-conicet.gob.ar/>). Para su búsqueda se contó con una secuencia del transcripto EcROS1-like obtenida por secuenciación del transcriptoma de inflorescencias del genotipo Don Walter, GIQX01050486.1 (Selva et al. 2020).

4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones fueron llevadas a cabo en un ciclador BioRad MyCycler, y el perfil de ciclado consistió en una desnaturalización inicial del ADN durante 4 min a 94°C, seguida de 40 ciclos de amplificación, de 20 seg de desnaturalización (94 °C), 20 seg a la temperatura de annealing (o hibridación) específica para cada par de cebadores, y 30 - 80 seg de extensión (a 72°C) dependiendo de la longitud del fragmento esperado. El tercer paso consistió en una extensión final de 5 min a 72°C. La temperatura adecuada de hibridación o apareamiento (annealing) para los cebadores se determinó de manera que fuera menor o igual que la temperatura más baja de fusión (Melting) del par de cebadores usado, que es aquella a la cual la doble cadena de ADN se disocia en cadenas simples.

Tanto para los análisis de PCR como para sus derivados, fue necesario el diseño de cebadores específicos para cada caso, las condiciones de su diseño y los criterios utilizados se especifican en la sección 4.6.

Una vez obtenidos los productos de PCR, se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (agarosa Genbiotech) en buffer TAE (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Se procedió a la inmersión de los geles en una solución con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), para luego ser revelado bajo luz ultravioleta en un transiluminador DyNA Light™ UV (Labnet).

4.6 Diseño de cebadores

Se utilizó la herramienta PrimerQuest® (www.idtdna.com) que permite diseñar cebadores tanto para la obtención de amplicones de longitud variable utilizados en una PCR punto final (PCR), como para el análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (qPCR). Se utilizaron como molde para el diseño de cebadores la secuencia del gen EcROS1-like obtenida por análisis de expresión diferencial (GIQX01050486.1) y otra secuencia candidata resultado del análisis de BLAST realizado en este trabajo. Se utilizaron los valores de los parámetros establecidos por defecto en la página web. En la

Tabla 1 se muestra la secuencia de los cebadores diseñados con su correspondiente temperatura de melting.

Tabla 1. Cebadores diseñados para la evaluación de las secuencias correspondientes al gen EcROS1-like y el gen control usado en los ensayos de PCR de punto final y en tiempo real.

Primers PCR End Point	Secuencia	T° de Melting
EcROS1-likeF1	CTAGGATGTGAACTGGACTTGG	54,9°C
EcROS1-likeF2	TGCCCTTTCAGTGGGAAAT	54,5°C
EcROS1-likeRv	GGGTCTTCCTGAAATAACAATGC	54,2°C
EcROS1-like-qPCR-Fwd	CCACTGGTTGAGGTTGCAAG	56,5°C
EcROS1-like-qPCR-Rv	ACGAGCGAGAAATGCCTGTA	56,4°C
EcUBICE-qPCR-Fwd	AAGGAGCTCAAGGACCTGCAGAAA	60,4°C
EcUBICE-qPCR-Rv	TCACTAAGAACACACCACCGGCAT	60,5°C

4.7 Ligación de los productos de PCR

Para una posterior secuenciación de los productos obtenidos mediante PCR se utilizó el kit pGEM®-T Easy (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, en tubos de 0,2 ml se colocaron los siguientes reactivos: 2,5 µl del Buffer de ligación 2X, 0,5 µl (25 ng) del vector, 0,5 µl (1,5 unidades) de la enzima T4 ligasa y 1,5 µl del producto de PCR. Además, se realizó un control positivo (con un inserto conocido provisto por el kit), y un control negativo (sin ADN). Las reacciones se mezclaron por pipeteo y se incubaron durante toda la noche a 4°C.

4.8 Transformación bacteriana

Para la transformación se utilizaron bacterias competentes de *Escherichia coli* de las cepas DH5α y DH10b provistas por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y almacenadas a una temperatura de -80°C. Las transformaciones fueron realizadas mediante shock térmico, el cual consistió en agregar los 5 µl de reacción de ligación a 80 µl de bacterias competentes, que se dejaron 15 min en hielo, luego se llevaron durante 45 seg a 42°C en un baño térmico, e inmediatamente se devolvieron al hielo durante 5 min. Luego se añadieron 600 µl de medio LB líquido y se dejó el cultivo durante 40 min a 37°C en un agitador. Posteriormente, se centrifugaron 5 min a 3500 RPM y se retiraron 500 µl de sobrenadante para concentrar las bacterias. Por último, se dispersaron 90 µl del cultivo sobre placas que contenían un medio selectivo LB-Agar/Ampicilina/IPTG/X-Gal (175 ml de medio LB-Agar, 750 µl de IPTG 0,12M, 175 µl de Ampicilina 100mg/ml y 175 µl de X-Gal 80mg/ml). Este medio selectivo permite sólo el

crecimiento de bacterias transformadas y la discriminación entre las que poseen el plásmido con el inserto (blancas) o sin él (azules). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C para permitir el desarrollo de colonias de bacterias transformadas y almacenadas a 4°C.

4.9 Repique y PCR en colonia

Se seleccionaron algunas colonias blancas de los diferentes genotipos para repicar, lo que permite (debido a que se cuenta con una mayor superficie de la placa cubierta con las bacterias) una confirmación colorimétrica más evidente, además de mayor practicidad y reducción de posibles errores en la toma de muestras. Para este fin, nuevas placas con medio LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal fueron fraccionadas con un marcador indeleble en la cara externa y se realizaron estriados de las colonias positivas seleccionadas en cada uno de los compartimentos. Luego de la incubación a 37°C por una noche se las dejó al menos 3 horas a 4°C para poder diferenciar mejor los estriados blancos (positivos) de los azules (falsos positivos).

Las colonias cuyos estriados fueron blancos se sometieron a una reacción de PCR en colonia. Para cada reacción se colocaron 20 µl de agua Milli-Q en tubos estériles de 0,2 ml y con tips estériles se picaron los diferentes estriados, que luego fueron disueltos en el agua de los tubos. Estos se calentaron 5 min a 99,5°C y se centrifugaron 10 min a 13000 RPM. Se tomaron 6 µl de cada tubo para realizar la PCR, utilizando los mismos cebadores y condiciones de PCR que se usaron para el producto de PCR original de cada ligación. Las bandas fueron luego identificadas mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, de la manera expuesta anteriormente.

4.10 Extracción de ADN plasmídico (Miniprep)

Las colonias positivas para los fragmentos de interés se inocularon en 4 ml de medio LB líquido con Ampicilina (100 µg/ml) y se dejaron creciendo hasta saturar el medio toda la noche en agitación a 37°C. Al día siguiente se concentraron las bacterias por centrifugación a 6000 RPM en tubos de 1,5 ml. Se descartó el sobrenadante y se repitió el procedimiento hasta concentrar los cultivos en 4 ml. Una vez obtenido el pellet de bacterias se procedió a extraer el ADN plasmídico utilizando el kit ADN Puriprep P-kit (Inbio Highway®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se resuspendió el ADN en agua libre de nucleasas. La concentración y calidad de los plásmidos se analizaron en geles de agarosa al 1,2% (m/v) y con un espectrofotómetro DS-11 Series (DeNovix).

4.11 Secuenciación y análisis bioinformático

Una alícuota de los plásmidos fue enviada para ser secuenciada utilizando los servicios de Secuenciación de MacroGen (Corea del Sur) mediante electroforesis capilar (Sanger et al., 1977). Como cebador de secuenciación se utilizó el cebador universal T7, el cual se ubica en el vector en una región cercana al inserto.

4.12 Reacción de retrotranscripción (RT)

Se trató 1 µg de ARN de cada uno de los materiales vegetales con una enzima DNAsa RQ1 (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, con el fin de eliminar todo resto de ADN genómico producto de la extracción. Luego, el ARN fue convertido a ADNc (ADN complementario al ARN) mediante una retrotranscripción. Para esto se utilizó la transcriptasa reversa M-MLV (Promega), siguiendo las especificaciones del proveedor. Las mismas consistían en el tratamiento de 1µg de ARN con la enzima transcriptasa inversa M-MLV (Virus de la Leucemia Murina). Se utilizó 1,1 µl de oligonucleótido dT15 (100 µM), diseñado para iniciar la síntesis de ADNc ya que se une al extremo poli A del ARN y actúa como cebador para la unión de la transcriptasa inversa. Se calentaron los tubos durante 5 min a 70°C para desnaturalizar la estructura secundaria. Posteriormente, se enfriaron colocándolos inmediatamente en hielo para evitar su restablecimiento. A continuación, se agregaron 5µl de Buffer de reacción M-MLV (5X), 1.25µl de dNTPs (40mM), 0,65µl (25 unidades) de inhibidor de ribonucleasas RNAsin, 1 µl de la enzima RT M-MLV y por último agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25µl. Luego de mezclar los componentes sacudiendo el tubo, se incubaron durante 60 min a 42°C, permitiendo la extensión.

4.13 PCR en tiempo real (PCR cuantitativa o qPCR)

Para determinar la existencia o no de diferencias en la expresión del gen estudiado entre los distintos genotipos se usó una variación de la técnica de PCR, denominada qPCR (PCR en tiempo real) que amplifica y cuantifica simultáneamente el producto de amplificación obtenido. Las reacciones se realizaron con la mezcla soAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en el termociclador CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando el Software CFX Maestro (Bio-Rad). Para normalizar el nivel de transcripción entre muestras se utilizó la enzima de conjugación de la ubiquitina como gen control (Tabla 1).

5 RESULTADOS

5.1 Búsqueda de genes ortólogos

Se utilizó la secuencia obtenida previamente por análisis de expresión diferencial de genes del genotipo apomíctico facultativo Don Walter bajo condiciones de estrés hídrico (EcROS1-like, GIQX01050492.1) cuya longitud es de 1144 pares de bases (pb). Dicha secuencia se la utilizó como query o secuencia incógnita para buscar secuencias similares en las distintas bases de datos.

5.1.1 Búsqueda en bases de datos propias

El BLASTN interrogando la base de datos del transcriptoma del mismo genotipo (Selva et al., 2020) dio como resultado el apareamiento con cuatro transcritos. Uno de ellos es la secuencia query (diferencial en el análisis de expresión) y los otros tres transcritos presentan una cobertura del 48% del query y una identidad de más del 99 % (Fig. 4)

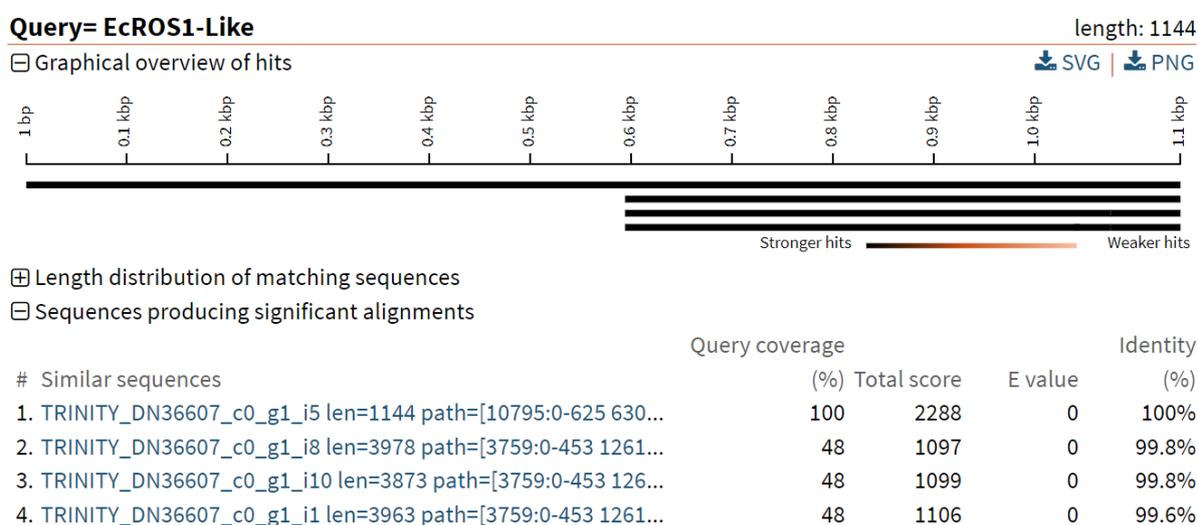


Figura 4. Análisis de BLASTN de la secuencia del gen EcROS1-like contra el transcriptoma del genotipo Don Walter (Selva et al., 2020).

También se realizó un BLASTN contra la base de datos de transcriptomas de los genotipos OTA-S y Tanganyika obtenidos previamente por el grupo de trabajo (Garbus et al., 2017). El mismo también arrojó como resultado el apareamiento con cuatro transcritos, con dos de ellos compartía también el 48% de cobertura y una identidad del 99,8%, igual que el resultado obtenido en el transcriptoma de Don Walter, y los otros dos transcritos cubrían el 38% del query con una identidad del 91,6%. (Fig. 5).

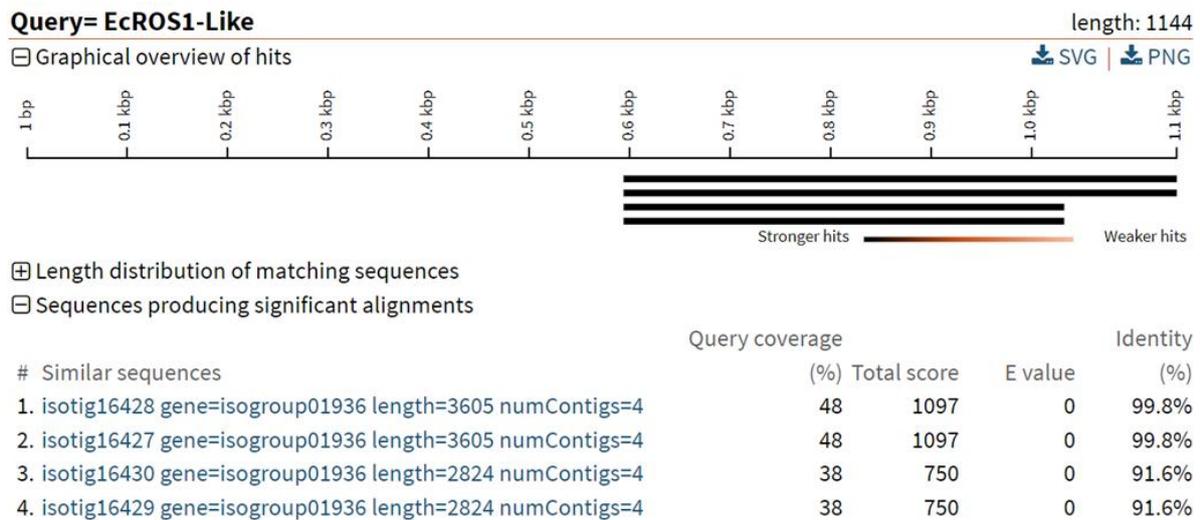


Figura 5. Análisis de BLASTN de la secuencia del gen Ec ROS1-like contra los transcriptomas de los genotipos OTA-S y Tanganyika (Garbus et al., 2017).

El análisis de BLASTN también se realizó contra las bases de datos del genoma a nivel diploide de la especie (cv. Victoria) y la anotación de los transcriptos que el mismo contiene (Carballo et al., 2019). En este caso el BLASTN arrojó un solo resultado contra ambas bases, pero con distintos porcentajes de cobertura e identidad (Figs. 6 y 7).

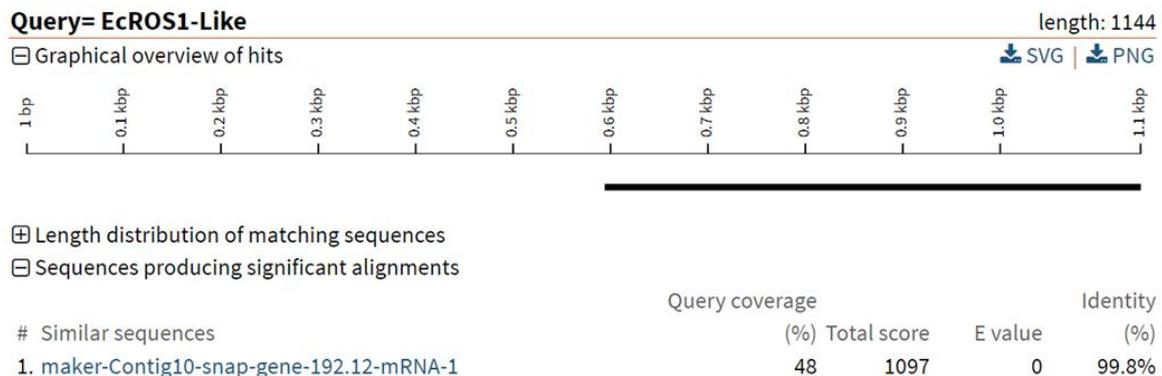


Figura 6. Análisis de BLASTN de la secuencia del gen EcROS1-like contra el genoma del genotipo diploide Victoria (Carballo et al., 2019).

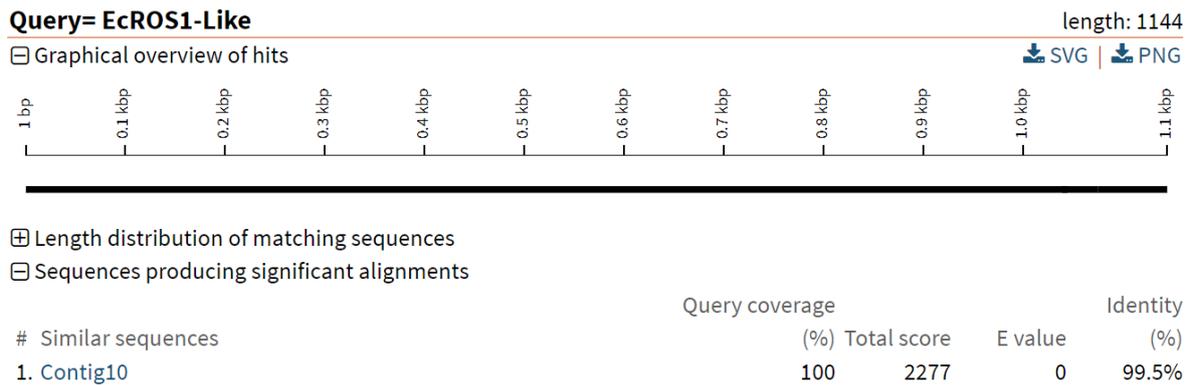


Figura 7. Análisis de BLASTN de la secuencia del gen EcROS1-like contra la anotación del genoma del genotipo diploide Victoria (Carballo et al., 2019).

Contar con la secuencia a nivel genómico del genotipo diploide nos permitió inferir la estructura del gen con sus intrones y exones. Para ello se utilizó la herramienta Fgenesh gene-finder (Solovyev et al., 2006). La estructura del gen está compuesta por 17 exones, un sitio de inicio de la transcripción y un sitio de poliadenilación (Fig. 8)

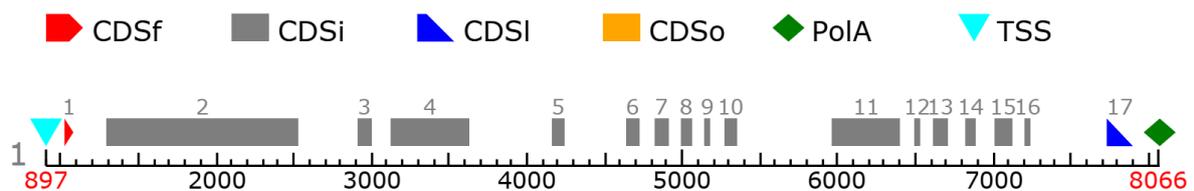


Figura 8: Estructura del gen EcROS1-like inferido por el programa Fgenesh sobre la secuencia hallada en el genoma de referencia de la especie (cv. Victoria).

El alineamiento de la secuencia genómica del genotipo diploide como query contra las secuencias obtenidas hasta el momento de los transcriptomas de OTA-S, Tanganyika y de Don Walter determinó que el transcripto diferencial EcROS1-like es una secuencia parcial de dicho gen compuesta por el intrón 10 y los exones 11, 12 y 13 del gen predicho en el genotipo diploide (Fig. 9)



Figura 9: Análisis de BLASTN de la secuencia del genoma del diploide Victoria con las secuencias de los transcriptomas de OTA-S y Tanganyika (Isotigs 16427,28,29 y 30) y Don Walter (Trinity i10, i1 e i8 y EcROS1-like).

5.1.2 Búsqueda en las bases de datos de NCBI

Para buscar en otras bases de datos se utilizó tanto la secuencia parcial del transcripto EcROS1-like como las secuencias i8 del transcriptoma de Don Walter y la secuencia predicha del gen entero a nivel diploide.

Primero se realizó un BLASTN contra toda la colección de nucleótidos de la base de datos de NCBI. EcROS1-like sólo presentó homología con dos secuencias predichas (DEMETER y DEMETER-like) de las especies *Setaria italica* y *S. viridis* (Fig. 10) con una cobertura del 37% para ambas secuencias y una identidad del 82 y 81,8% respectivamente. Por otra parte, la secuencia completa a nivel diploide presentó homología con las mismas dos secuencias de *Setaria* spp. (DEMETER y DEMETER-like) y con las secuencias de ROS1-like y DEMETER-like de *Panicum* spp., *Oryza brachyantha* y *Sorghum bicolor* (Fig. 11).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
PREDICTED: <i>Setaria italica</i> transcriptional activator DEMETER (LOC101762067). mRNA	<i>Setaria italica</i>	353	353	37%	4e-92	82.01%	3730	XM_004952462.2
PREDICTED: <i>Setaria viridis</i> transcriptional activator DEMETER-like (LOC117851804). mRNA	<i>Setaria viridis</i>	348	348	37%	2e-90	81.78%	3688	XM_034733707.1

Figura 10: Análisis de BLASTN de la secuencia del transcripto EcROS1-like contra toda la colección de nucleótidos de la base de datos de NCBI.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
PREDICTED: <i>Setaria italica</i> transcriptional activator DEMETER (LOC101762067). mRNA	<i>Setaria italica</i>	479	1238	51%	2e-129	78.60%	3730	XM_004952462.2
PREDICTED: <i>Setaria viridis</i> transcriptional activator DEMETER-like (LOC117851804). mRNA	<i>Setaria viridis</i>	468	1225	51%	4e-126	78.34%	3688	XM_034733707.1
PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> protein ROS1-like (LOC112888374). transcript variant X4. misc_RNA	<i>Panicum hallii</i>	453	814	31%	1e-121	78.91%	3063	XR_003227807.1
PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> protein ROS1-like (LOC112888374). transcript variant X3. misc_RNA	<i>Panicum hallii</i>	453	814	31%	1e-121	78.91%	3240	XR_003227806.1
PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> protein ROS1-like (LOC112888374). transcript variant X2. misc_RNA	<i>Panicum hallii</i>	453	814	31%	1e-121	78.91%	3266	XR_003227805.1
PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> protein ROS1-like (LOC112888374). transcript variant X1. mRNA	<i>Panicum hallii</i>	453	814	31%	1e-121	78.91%	3754	XM_025954584.1
PREDICTED: <i>Panicum virgatum</i> protein ROS1A-like (LOC120702319). mRNA	<i>Panicum virgatum</i>	435	801	31%	4e-116	78.22%	3823	XM_039986052.1
PREDICTED: <i>Panicum virgatum</i> protein ROS1A-like (LOC120655777). misc_RNA	<i>Panicum virgatum</i>	425	425	18%	3e-113	78.08%	3627	XR_005667728.1
PREDICTED: <i>Oryza brachyantha</i> transcriptional activator DEMETER-like (LOC102715183). transcript va...	<i>Oryza brachyan...</i>	394	506	20%	7e-104	77.93%	3250	XM_015833969.2
PREDICTED: <i>Oryza brachyantha</i> transcriptional activator DEMETER-like (LOC102715183). transcript va...	<i>Oryza brachyan...</i>	394	517	22%	7e-104	77.93%	3700	XM_006648583.3
PREDICTED: <i>Sorghum bicolor</i> protein ROS1 (LOC8074739). mRNA	<i>Sorghum bicolor</i>	333	333	22%	2e-85	74.64%	3722	XM_021462950.1
<i>Setaria viridis</i> cultivar ME034v chromosome 1	<i>Setaria viridis</i>	126	126	2%	3e-23	91.30%	42132932	CP050795.1
<i>Triticum aestivum</i> chromosome 3B-specific BAC library contig ctg0954b	<i>Triticum aestivum</i>	80.5	80.5	1%	2e-09	91.53%	3109948	FN564434.1
<i>Hordeum vulgare</i> contig 211252. complete sequence	<i>Hordeum vulgare</i>	67.6	67.6	1%	2e-05	95.24%	211664	AF521177.1

Figura 11: Análisis de BLASTN de la secuencia completa a nivel diploide del gen EcROS1-like contra toda la colección de nucleótidos de la base de datos de NCBI.

El BLASTX se realizó seleccionando la base de datos SwissProt (NCBI), ya que está curada, es decir, presenta menos secuencias, pero con mayor respaldo de evidencias. El análisis arrojó

resultados similares tanto para el transcripto EcROS1-like como para el gen predicho a nivel diploide (Figs.12 y 13). La proteína con mejor homología en ambos BLASTX es ROS1A de *O. sativa*, descrita como una glicosilasa de ADN relacionada con DEMETER (DME) de *A. thaliana* (Kim et al., 2019).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
RecName: Full=Protein ROS1A; AltName: Full=Protein REPRESSOR OF SILENCING 1 homolog a; AltName: Full=...	<i>Oryza sativa</i> Jap...	65.5	65.5	50%	4e-10	30.85%	1952	C7IW64.2
RecName: Full=Transcriptional activator DEMETER; AltName: Full=DNA glycosylase-related protein DME [Arabidop...	<i>Arabidopsis thali...</i>	60.5	60.5	33%	2e-08	35.29%	1987	Q8LK56.2
RecName: Full=DEMETER-like protein 2 [Arabidopsis thaliana]	<i>Arabidopsis thali...</i>	57.4	57.4	46%	2e-07	29.69%	1332	Q9SR66.2
RecName: Full=Protein ROS1C; AltName: Full=DNA glycosylase 701; AltName: Full=Protein REPRESSOR OF SIL...	<i>Oryza sativa</i> Jap...	57.0	57.0	47%	2e-07	30.16%	1858	B8YIE8.2
RecName: Full=DNA glycosylase/AP lyase ROS1; AltName: Full=DEMETER-like protein 1; AltName: Full=Protein R...	<i>Arabidopsis thali...</i>	50.1	50.1	32%	3e-05	31.58%	1393	Q9SJK6.2
RecName: Full=DEMETER-like protein 3 [Arabidopsis thaliana]	<i>Arabidopsis thali...</i>	45.1	45.1	11%	0.001	50.00%	1044	Q49498.2

Figura 12: Análisis de BLASTX de la secuencia del transcripto EcROS1-like contra la base de datos SwissProt (NCBI).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
RecName: Full=Protein ROS1A; AltName: Full=Protein REPRESSOR OF SILENCING 1 homolog a; AltName: Full=...	<i>Oryza sativa</i> Jap...	318	395	50%	4e-88	37.32%	1952	C7IW64.2
RecName: Full=DEMETER-like protein 2 [Arabidopsis thaliana]	<i>Arabidopsis thali...</i>	305	362	47%	2e-84	36.51%	1332	Q9SR66.2
RecName: Full=Transcriptional activator DEMETER; AltName: Full=DNA glycosylase-related protein DME [Arabido...	<i>Arabidopsis thali...</i>	303	388	47%	4e-83	36.80%	1987	Q8LK56.2
RecName: Full=DNA glycosylase/AP lyase ROS1; AltName: Full=DEMETER-like protein 1; AltName: Full=Protein...	<i>Arabidopsis thali...</i>	301	381	48%	8e-83	37.27%	1393	Q9SJK6.2
RecName: Full=Protein ROS1C; AltName: Full=DNA glycosylase 701; AltName: Full=Protein REPRESSOR OF SIL...	<i>Oryza sativa</i> Jap...	296	371	49%	4e-81	35.99%	1858	B8YIE8.2
RecName: Full=DEMETER-like protein 3 [Arabidopsis thaliana]	<i>Arabidopsis thali...</i>	285	285	54%	9e-79	31.35%	1044	Q49498.2
RecName: Full=Putative DNA glycosylase A3g47830 [Arabidopsis thaliana]	<i>Arabidopsis thali...</i>	73.9	73.9	17%	9e-13	28.17%	293	F4JQ3.1
RecName: Full=Endonuclease III; AltName: Full=DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase [Thermotoga maritima M...	<i>Thermotoga mari...</i>	54.3	54.3	8%	1e-06	27.72%	213	Q9WYK0.1

Figura 13: Análisis de BLASTX de la secuencia completa a nivel diploide del gen EcROS1-like contra la base de datos SwissProt (NCBI).

Considerando los resultados del BLASTX, tales como las coberturas y porcentajes de identidad para ambos queries (EcROS1.like y gen predicho para el genotipo diploide), no se puede inferir con seguridad cuál de los cuatro genes integrantes de la familia de glicosilasas DME/ROS1 de *A. thaliana* es el ortólogo del gen EcROS1-like. En ese sentido se utilizó el programa Fgenesh (Solovyev et al., 2006) para comparar las estructuras de los genes (Fig. 14). De esta comparación se observa que tanto el gen DME de *A. thaliana* como el gen ROS1A de *O sativa* presentan 17 exones y un largo total de la secuencia mayor que el resto de los genes de la familia. Teniendo en cuenta este resultado, el gen predicho en el genotipo diploide de *E. curvula* coincide en cantidad de exones y largo total con estos genes y podría considerarse una variante de DME o ROS1A.

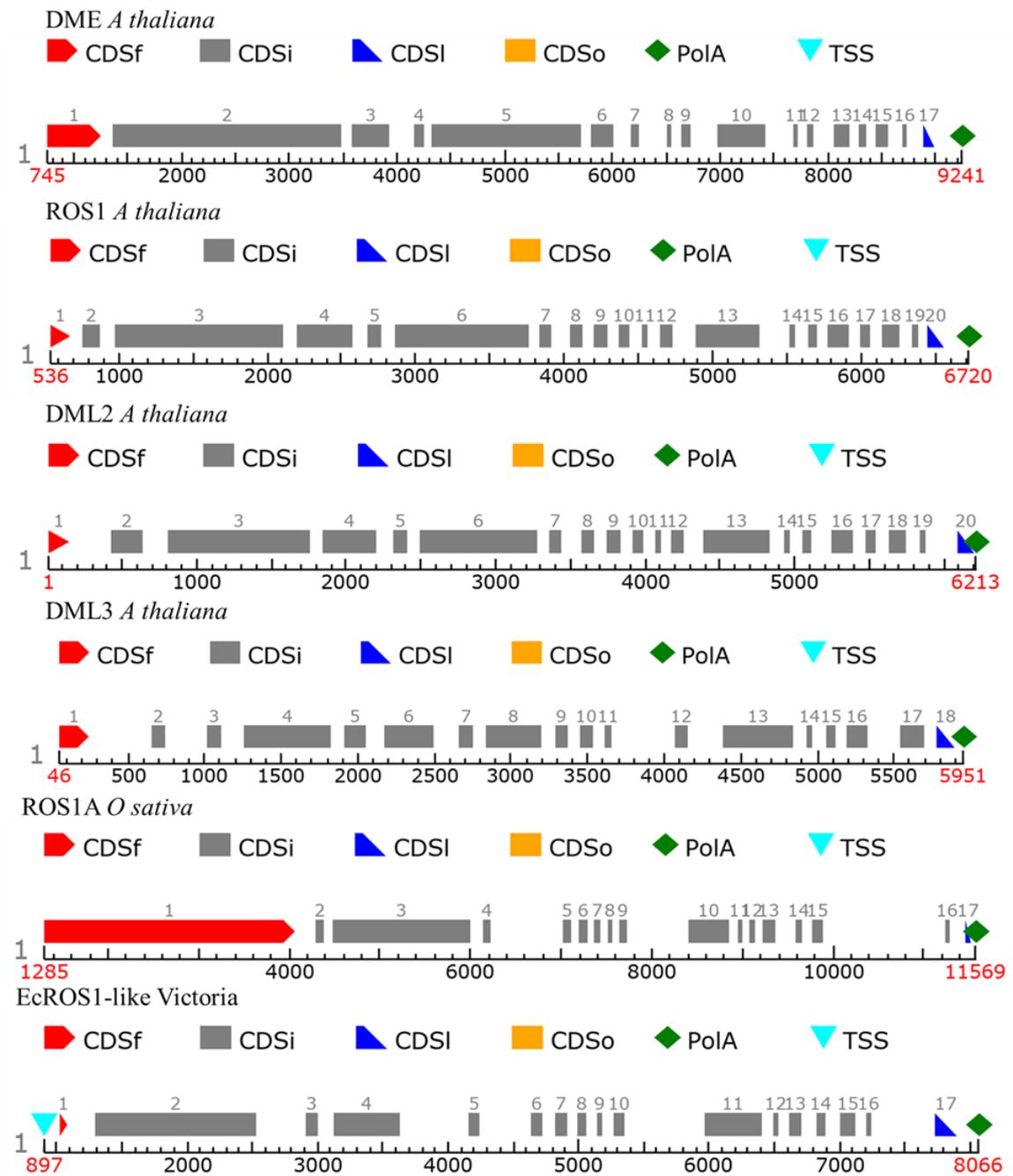


Figura 14: Estructura de los genes de la familia ROS1/DME de especies modelo y *E. curvula*.

5.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Las combinaciones de cebadores utilizadas dieron como resultado amplicones de diferentes longitudes (Fig. 15, Tabla 2). En la Figura 15 se observan los amplicones en ADN con la combinación de cebadores EcROS1-like F1 + Rv y EcROS1-like F2 + Rv con ADNs de los genotipos Don Walter, Tanganyika y OTA-S. El fragmento amplificado por PCR presentó el tamaño esperado, 140 pb para la combinación EcROS1-like F1 + Rv y 740 pb para la combinación EcROS1-like F2 + Rv. Una de las muestras de Don Walter no amplificó.

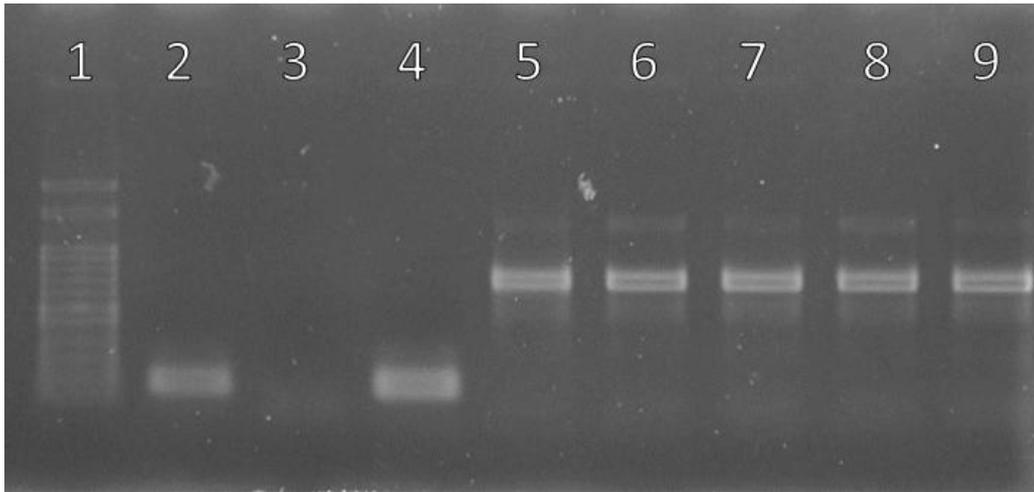


Figura 15. Gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de etidio. 1) marcador de peso molecular 100pb, 2) Tanganyika, 3) Don Walter 1, 4) OTA-S 1, 5) Tanganyika, 6) Don Walter 1, 7) Don Walter 2, 8) OTA-S 1, 9) OTA-S 2. Calles 2, 3 y 4: amplicones obtenidos con la combinación EcROS1-like F1 + Rv (140 pb). Calles 5, 6, 7, 8 y 9: amplicones obtenidos con la combinación EcROS1-like F2 + Rv (740 pb).

Tabla 2. Combinación de cebadores utilizados y tamaño de amplicones sobre ADN

Cebador Forward	Cebador Reverse	Longitud del amplicón en ADN
EcROS1-like F1	EcROS1-like Rv	143 pb
EcROS1-like F2	EcROS1-like Rv	738 pb
EcROS1-like-qPCR Fwd	EcROS1-like-qPCR Fwd	84 pb

5.3 Ligación y transformación de los amplicones

Los fragmentos amplificados fueron clonados en bacterias con el vector del kit pGEM®-T Easy vector system (Promega). En la Figura 16 se muestran algunos de los cultivos de bacterias que incorporaron el plásmido con el inserto (positivas, color blanco) y otros que no lo incorporaron (color azul).

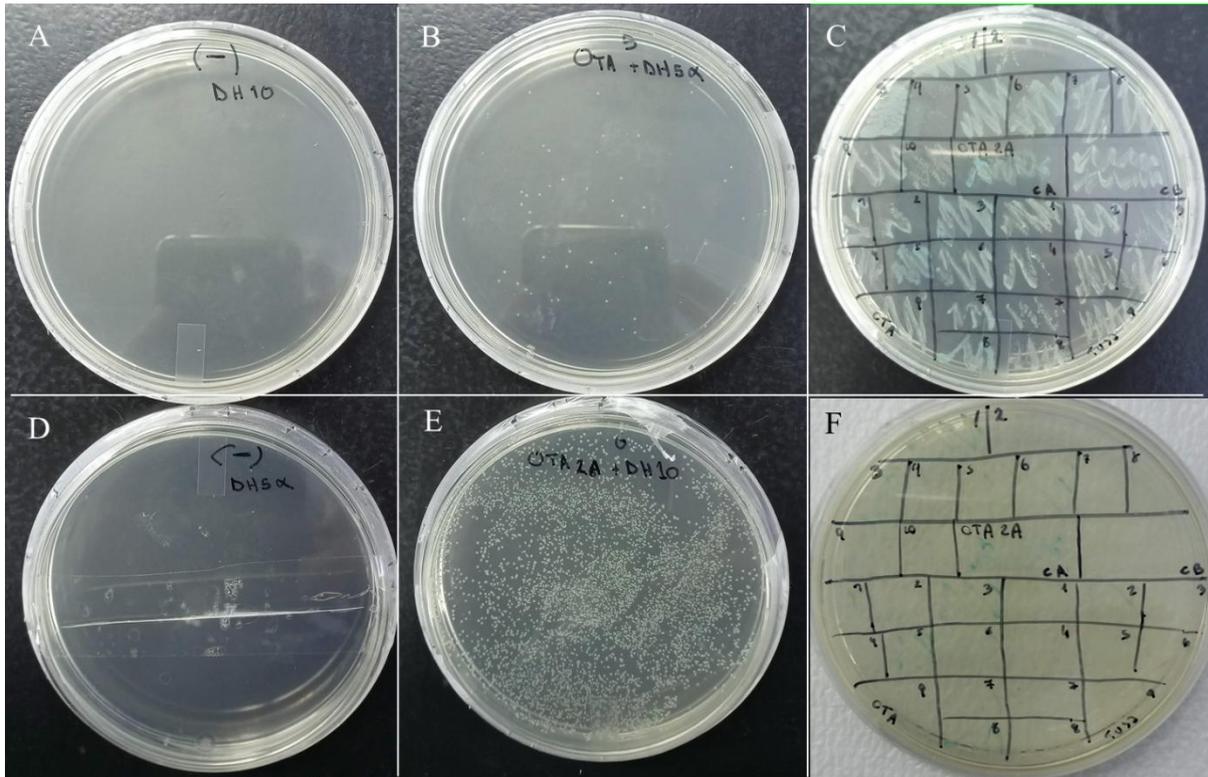


Figura 16. Placas de Petri con colonias transformadas de *E. coli*. A y D, negativos de transformación para las cepas DH10B (A) y DH5α (D). B y E, ejemplos de transformaciones positivas para ambas cepas. C y F, Estriados de colonias individuales de las transformaciones para descartar falsos positivos.

Con las bacterias que incorporaron el inserto se realizaron subcultivos en medio líquido para permitir su crecimiento y aislar y plásmido con una miniprep. En la Figura 17 se muestra un gel de agarosa al 1,5% donde algunas de las bacterias evaluadas presentan el inserto (3, 5, 7, 9, 11 y 12) y otras no. También se muestra el resultado de las minipreps realizadas a colonias que habían dado resultados positivos en PCR en colonias previas. La calle 15 es un plásmido aislado de una colonia azul para ser usado como control sin inserto.

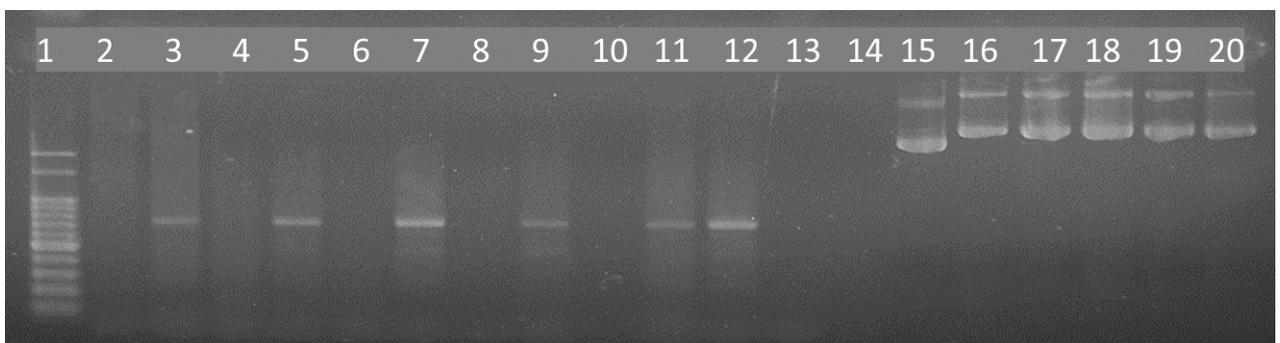


Figura 17. PCR en colonia de las bacterias subcultivadas de la transformación. 1) Marcador de peso molecular 100pb, 2 a 12) Bacterias repicadas. 13) Control Negativo. 15) Plásmido sin digerir sin inserto. 16 a 17) Plásmidos sin digerir con inserto.

5.4 Análisis de secuencias clonadas

Se enviaron para su secuenciación siete plásmidos cuyo inserto era el amplicón de PCR generado por la combinación de los cebadores EcROS1-like F2 + Rv y cuyo tamaño correspondía al inferido por el genoma de referencia (738 pb). De ellos, se logró limpiar y obtener la secuencia completa del amplicón de seis que correspondían a los genotipos: APO 1: Tanganyika, APO 2: Don Walter 1, APO 3: Don Walter 2, SEX 1, 2 y 3: OTA-S 1, 2 y 3. Las secuencias se alinearon con el programa Bioedit (Hall, 1999) y presentaron un alto nivel de homología entre los genotipos evaluados (Fig. 18). De los 738 nucleótidos que componen cada secuencia, sólo se observaron diferencia de bases en dos posiciones. En la posición 248 sólo un genotipo apomítico mostró el cambio de una adenina por una guanina y en la posición 364 las tres secuencias del genotipo sexual presentaron una timina, mientras que las dos secuencias pertenecientes al genotipo apomítico facultativo Don Walter presentaron una adenina y en el genotipo Tanganyika una citocina.

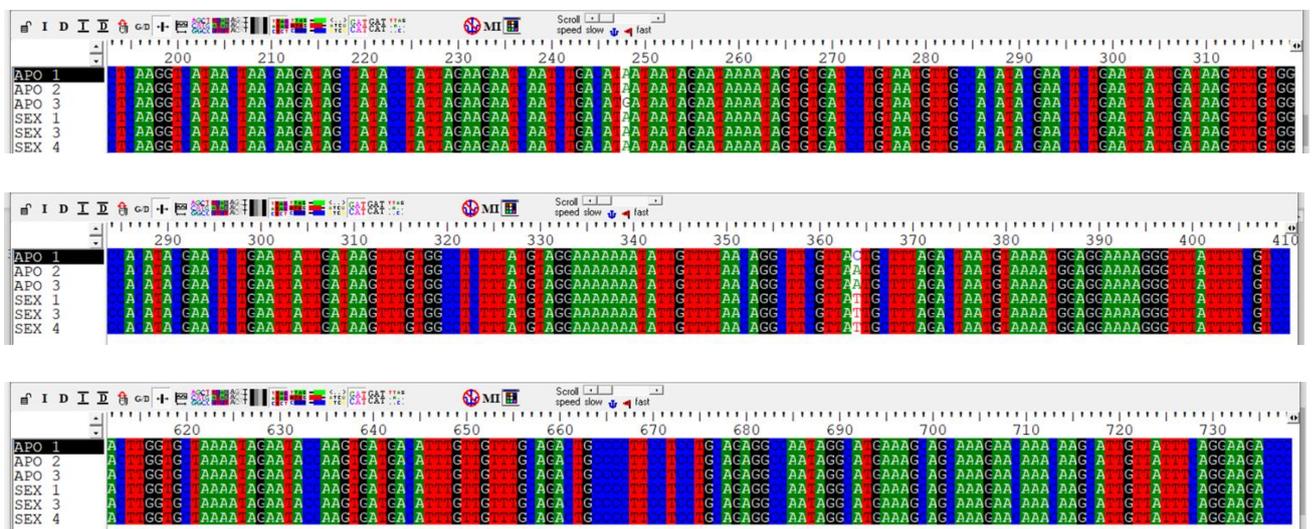


Figura 18. Comparación de las secuencias de los amplicones obtenidos por PCR con los cebadores EcROS1-like F2 + Rv correspondientes a los genotipos Tanganyika (APO1), Don Walter (APO 2 y 3) y OTA-S (SEX1, 2 y 3).

5.5 Estudio de expresión

Para los estudios de expresión se utilizaron los ADNc de cuatro genotipos, dos apomíticos (Tanganyika y Don Walter) y dos sexuales (OTA-S y PI208214). Se utilizaron dos réplicas biológicas para cada genotipo y las reacciones se hicieron por triplicado. Como gen control o gen de referencia se utilizó la enzima conjugadora de ubiquitina (EcUBICE). El análisis de los resultados se llevó a cabo con el programa CFX Maestro. Este programa utiliza la normalización de los datos en base al gen control utilizando la expresión relativa entre los distintos genotipos (Fig. 19). El programa también puede agrupar y analizar los resultados por grupo biológico, que en este caso se planteó un grupo de reproducción apomítica y otro grupo de reproducción sexual (Fig. 20). Para ninguna de las dos comparaciones de expresión se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

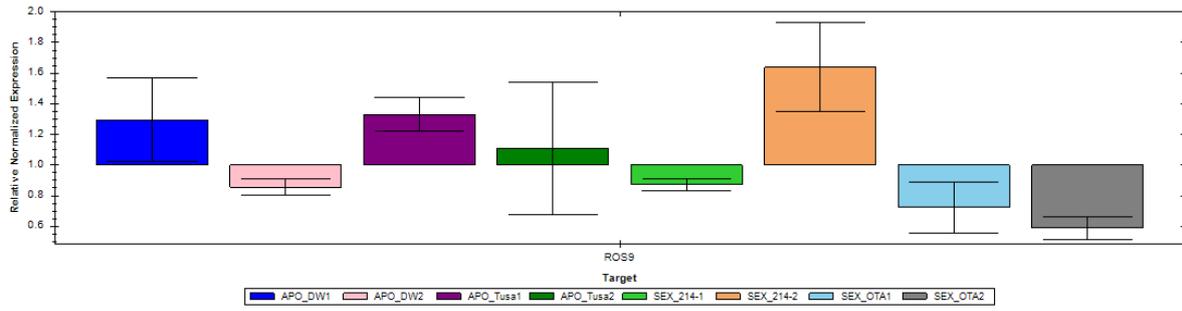


Figura 19. Gráfico de expresión diferencial entre las distintas muestras biológicas usadas en el estudio.

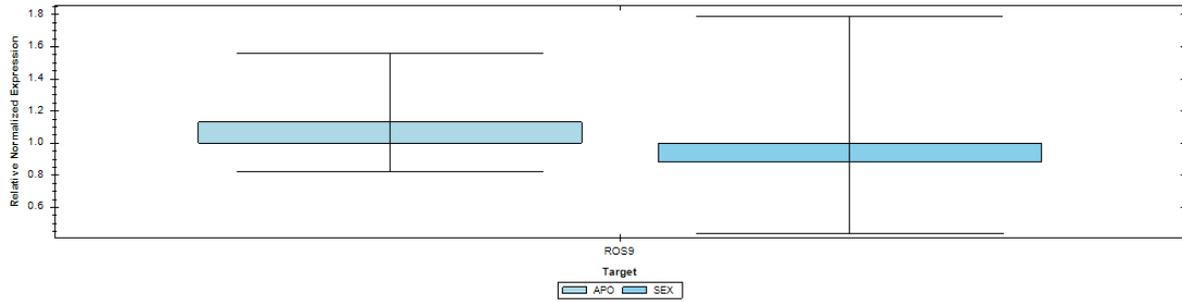


Figura 20. Gráfico de expresión diferencial entre los genotipos apomícticos y sexuales.

6 DISCUSIÓN

Previamente se había mencionado que en *A. thaliana*, el gen de mayor longitud de esta familia de ADN glicosilasas es DME y se expresa predominantemente en la célula central del saco embrionario antes de la fertilización (Choi et al., 2002; Gehring et al., 2006, 2009), mientras que ROS1, DML2 y DML3 se expresan en tejidos vegetativos (Gong et al., 2002; Penterman et al., 2007; Ortega-Galisteo et al., 2008)

En el caso de *E. curvula*, el ARN utilizado, tanto en los estudios previos (Selva et al., 2020; Carballo et al., 2021), como en este trabajo, fue extraído de la espiguilla entera, conformada por el tejido reproductivo de las flores en distintos estadios del desarrollo, junto a tejidos vegetativos correspondientes a los raquis, glumas y glumelas. Eso podría explicar porque los resultados del análisis de BLAST no son concluyentes, ya que no se puede asegurar cuál de las cuatro glicosilasas es la ortóloga de EcROS1-like, aunque presenta mayor similitud estructural con DME y ROS1A.

También se estudió en *A. thaliana* que ROS1 interviene en la regulación de genes bajo condiciones de estrés (Kim et al., 2019). En este sentido, el transcrito EcROS1-like se halló diferencialmente expresado en un ensayo de estrés hídrico (Selva et al 2020). Si bien el trabajo se llevó a cabo sobre espiguillas y se hipotetiza sobre su rol en el aumento de sacos embrionarios sexuales de un genotipo apomíctico facultativo bajo condiciones de estrés, podría ser que el gen diferencial esté relacionado a una respuesta al estrés y no al aumento de la sexualidad en el genotipo facultativo. Sin embargo, la hipótesis no se puede descartar totalmente debido a que el gen ROS1 actúa sobre varios genes (Qian et al., 2012).

7 CONCLUSIÓN

En este trabajo se logró la obtención de secuencias parciales de ADN para el gen EcROS1-like en tres genotipos de pasto llorón, un Apomítico obligado, un facultativo y uno completamente sexual. A pesar de que parte de la secuencia correspondía a un intrón predicho, las diferencias nucleotídicas entre los tres genotipos fueron mínimas.

Si bien los estudios previos del gen EcROS1-like mostraron diferencias de expresión del mismo en el genotipo facultativo Don Walter bajo condiciones de estrés hídrico, y un aumento en la expresión del gen estuvo relacionado con un aumento de la sexualidad en las espiguillas de plantas sometidas a estrés, en este trabajo donde se comparó la expresión de dicho gen en espiguillas de distintos genotipos con distinto modo reproductivo no se observó una diferencia significativa de la expresión del gen en estudio.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Agius, F., Kapoor, A., Zhu, J. K. (2006). Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proceeding National Academic of Science USA* 103: 11796–11801
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids Research*, 25, 3389-3402.
- Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T., García-Ortiz, M. V., Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A. P., Martínez-Macías, M. I., Schiliro, E., Ponferrada-Marín, M. I. (2009). Desmetilación activa del ADN: un mecanismo epigenético para la reactivación de genes silenciados. En Dorado, Jorrín, Tena, Fernández (Eds.), *III Jornadas de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular y Biotecnología*, pag. 23-26. Universidad de Córdoba, España.
- Carballo, J., Santos, B. A. C. M., Zappacosta, D., Garbus, I., Selva, J. P., Gallo, C. A., Díaz, A., Albertini, E., Caccamo, M., Echenique, V. (2019). A high-quality genome of *Eragrostis curvula* grass provides insights into Poaceae evolution and supports new strategies to enhance forage quality. *Scientific Reports*, 9(1), 10250.
- Carballo, J., Zappacosta, D., Selva, J. P., Caccamo, M., Echenique, V. (2021). *Eragrostis curvula*, a model species for diplosporous apomixis. *Plants*, 10(9), 1818.
- Cervigni, G., Paniego, N., Pessino, S., Selva, J. P., Díaz, M., Spangenberg, G., Echenique, V. (2008). Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels. *Plant Molecular Biology*, 67: 11–23.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Jacobsen, S. E., Fischer, R. L. (2002). DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell*, 110: 33–42
- Garbus, I., Romero, J., Selva, J. P., Pasten, M. C., Chinestra, C., Carballo, J., Zappacosta, D., Echenique, V. (2017). De novo transcriptome sequencing and assembly from apomictic and sexual *Eragrostis curvula* genotypes. *PLoS ONE*, 12, e0185595.
- Gehring, M., Huh, H., Hsieh, T. F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Fischer, R. L. (2006). DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell*, 124, 495–506.
- Gehring, M., Bubb, K. L., Henikoff, S. (2009). Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science*, 324, 1447–1451.

- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T., David, L., Zhu, J. K. (2002). ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, 111, 803–814.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hand, M. L., Koltunow, A. M. (2014). The genetic control of apomixis: Asexual seed formation. *Genetics*, 197(2), 441–450.
- Kim, J. S., Lim, J. Y., Shin, H., Kim, B. G., Yoo, S. D., Kim, W. T., Huh, J. H. (2019). ROS1-dependent DNA demethylation is required for ABA-inducible NIC3 expression. *Plant Physiology*, 180(4), 1810–1821.
- Kumar, S. (2017). Epigenetic control of apomixis: A new perspective of an old enigma. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 7(1), 227-233.
- Law, J. A., Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11, 204–220.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- MacRobert, J. F., Setimela, P. S., Gethi, J., Worku, M. (2015). *Manual de producción de semilla de maíz híbrido*. CIMMYT.
- Meier, M., Zappacosta, D., Selva, J. P., Cervigni, G., Echenique, V. (2008). La apomixis, su estudio y posibles usos. *AgroUNS*, 9, 10-13.
- Meier, M., Zappacosta, D., Selva, J. P., Pessino, S., Echenique, V. (2011). Evaluation of different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Australian Journal of Botany*, 59, 253–261.
- Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
- Nogler, G. A. (1984). Gametophytic apomixis. In B. M. Johri (Ed.), *Embryology of angiosperms*, pag. 475-518. Springer.
- Ono, A., Yamaguchi, K., Fukada-Tanaka, S., Terada, R., Mitsui, T., Iida, S. (2012). A null mutation of ROS1a for DNA demethylation in rice is not transmittable to progeny. *Plant Journal*, 71, 564–574.

- Ortega-Galisteo, A. P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T. (2008). Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Molecular Biology*, 67, 671–681.
- Ozias-Akins, P., van Dijk, P. J. (2007). Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annual Review of Genetics*, 41, 509–537.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J. H., Ballinger, T., Henikoff, S., Fischer, R. L. (2007). DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proceeding National Academic of Science USA*, 104, 6752–6757.
- Pupilli, F., Barcaccia, G. (2011). Cloning plants by seeds: Inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops. *Journal of Biotechnology*, 159, 291-311.
- Qian, W., Miki, D., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, X., Tang, K., Kan, Y., Li, X., Li, S., Zhu, X., et al. (2012). A histone acetyltransferase regulates active DNA demethylation in Arabidopsis. *Science*, 336, 1445–1448.
- Rodrigo, J. M., Zappacosta, D. C., Selva, J. P., Garbus, I., Albertini, E., Echenique, V. (2017). Apomixis frequency under stress conditions in weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). *PLoS ONE*, 12(4), e0175852.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding National Academic of Science USA*, 74(12), 5463–5467.
- Schmidt, A. (2020). Controlling apomixis: Shared features and distinct characteristics of gene regulation. *Genes*, 11(3), 329.
- Selva, J. P., Pessino, S., Meier, M., Echenique, V. (2012). Identification of candidate genes related to polyploidy and/or apomixis in *Eragrostis curvula*. *American Journal of Plant Sciences*, 3, 403-416.
- Selva, J. P., Siena, L., Rodrigo, J. M., Garbus, I., Zappacosta, D., Romero, J., Ortiz, J. P., Pessino, S., Leblanc, O., Echenique, V. (2017). Temporal and spatial expression of genes involved in DNA methylation during reproductive development of sexual and apomictic *Eragrostis curvula*. *Scientific Reports*, 7, 15092.
- Selva, J. P., Zappacosta, D., Carballo, J., Rodrigo, J. M., Bellido, A., Gallo, C. A., Gallardo, J., Echenique, V. (2020). Genes modulating the increase in sexuality in the facultative diplosporous grass *Eragrostis curvula* under water stress conditions. *Genes*, 11, 969.
- Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I., Vorobyev, D. (2006). Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biology*, 7(Suppl 1), 10.1-10.12.

Voigt, P. W., Bashaw, E. C. (1976). Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. *Crop Science*, 16, 803-806.

Zappacosta, D., Gallardo, J., Carballo, J., Meier, M., Rodrigo, J.M., Gallo, C., Selva, J.P., Stein, J., Ortiz, J.P., Albertini, E., et al. (2019). A high-density linkage map of the forage grass *Eragrostis curvula* and localization of the diplospory locus. *Frontiers in Plant Science*, 10, 918.

Zappacosta, D., Ochogavía, A., Rodrigo, J.M., Romero, J., Meier, M., Polci, P., et al. (2014). Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploid. *Scientific Reports*, 4, 4423.

Zhu, J.K. (2009). Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annual Review of Genetics*, 43, 143-166.