

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



“Diseño experimental para el estudio de la posible función de la citrato sintasa mitocondrial de *Annona cherimola* (Ac-mCS) en la maduración de frutos”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

JORGE JAVIER LAGRÈZE PÉREZ

Director del Seminario de Título: Dr. Mauricio González Agüero

Profesor Patrocinante: Dr. Michael Handford

Junio, 2018

Santiago, Chile

BIOGRAFÍA



Asumí la labor de escribir una biografía o autobiografía con el mero objetivo de relatar eventos precedentes al momento en que se realiza este escrito, con la última motivación de responder al requerimiento precisado. Sin embargo, me he rendido ante la necesidad de llenar un espacio con eventos poco relevantes para cualquiera más que para mí. Por ello, me limito a escribir que crecí en una ciudad del sur del país, y que rodeado de quienes para mí son importantes, he vivido mi infancia, adolescencia y estos años de adultez, rodeándome finalmente de quienes aprecio tanto por elección como por casualidad, lo que ha venido repitiéndose durante estas tres décadas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Chirimoya, maduración y acidez	3
1.2 Ciclo de los ácidos tricarbóxicos, ácidos orgánicos y citrato sintasa mitocondrial	5
1.3 Citrato sintasa y expresión heteróloga	8
1.4 Región promotora de poligalacturonasa de <i>Solanum lycopersicum</i>	9
1.5 Propuesta de estudio	10
1.6 Objetivos	12
1.6.1 Objetivo General	12
1.6.2 Objetivos Específicos	12
2 MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 Estrategia de estudio	13
2.2 Material Biológico	15
2.2.1 Cultivo de Bacterias	15
2.2.2 Transformación de Bacterias	17
2.2.3 Cultivo de Plantas	19
2.2.4 Transformación de Plantas	20

2.3	Biología Molecular	24
2.3.1	Partidores	24
2.3.2	Reacciones de PCR	25
2.3.3	Electroforesis en gel de agarosa	27
2.3.4	Purificación de ADN desde gel de agarosa	28
2.3.5	Cuantificación de ácidos nucleicos	28
2.3.6	Generación de vectores de entrada	29
2.3.7	Generación del vector de destinación pGWB2::PG	30
2.3.8	Generación de vectores de expresión	31
2.4	Análisis	32
2.4.1	Análisis <i>in silico</i> de localización subcelular	32
2.4.2	Análisis de Bacterias	32
2.4.3	Análisis de Plantas	35
3	RESULTADOS	39
3.1	Determinación de la localización subcelular de <i>Ac-mCS</i>	39
3.1.1	Determinación <i>in silico</i> de la localización subcelular de <i>Ac-mCS</i>	39
3.1.2	Determinación de la localización subcelular de <i>Ac-mcCS</i> en hojas de <i>Nicotiana tabacum</i>	39
3.2	Generación de vectores para expresión estable en plantas, constitutiva y fruto-específica, portadores de <i>Ac-mCS</i> y transformación de <i>S. lycopersicum</i> var Micro - Tom	47
3.2.1	Generación del vector de destinación pGWB2::PG	51
3.2.2	Transformación estable de explantes de <i>Solanum lycopersicum</i> con las construcciones pGWB2:: <i>Ac-mCS</i> y pGWB2::PG:: <i>Ac-mCS</i>	56
3.2.3	Análisis molecular de plántulas	58
4	DISCUSIÓN	61
4.1	Transformación transitoria y localización subcelular	61
4.1.1	Localización subcelular de <i>Ac-mCS</i> <i>in silico</i>	61

4.1.2	Transformación transitoria de <i>Nicotiana tabacum</i>	62
4.2	Transformación estable de <i>S. lycopersicum</i>	67
4.2.1	Generación del vector de expresión pGWB2::PG	67
4.2.2	Transformación y organogénesis somática de <i>S. lycopersicum</i>	69
5	CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	755
6	ANEXOS	766
6.1	Anexo I	766
7	BIBLIOGRAFÍA	777

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Resumen de vectores utilizados y sus resistencias a antibiótico en bacteria.	16
Tabla II. Resumen de partidores utilizados.	25
Tabla III. Resumen de Programas de PCR.	27
Tabla IV. Reacciones de PCR de colonia.	33
Tabla V. Ensayos de Restricción de Minipreparaciones de ADN plasmidial.	35
Tabla VI. Reacciones de PCR usando ADNg de tomate.	38
Tabla VII. Fragmentos de restricción de pGWB2 y pGWB2::PG.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acidez titulable y expresión relativa de <i>Ac-mCS</i> .	5
Figura 2. Metabolismo de ácidos orgánicos.	7
Figura 3. Región promotora del gen de poligalacturonasa de tomate.	10
Figura 4. Resumen de la estrategia de estudio.	14
Figura 5. Vectores de expresión utilizados para transformación estable y transitoria.	31
Figura 6. Resultados de predicción de la localización subcelular de <i>Ac-mCS</i> .	40
Figura 7. Clonación del fragmento <i>Ac-mCS</i> Rns.	42
Figura 8. Daño por efecto de la Agroinfiltración.	44
Figura 9. Determinación de la localización subcelular de <i>Ac-mCS</i> .	46
Figura 10. Clonación del Fragmento <i>Ac-mCS</i> .	48
Figura 11. Clonación del Fragmento HindIII-promPG-XbaI y construcción del vector pGWB2::PG.	53
Figura 12. Construcción del vector pGWB2::PG:: <i>Ac-mCS</i>	54
Figura 13. Transformación de explantes de <i>S. lycopersicum</i> y organogénesis somática	58
Figura 14. Análisis molecular de plántulas de <i>S. lycopersicum</i> transformantes.	60
Figura S1. Análisis molecular de plántulas de <i>S. lycopersicum</i> transformantes.	75

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

% p/v	Porcentaje masa/volumen
% v/v	Porcentaje volumen/volumen
~	Aproximadamente
ACO	Aconitasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN clonal
ADNg	ADN genómico
ATP	Adenosin-trifosfato
BP	Paso banda (filtro electromagnético)
bp-pb	Pares de bases
C+	Control positivo
C-	Control negativo
CaMV 35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
CoA	Coenzima A
CS	Citrato Sintasa
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dNTP	Desoxirribonucleotidos trifosfato
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
EYFP	Proteína fluorescente amarilla mejorada
g	gramo
h	hora
HPT	Higromicine phosphotransferase
kb	kilobase
L	litro
LB	Lysogeny broth (caldo de lisogenia)
M	Molar
m	metro
m-	mitocondrial
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milimetro
mM	milimolar
MPP	Peptidasa de procesamiento mitocondrial
MS	Medio Murashige & Skoog
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAD-MDH	NAD – Malato deshidrogenasa
ng	nanogramos
nm	nanometros
OAA	Ácido oxalacético
°C	grados Celcius

p-	plastidial
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PG	Poligalacturonasa
promPG	Promotor de Poligalacturonasa
qPCR	PCR cuantitativo
RPM	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
s	Segundos
t	Tiempo
TAE	Tris – Acetato – EDTA
TCA	Ciclo de ácidos tricarboxílicos
TE	Tris – EDTA
TG	Transgénico
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades enzimáticas
V	Voltio
WT	Wild - type
µg	microgramos
µL	microlitros
µM	micromolar
S.O.C.	Caldo superóptimo con represión por catabolito
GUS	β-glucuronidasa

RESUMEN

Durante la maduración de los frutos, existen cambios a nivel fisiológico y bioquímico, como son: variaciones en la respiración, textura, color y acidez; como consecuencia de la remodelación de la pared celular, síntesis y degradación de pigmentos y variaciones en la acumulación de azúcares y ácidos orgánicos. Los dos últimos, son utilizados por las células vegetales como sustratos respiratorios, y particularmente los ácidos orgánicos como el ácido cítrico y málico tienden a ser degradados a lo largo de la maduración. En contraposición a lo anterior, estudios previos realizados en nuestro laboratorio en frutos de *Annona cherimola* var. Concha Lisa, se encontró mayores niveles de ácido cítrico, mayor actividad citrato sintasa y una mayor acumulación de transcrito codificante para la enzima citrato sintasa (CS) en el estado de madurez de consumo en comparación con el estado analizado en cosecha. Considerando lo anterior, la enzima CS parece tener un rol importante en la acumulación de citrato en frutos de chirimoya. Como una primera aproximación al estudio de su posible función, este seminario de título tiene por objetivo general caracterizar Ac-mCS mediante su localización subcelular en *N. tabacum* y la transformación estable de *S. lycopersicum*, a través de dos estrategias enfocadas en la expresión heteróloga de la enzima mCS de *A. cherimola* var. Concha lisa. Se observó mediante microscopía confocal, que la enzima Ac-mCS posee localización mitocondrial en hojas de *Nicotiana tabacum*. Por otro lado, para la transformación de tomate se construyeron y utilizaron dos vectores para la expresión heteróloga de Ac-mCS bajo el control del promotor CaMV 35S y de un fragmento del promotor de poligalacturonasa de tomate (PG), sometándose los explantes de tomate a la transformación y organogénesis somática, pero sin lograr obtener plantas transgénicas adultas.

ABSTRACT

During fruit ripening, biochemical and physiological changes occur, such as variations in respiratory rate, texture, colour, and acidity; as a consequence of the cell wall remodeling, pigments synthesis and degradation, and variations in the accumulation of sugar and organic acids. The latter ones, are vegetable cell metabolic substrates, and particularly organic acids such as citric and malic acid, tend to be degraded during ripening. However, previous studies held in our laboratory in *Annona cherimola* cv Concha Lisa fruits, showed increased levels in citric acid, increased citrate synthase activity and large mitochondrial citrate synthase (Ac-mCS) transcript accumulation at consumption maturity compared to the analyses performed at harvest. Considering all these points, citrate synthase seems to account for an important role in the citrate accumulation in cherimola fruit. As a first approach to the potential function of this enzyme, the main objective of this work was to characterize Ac-mCS by subcellular localization in *N. tabacum*, and stable transformation of *S. lycopersicum*, using two strategies, both of them focused in the mCS enzyme heterologue expression from *A. cherimola* cv. Concha Lisa. Confocal microscopy in *Nicotiana tabacum* leaves revealed that the Ac-mCS enzyme has a mitochondrial localization. On the other hand, two expression vectors were built and used to express Ac-mCS under the transcriptional control of the CaMV 35S promoter or the tomato polygalacturonase promoter fragment (PG). Tomato explants were, subjected to the transformation process, and somatic organogenesis, but no adult transgenic plants were obtained.

1 INTRODUCCIÓN

La chirimoya (*Annona cherimola*), es un el fruto de un árbol andino subtropical que crece entre los 700 y 2.400 m de altura (Bicas y cols., 2011), cultivado en varios países de zonas subtropicales como Colombia, Perú, Ecuador y Chile (Perfectti y Pascual, 2005). Es un fruto de sabor característico debido a su dulzura, textura y aroma, que resulta placentero al consumo (Bicas y cols., 2011). En Chile, el cultivo de chirimoya se distribuye entre las regiones de Atacama y Metropolitana, alcanzando un área de cultivo cercana a las 470 hectáreas (ODEPA, 2014). Aproximadamente 149 toneladas de chirimoyas fueron exportadas en el periodo 2014-2015 (MINAGRI, 2016), siendo la producción principalmente enfocada al mercado interno.

1.1 Chirimoya, maduración y acidez

La maduración de los frutos es un proceso que corresponde a la fase final del desarrollo floral, siendo la suma de cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren en esta etapa del desarrollo (Giovannoni, 2001). En general, estos cambios incluyen modificación de la estructura de la pared celular, cambios en la textura de los frutos, cambios en la cantidad de azúcares producto de la degradación de almidón, cambios en la biosíntesis de pigmentos y acumulación de compuestos volátiles relacionados con aroma y sabor (Giovannoni, 2001). Estos cambios vuelven a los frutos comestibles y atractivos para animales que ayudan a la dispersión de semillas. Los frutos climatéricos como es el caso de chirimoya (Palma y cols., 1993), se caracterizan por mostrar durante su maduración un aumento en la tasa respiratoria y de producción de etileno, característica que los diferencia de los frutos no climatéricos (Giovannoni, 2001). La magnitud y el patrón de la respiración puede variar enormemente entre frutos

diferentes, observándose incluso que frutos con mayores tasas respiratorias suelen madurar mas rápido (Taylor y cols., 1993).

Un atributo muy importante que se ve alterado durante la maduración es el cambio en el sabor. La percepción del sabor está basada en dos sentidos como son el gusto y el olfato. En los frutos, son los azúcares y los ácidos orgánicos los que contribuyen principalmente al gusto, con excepción de la astringencia, que es debida al contenido de taninos y compuestos fenólicos; y es la interacción entre todos estos componentes, en conjunto con los compuestos volátiles, la que determina el sabor. Los azúcares y ácidos orgánicos son los principales substratos respiratorios; particularmente los ácidos orgánicos; que en proporción, son mayormente utilizados. En relación a éstos, los principales en frutos son el malato y el citrato. El nivel de ácidos orgánicos presentes en los frutos generalmente muestra una disminución durante la madurez, debido posiblemente a su uso como sustrato respiratorio (Taylor y cols., 1993), generándose un cambio en la composición de ácidos orgánicos, traduciéndose en una disminución de la acidez de los frutos (González-Agüero y cols., 2016). En relación a este fenómeno, los frutos de *A. cherimola* y de otras especies del género *Annona* muestran un comportamiento diferente, caracterizado por un aumento en la acidez (medida como acidez titulable), que se encuentra asociado a uno de los aumentos en la tasa de respiración debido a la producción de ácidos orgánicos (Palma y cols., 1993). Se ha propuesto que la acumulación de ácido cítrico o málico podrían ser responsables del aumento en la acidez titulable observada (Palma y cols., 1993), siendo el ácido málico el predominante (Manríquez, y cols., 2014) (Figura 1A).

Estudiando la composición de ácidos orgánicos en etapas de postcosecha de chirimoyas var. "Concha Lisa", particularmente de ácido tartárico, málico, ascórbico y cítrico, se ha observado una acumulación tanto de ácido málico como cítrico,

mostrándose incrementos de 2 y 5 veces respectivamente entre la cosecha y madurez de consumo (González-Agüero y cols., 2016). Del mismo modo, al estudiar la expresión de genes involucrados en el metabolismo de ácidos orgánicos (málico y cítrico), se encontró un aumento en la expresión del gen que codifica para la citrato sintasa mitocondrial (*Ac-mCS*) (González-Agüero y cols., 2016) (Figura 1B). Estos ensayos realizados en nuestro laboratorio (al igual que los anteriores), muestran que junto con el aumento de la expresión génica de *Ac-mCS* y la acumulación de ácido cítrico durante la madurez, se observa un aumento en la actividad citrato sintasa.

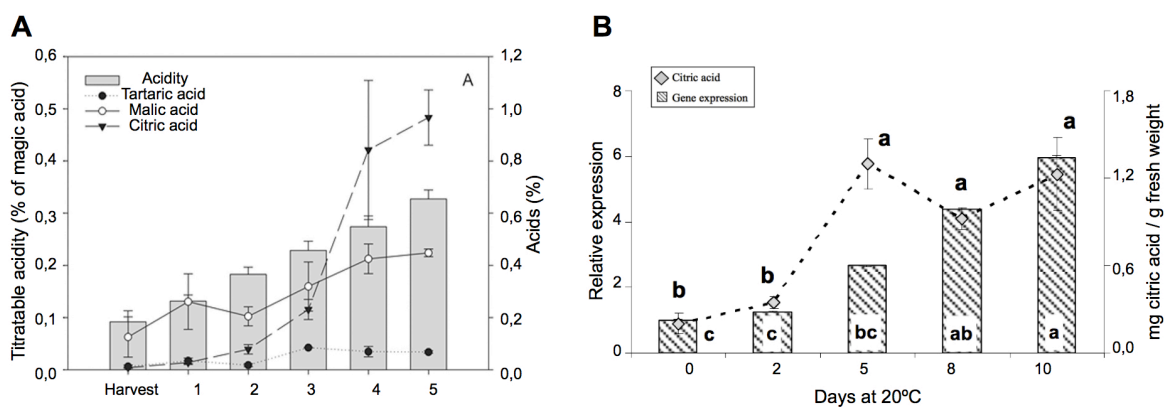


Figura 2. Acidez titulable y expresión relativa de *Ac-mCS*. **A**, acidez titulable y análisis de ácidos orgánicos en frutos de *Annona cherimola* var. Concha Lisa durante 5 semanas desde su cosecha. Se observa una tendencia al aumento de la acidez titulable durante las 5 semanas posteriores a la cosecha, misma tendencia que se observa de los ácidos orgánicos (málico, tartárico y cítrico). **B**, expresión relativa del gen citrato sintasa y mg de ácido cítrico por gramo de peso fresco, evidenciándose un aumento de la expresión y de la acumulación de citrato sintasa y de ácido cítrico, durante el período medido durante la maduración. (Imágenes A y B modificadas de Manríquez, y cols., 2014 y González-Agüero y cols., 2016 respectivamente).

1.2 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ácidos orgánicos y citrato sintasa mitocondrial

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) es una vía metabólica con características universales en los organismos con metabolismo aeróbico (Sweetlove y cols., 2010) (Figura 2). Comúnmente, se describe a este ciclo para hacer alusión al

metabolismo energético celular, siendo el responsable de la oxidación de sustratos, como ácidos orgánicos, llevando a la síntesis de ATP como resultado de las diversas reacciones (Etienne y cols., 2010). La función del ciclo no es meramente energética, sino que permite la obtención de fuentes de carbono reducidas, ATP y moléculas orgánicas para procesos biosintéticos (Sweetlove y cols., 2010). En resumen, en el modo cíclico convencional de la vía, la enzima citrato sintasa (CS) forma citrato al condensar oxalacetato (OAA) y acetil-CoA (Sweetlove y cols., 2010), y luego de otras reacciones enzimáticas, se obtiene OAA como sustrato para empezar nuevamente el ciclo (Figura 2). Los ácidos orgánicos son acumulados durante el desarrollo de los frutos y son procesados como sustratos para la respiración tanto en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como en la glicólisis (González-Agüero y cols., 2016). En los frutos carnosos, como la chirimoya, la acidez es producto de la presencia de ácidos orgánicos, siendo el ácido málico y el cítrico los principales encontrados en la mayoría de los frutos maduros, y particularmente este último el principal en frutos pertenecientes al género *Citrus* (Etienne y cols., 2013). El proceso de formación y degradación de los ácidos orgánicos tiene lugar en diferentes localizaciones a nivel celular. En este sentido, la formación de fosfoenolpiruvato (PEP) resulta ser el paso inicial en la síntesis de ácidos orgánicos. En el citosol, el PEP es transformado a OAA, el cual a su vez es transformado en malato gracias a las enzimas PEP carboxilasa y NAD malato deshidrogenasa (NAD-MDH) respectivamente (Figura 2), o bien, el OAA puede ser utilizado como un sustrato para el ciclo TCA (Etienne y cols., 2013). En esta vía, OAA y malato, pueden ser convertidos a citrato, el cual continuando en la vía, puede ser utilizado como sustrato para la síntesis de otros ácidos, los cuales modifican la acidez celular. Tomando al citrato como el compuesto de interés, éste puede ser modificado por dos enzimas mitocondriales que son: la citrato sintasa (CS, E.C.

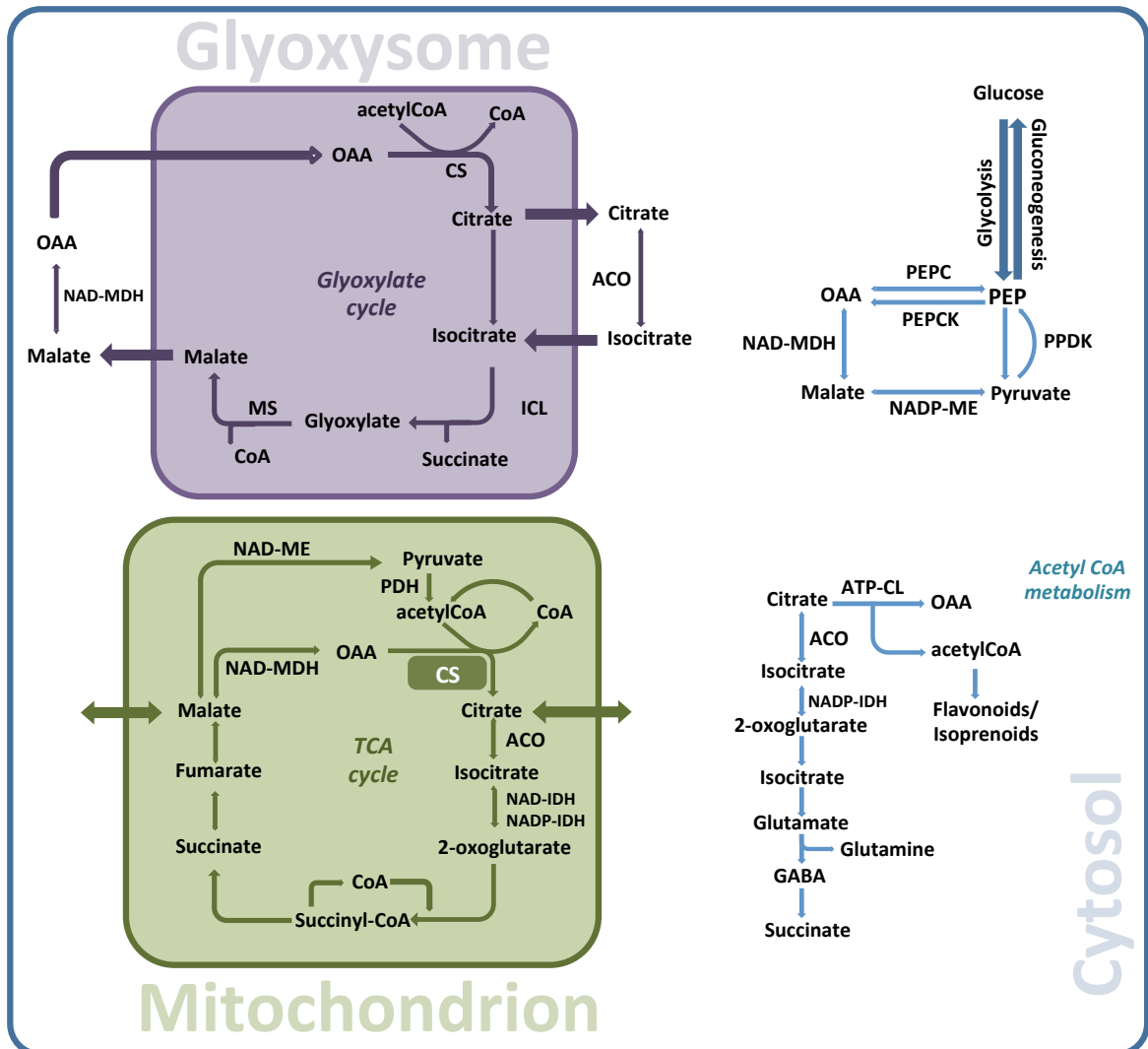


Figura 2. Metabolismo de ácidos orgánicos. Se muestra al interior de la mitocondria, en un cuadro verde oscuro, el paso llevado a cabo por la enzima citrato sintasa mitocondrial (mCS). Los ácidos orgánicos son componentes fundamentales en los frutos. Los metabolitos forman parte de varias vías interrelacionadas. El malato y piruvato pueden entrar a la mitocondria y entrar al ciclo de los ácidos tricarbónicos, en el cual se genera citrato como uno de los intermediarios de ciclo. Es posible observar que el citrato, puede ser generado igualmente en el citosol, en el metabolismo de acetil-CoA y en el glioxisoma, donde también es posible encontrar una isoforma enzima citrato sintasa (Adaptado de Etienne y cols., 2013).

2.3.3.1) y aconitasa (ACO, E.C. 4.2.1.3), la primera relacionada con la acumulación de citrato en cítricos (Sadka, y cols., 2001) y la segunda con su degradación. La síntesis de ácido cítrico, como fue mencionado anteriormente, es llevada a cabo por la enzima citrato sintasa, al condensar OAA y acetil-CoA, proceso importante por ejemplo en frutos cítricos, donde se ha observado una importante acumulación de citrato tanto

previo a la maduración, y en algunos casos, incluso es mantenida durante todo esta etapa (Lin y cols., 2015).

1.3 Citrato sintasa y expresión heteróloga

Anteriormente, ya se ha realizado la expresión de citrato sintasa (proveniente de diversos organismos) en plantas. Se ha relacionado una mayor presencia de ácidos orgánicos con un aumento en el ingreso de nutrientes desde el suelo. Un gen de citrato sintasa mitocondrial de *A. thaliana* fue expresado en zanahoria (*Daucus carota*), observándose mayor expresión de transcrito, mayor excreción de citrato al medio, así como un mayor ingreso de fósforo desde el suelo a la planta (Koyama y cols., 1999). El mismo efecto fue observado en plantas de *A. thaliana*, las cuales fueron transformadas con un gen de citrato sintasa proveniente de zanahoria (*Dc-CS*) (Koyama y cols., 2000). Igualmente se ha realizado la expresión de una citrato sintasa mitocondrial de *Citrus junos* (*Cj-CS*) en *Nicotiana benthamiana*, observando que al exponer las plantas a medio con altos niveles de aluminio (Al), existía una mayor expresión de transgén, mayor actividad de la enzima *Cj-CS*, mayor exudación de citrato en las raíces de la planta y mayor crecimiento de las raíces, mostrando que las plantas con el gen *Cj-CS* tenían mayor tolerancia al metal en cuestión (Deng y cols., 2009). Existen otros ejemplos en los que se ha expresado homólogos de la enzima CS de diferentes plantas, mostrando resultados similares (López-Bucio y cols., 2000; Anoop y cols., 2003; Han y cols., 2012).

1.4 Región promotora de poligalacturonasa de *Solanum lycopersicum*

El proceso de maduración de los frutos, como ya fue mencionado, está asociado a diversos cambios fisiológicos y bioquímicos, como la degradación de clorofila, aumento en la síntesis de etileno, solubilización de la pared celular y ablandamiento de los frutos (Bird y cols., 1988). Una de las principales enzimas que participan en la degradación de la pared celular en frutos durante su maduración es la poligalacturonasa (PG); viéndose además, que la acumulación de transcrito se incrementa durante la maduración de los frutos (Bird y cols., 1988). La expresión de poligalacturonasa en tomate, se encuentra regulada por una región promotora presente en 5' de la ubicación del gen, habiéndose determinado igualmente que un fragmento de 1.4 kb es capaz modular la expresión génica en frutos en el proceso de maduración (Montgomery y cols., 1993), identificándose la presencia de regiones que actúan como reguladores *cis* de la expresión en la secuencia del promotor de PG (en la región de 1.4 kb), una de las cuales es un regulador negativo de la expresión (entre -1411 y -1150), mientras que las otras dos regiones (ubicadas entre -806 y la caja TATA) muestran ser reguladores positivos (Montgomery y cols., 1993) (Figura 3), fenómeno descubierto al hacer deleciones progresivas de la región promotora previamente descrita desde el extremo 5'. Debido a la capacidad de regular la expresión génica de modo fruto específica y madurez específica, se ha propuesto al promotor de poligalacturonasa como una herramienta útil para estudios que involucran la modificación génica (Lau y cols., 2009).

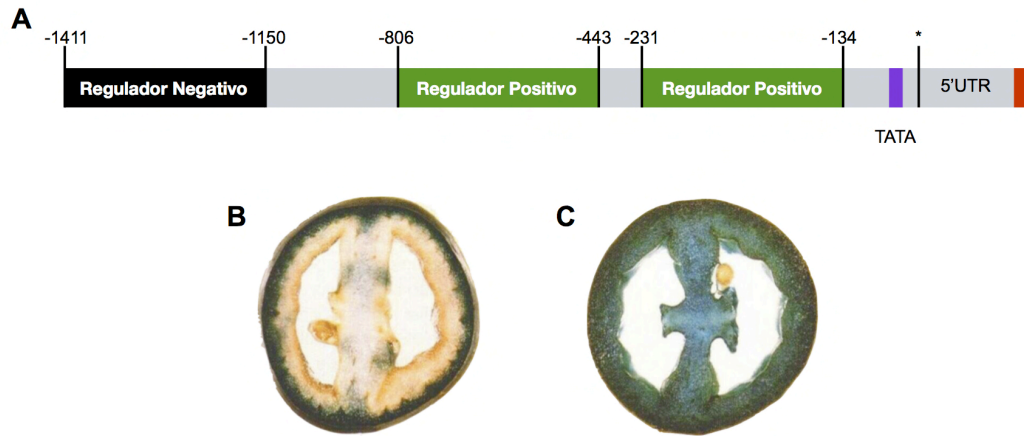


Figura 3. Región promotora del gen de poligalacturonasa de tomate. **A**, región del promotor de poligalacturonasa de *S. lycopersicum*, y la región no traducida en 5' (5'UTR) descrita por Montgomery y cols., 1993. En negro y en verde, se muestran respectivamente regiones reguladoras negativa y positivas de la expresión al interior de la secuencia promotora. En morado se observa una posible caja TATA. Resaltado en rojo se encuentra el último nucleótido previo a al codón de inicio de la traducción en el primer exón del gen de poligalacturonasa de tomate. El asterisco (*) muestra el sitio de inicio de la transcripción. El fragmento completo esquematizado posee un tamaño 1417 pb. En **B** y **C**, se muestra secciones de tomate transformados con el fragmento de ADN expuesto en **A** regulando la expresión del gen de β -glucuronidasa (PG-GUS), mostrándose el resultado de la incubación con X-gluc. **B**, muestra el resultado para transformación con el fragmento completo, y **C**, para el mismo fragmento sin el regulador negativo (desde -1150 hasta la marca en rojo).

1.5 Propuesta de estudio

Se ha descrito la presencia de diferentes ácidos orgánicos como elementos que contribuyen a la acidez del fruto de chirimoya durante su desarrollo y maduración, e igualmente se ha observado que el ácido málico y cítrico son los que mayor acumulación muestran en esta etapa; sin embargo, aún no es claro el mecanismo responsable de la acumulación/degradación de citrato. Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, esto es, que se ha encontrado un aumento significativo en la acumulación de ácido cítrico en frutos de chirimoya en un momento posterior a la cosecha, así como la correlación de ésta con aumentos en la expresión del gen *Ac-mCS* y de la actividad de CS (González-Agüero y cols., 2016), la enzima mCS resulta un candidato importante a ser estudiado como un posible responsable de estas observaciones. Por ello, creemos que es esta la enzima clave en el aumento poco

convencional observado en la acidez en los frutos de chirimoya que como ha sido previamente mencionado, es un comportamiento contrario a la generalidad de los frutos. Para esto, se propone transformar establemente la especie modelo de fruto *Solanum lycopersicum* var. Micro-Tom con el gen *Ac-mCS*. Para ello, se realizó la construcción de vectores de expresión en plantas, portadores de la secuencia nucleotídica codificante de *Ac-mCS* (KU52448.1), bajo la regulación del promotor de expresión constitutiva CaMV 35S y de un fragmento del promotor de poligalacturonasa (PG) de *S. lycopersicum* de 1150 pb, previamente reportado (Montgomery y cols., 1993). Con ellos, se transformó establemente explantes de *S. lycopersicum*, esperando generar líneas transgénicas de tomate que expresen la enzima *Ac-mCS*, con el fin de caracterizar funcionalmente la enzima en estudios posteriores. Además, como un primer acercamiento a dicha caracterización, se verificó la localización subcelular del producto codificado por *Ac-mCS* realizando un análisis *in silico* de su localización con herramientas bioinformáticas, y luego mediante transformación transitoria de *N. tabacum* y análisis mediante microscopía confocal.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo General

Caracterizar funcionalmente mediante localización subcelular en *Nicotiana tabacum* y transformación estable en *Solanum lycopersicum*, una posible enzima citrato sintasa mitocondrial de *Annona cherimola* (Ac-mCS) y estudiar su participación durante la maduración de frutas.

1.6.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la localización subcelular del producto génico de *Ac-mCS* en *Nicotiana tabacum*.
2. Transformar establemente explantes de *S. lycopersicum* con vectores para la expresión constitutiva y fruto-específica de *Ac-mCS* y obtener líneas transgénicas de tomate.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estrategia de estudio

Para realizar el estudio de la posible citrato sintasa mitocondrial de *Annona cherimola*, se realizaron dos actividades importantes. La primera de ellas, transformación transitoria de hojas de *N. tabacum*, procedimiento para el cual se realizó la clonación del fragmento de ADN codificante para Ac-mCS (sin codón de término) en el vector pEarleyGate101 (Earley y cols., 2006), el cual genera una proteína de fusión Ac-mCS::EYFP. Células de *A. tumefaciens*, fueron transformadas con el vector generado (pEarleyGate101::Ac-mCS) y con su respectivo control (pEarleyGate101 vacío), y fueron utilizadas para transformar transitoriamente hojas de tabaco mediante agroinfiltración, las cuales luego fueron utilizadas para su análisis mediante microscopía confocal (Figura 4A). La segunda actividad, corresponde a la transformación de *S. lycopersicum* var. Micro-Tom. Para ello, se decidió expresar Ac-mCS bajo la regulación de CaMV 35S y de un fragmento del promotor de poligalacturonasa (PG). Para el primer caso, el fragmento de ADN Ac-mCS fue amplificado por PCR y clonado en el vector pGWB2, generando el vector (pGWB2::Ac-mCS) como se muestra en la Figura 4B. Para el segundo caso se modificó el vector pGWB2, reemplazando el promotor CaMV 35S por un fragmento del promotor de PG de tomate Micro-Tom descrito en la literatura (Montgomery y cols., 1993), y posteriormente el fragmento Ac-mCS fue clonado en el vector pGWB2 modificado. Los vectores generados, fueron utilizados para transformar *A. tumefaciens*, así como sus respectivos controles negativos (vectores pGWB2 y pGWB2::PG vacíos) tal como se observa en la Figura 4B. Finalmente, se transformó cotiledones de tomate Micro-Tom con las construcciones generadas mediante el co-cultivo de éstos con *A. tumefaciens*, realizando posteriormente organogénesis somática para obtener plantas modificadas

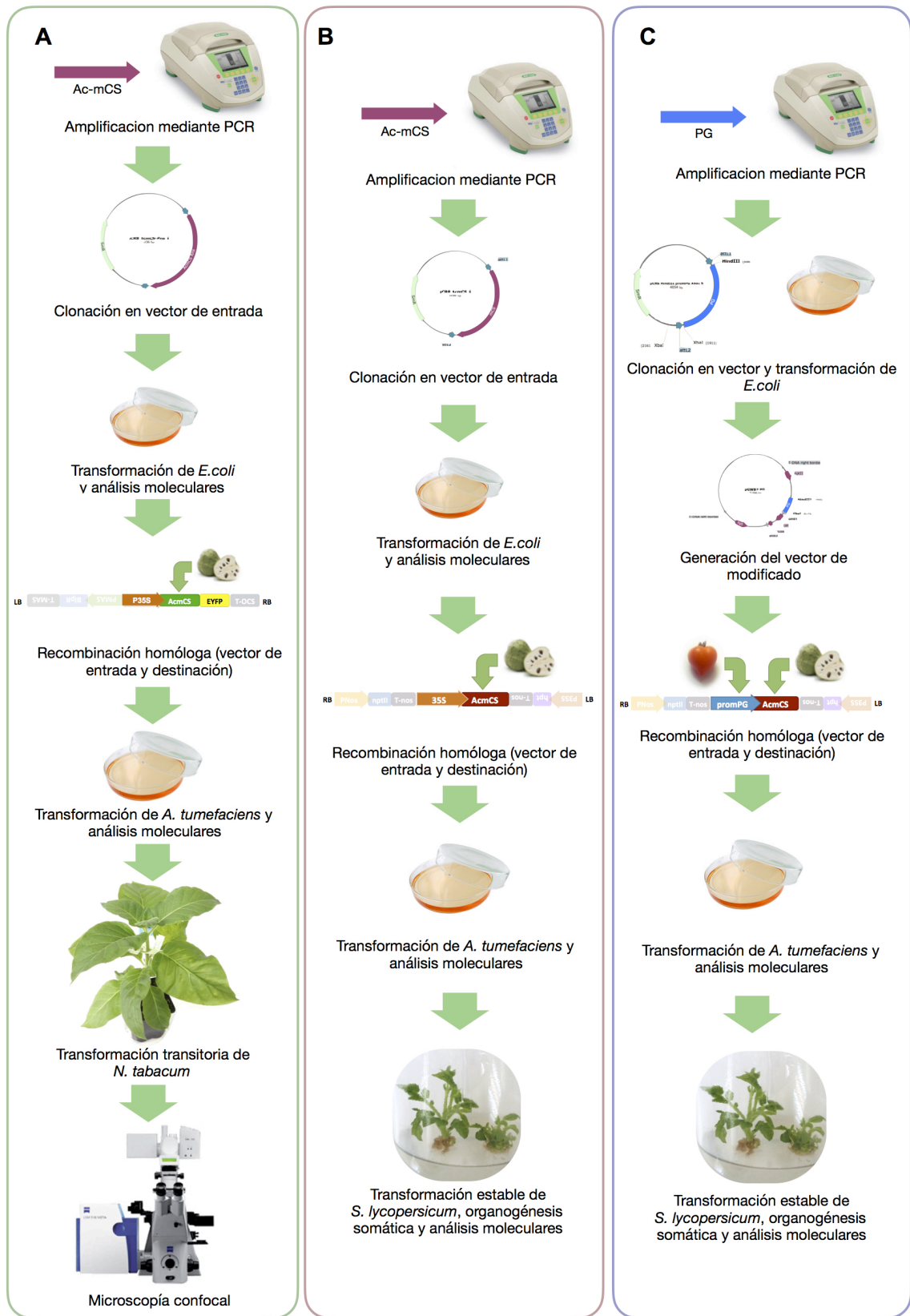


Figura 4. Resumen de la estrategia de estudio. **A**, transformación transitoria de *N. tabacum* y posterior análisis mediante microscopía confocal, **B** y **C**, Actividades relacionadas con la clonación de *Ac-mCS* y transformación estable de *S. lycopersicum*, **C**. Generación del vector pGWB2 modificado además de la correspondiente transformación estable de tomate

genéticamente, de modo que éstas sean útiles para posteriores análisis funcionales de la posible enzima citrato sintasa.

2.2 Material Biológico

2.2.1 Cultivo de Bacterias

2.2.1.1 Cultivo de *Escherichia coli*

Se utilizaron las cepas de *E. coli* quimicompetentes comerciales: One Shot™ TOP10 (Invitrogen™, EE.UU.) genotipo F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG* y One Shot® ccdB Survival™ 2 T1^R (Invitrogen™, EE.UU.) genotipo F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG* *fhuA::IS2*, siendo esta última utilizada para las transformaciones con los vectores sin inserto (pEarleyGate101, pGWB2 y pGWB2::PG).

Las células de *E. coli* utilizadas en las diferentes parte del desarrollo experimental, fueron cultivadas en medio LB (LB Broth, MO BIO Laboratories Inc, EE.UU.), líquido y sólido (igual que medio líquido, más 8 g/L de Agar agar). El cultivo líquido se realizó en 5 mL de medio líquido suplementado con los antibióticos correspondientes (indicados en la Tabla I), incubados durante 16 h a 37°C con una agitación de 225 RPM. Para el caso de utilización de cultivos almacenados en stock de glicerol, se inoculó medio LB líquido (con los antibióticos respectivos), con 50 μ L del stock de glicerol, siendo incubados en las mismas condiciones descritas anteriormente. Los cultivos sólidos fueron realizados utilizando medio LB en placas con 25 mL,

suplementado con los antibióticos necesarios para cada caso y fueron incubadas a 37°C durante 16 h.

2.2.1.2 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

En este seminario, se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101, que posee resistencia a Gentamicina (en el plasmido Ti) y a Rifampicina (en el genoma). *A. tumefaciens* fue cultivada, en medio líquido y sólido. Para el primer caso, se utilizó medio LB líquido suplementado con antibióticos dependiendo del vector portado, además de los antibióticos Rifampicina (10 mg/mL) y Gentamicina (25 mg/L) para la selección de las células de *A. tumefaciens* GV3101 portadoras del plásmido Ti. El cultivo fue incubado durante 16 a 24 h a una temperatura de 28°C y 170 RPM de agitación. Para el caso de cultivos líquidos realizados a partir de stock de glicerol, el medio de cultivo fue inoculado con 50 µL del stock de glicerol.

Los cultivos sólidos fueron realizados en placas con medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes al vector, así como antibióticos de selección de la cepa GV3101. Las placas fueron incubadas durante 36 h - 48 h a 28°C.

Tabla I. Resumen de vectores utilizados y sus resistencias a antibiótico en bacteria. Se detalla para cada vector utilizado, el antibiótico de selección y la concentración de uso para el cultivo sólido o líquido de *E. coli* y *A. tumefaciens*.

Vector	Antibiótico	Concentración de uso
pCR™8/GW/TOPO®	Espectinomicona	100 µg/mL
pGWB2	Kanamicina	100 µg/mL
pGWB2 PG	Kanamicina	100 µg/mL
pEarleyGate 101	Kanamicina	100 µg/mL
mt-gb	Kanamicina	50 µg/mL

2.2.2 Transformación de Bacterias

2.2.2.1 Transformación de *Escherichia coli*

El procedimiento de transformación de células de *E. coli* quimiocompetentes One Shot® TOP10 (Invitrogen™, EE.UU.) y One Shot® ccdB Survival™ 2 T1^R (Invitrogen™, EE.UU.), se realizó siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. De modo resumido: se descongeló un vial de células quimiocompetentes en hielo por cada vector utilizado para transformar. A cada uno de los tubos, se agregó aproximadamente 150 ng de producto de ligación o vector homogeneizando suavemente, luego de lo cual se incubó durante 30 minutos en hielo, seguido de un *shock* térmico, incubando en un baño termoregulado a 42°C, durante 60 segundos. Se dejó en hielo por aproximadamente 1 minuto y se agregó posteriormente 250 µL de medio S.O.C. (Invitrogen, EE.UU.) pre-calentado a 37°C. Cada vial utilizado fue incubado posteriormente a 37°C con agitación (225 RPM) durante 1 h. Se sembró 50 µL y el sedimento de células restantes (centrifugado a 3000 x *g* por 5 minutos) en placas con 25 mL de medio LB (LB Broth, MO BIO Laboratories Inc, EE.UU.), suplementado con el antibiótico correspondiente (Tabla I) y precalentadas a 37°C. Las placas fueron incubadas a 37°C por aproximadamente 16 h.

2.2.2.2 Obtención de Células de *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes

En primer lugar, previo a las transformaciones de *A. tumefaciens*, se sometió un cultivo de células para volverlas quimiocompetentes. Para ello se inoculó en 25 mL de medio LB líquido suplementado con 25 µg/mL gentamicina y 10 µg/mL de rifampicina, 100 µL de stock en glicerol de células de *A. tumefaciens* GV3101, y se incubaron a 28°C y 170 RPM de agitación durante aproximadamente 16 h, tras lo cual se midió en

espectrofotómetro la densidad óptica del cultivo celular a 600 nm (DO_{600}), repitiendo la medición hasta alcanzar una DO_{600} aproximada a 0.5; momento en el que el cultivo fue incubado en hielo durante 10 minutos. El cultivo fue luego centrifugado a $3000 \times g$ durante 20 minutos, a una temperatura de 4°C . Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 500 μL de una solución 20 mM de cloruro de calcio (CaCl_2) estéril, preenfriada a 4°C . Se alicuotó 50 μL de la suspensión celular en tubos de 2 mL, congelándose posteriormente en nitrógeno líquido, y luego almacenadas a -80°C .

2.2.2.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Las células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* GV3101, fueron transformadas siguiendo un protocolo modificado del método de Congelación/Descongelación descrito en la literatura (Wise y cols., 2006), esto es: se descongeló en hielo una alícuota de células de *A. tumefaciens* GV3101 quimiocompetentes almacenadas a -80°C . Se agregó 1 μg de vector, y se homogeneizó suavemente. El tubo fue sumergido en nitrógeno líquido durante 5 minutos. Posteriormente se agregó 1 mL de medio LB líquido a temperatura ambiente, y se dejó incubando a 28°C con agitación (170 RPM) por 4 h. Posteriormente, se sembró 100 μL del cultivo de células en placas con 25 mL de medio LB con rifampicina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gentamicina 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y kanamicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El resto de cultivo fue centrifugado a $3000 \times g$ por 5 minutos, se eliminó parte del sobrenadante y se resuspendió el precipitado en una fracción del mismo, para finalmente sembrarla en placas con medio LB, con los mismo antibióticos. Las placas fueron incubadas por un período de 36 a 48 h a una temperatura de 28°C .

2.2.3 Cultivo de Plantas

2.2.3.1 Cultivo de *Nicotiana tabacum*

Se cultivaron plantas de tabaco (*N. tabacum*) a partir de semilla para realizar experimentos de transformación transitoria en hojas de tabaco. Como sustrato se utilizó una mezcla de turba, vermiculita y perlita, en proporción volumétrica 3:1:1, esterilizado durante 20 minutos a 121°C. En este sustrato, se sembraron semillas de tabaco, y se cultivaron en una cámara para cultivo de plantas con temperatura de 23°C y un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad. El riego utilizado fue agua corriente 2 veces a la semana hasta la aparición del primer par de hojas verdaderas, luego del cual se regó con una solución de 2 g/L de Phostrogen Plant Food (Pbi Home & Garden Limited, Inglaterra). Los tabacos fueron utilizados, cuando presentaban el 4° o 5° par de hojas, entre 2 a 3 meses luego de la siembra.

2.2.3.2 Cultivo de *Solanum lycopersicum*

Se cultivaron plantas de *S. lycopersicum* var. Micro-Tom para la obtención de semillas a utilizar en los procedimientos de transformación estable tomate. Al igual que en la sección 2.2.3.1, se utilizó una mezcla de turba, vermiculita y perlita, en la misma proporción anteriormente descrita. Las semillas de tomate fueron estratificadas previamente a 4°C en agua destilada durante 24 h, y luego fueron sembradas directamente en el sustrato, con las mismas condiciones de temperatura, luz y riego que las plantas de tabaco.

2.2.3.3 Esterilización de semillas y cultivo *in vitro*

Las semillas de tomate de la variedad Micro-Tom, fueron hidratadas en oscuridad a 4°C durante 24 h en agua destilada. Posteriormente, fueron esterilizadas utilizando una solución de cloro comercial (5% hipoclorito de sodio) al 30% y Tween-20 al 0,1%, en agitación (120 RPM) por 20 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagaron las semillas 3 a 4 veces con agua estéril agitando durante 2 a 5 minutos. Luego fueron secadas en papel absorbente estéril y sembradas en placas con medio de germinación (MS 4,43 g/L; sacarosa 25 g/L; MES 0,5 g/L y agar agar 8 g/L, pH 5,7). Las placas se dejaron en oscuridad a una temperatura de 23°C durante 2 semanas hasta la aparición de los cotiledones. Luego fueron dejadas a fotoperíodo 16 hrs luz y temperatura ambiente (22 °C) por dos días, antes de ser transformados.

2.2.4 Transformación de Plantas

2.2.4.1 Transformación transitoria de *Nicotiana tabacum*

La transformación transitoria de hojas de tabaco, fue llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito por Sparkes y cols., 2006. Para ello, se utilizaron cultivos de noche de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformado con los vectores deseados (ver sección 1.1.1, Estrategia de clonación y transformación), los cuales son: el vector pEarleyGate101::Ac-mCS y su control sin inserto pEarleyGate101, fueron crecidas en 25 mL de medio LB suplementado con gentamicina (25 µg/mL), rifampicina (10 µg/mL) y kanamicina (100 µg/mL, antibiótico de selección para el vector) utilizando como condiciones de crecimiento las descritas en la sección 2.2.1.2. Además como control positivo de localización subcelular mitocondrial, se incubó en las mismas condiciones anteriores, células de *A. tumefaciens* GV3101 portadoras del vector mt-gb (Nelson y

cols., 2007). Posterior a la incubación, el cultivo de células fue centrifugado a 1000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente; el sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue resuspendido en un volumen de 5 mL de medio de infiltración (D-glucosa 0,5%, MES 50 mM, Na₃PO₄·12H₂O 2 mM y acetosyringona 100 µM).

Se prepararon 5 mL de cultivo resuspendido en medio de transformación con una densidad óptica medida en espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda igual a 0,1 (DO₆₀₀=0,1) para los cultivos con los plásmidos pEarleyGate101::*Ac-mCS* y su control sin inserto, y una DO₆₀₀=0,03 para el cultivo portador del plásmido mt-gb. Las suspensiones celulares fueron infiltradas de manera independiente, además de una suspensión para co-infiltrar los cultivos de *A. tumefaciens* portadores de pEarleyGate101::*Ac-mCS* y mt-gb, con las densidades ópticas finales indicadas previamente.

Previo a la infiltración, las hojas de tabaco fueron rociadas con agua corriente y posterior a la infiltración, los tabacos fueron llevados a la cámara de cultivo a las condiciones previamente mencionadas. Cada suspensión celular, fue traspasada a una jeringa de 10 mL y posteriormente fue infiltrada en una hoja de tabaco desde la cara adaxial, siguiendo el protocolo descrito por Sparkes y cols., 2006.

2.2.4.2 Transformación estable de *Solanum lycopersicum*

Las células de *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con los vectores pGWB2-AcmCS, fueron incubadas como se describió en la sección 2.2.1.2. Posterior al tiempo de incubación, las células fueron centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos. Se resuspendió las células en medio de transformación (MS 4,43 g/L, sacarosa 30 g/L), se midió la densidad óptica (DO₆₀₀) y se preparó una suspensión de células en 25 mL de

medio de transformación, con una DO_{600} entre 0,05 y 0,08. Posteriormente se agregó 200 μ M de acetosiringona a cada suspensión, y se incubaron a 28°C en agitación (170 RPM) durante 1 h. Paralelamente, se cortaron los cotiledones eliminando la zona apical y basal de cada uno, y fueron reservados en una placa estéril con 25 mL de medio de transformación sin acetosiringona (MS 4,43 g/L y sacarosa 3%). Luego de la incubación, los explantes fueron traspasados a cada suspensión de células, incubándose éstos durante 30 minutos. Los explantes fueron secados en papel absorbente estéril, y luego se transfirieron a placas con medio de co-cultivo (MS 4,43 g/L; sacarosa 30 g/L; trans-zeatina 2 mg/L; agar agar 8 g/L, pH 5,8; estéril), medio en el cual se mantuvieron en incubación durante 48 h en oscuridad a una temperatura de 23°C.

2.2.4.3 Organogénesis de explantes de *Solanum lycopersicum*

2.2.4.3.1 Inducción de callo

Posterior a los 2 días en medio de co-cultivo, los explantes fueron subcultivados a medio de inducción de callo (MS 4,43 g/L; sacarosa 30 g/L; y agar 8 g/L, pH 5,8 ; estéril, suplementado con trans-zeatina 2 mg/L; timentin 300 mg/L; higromicina 5 mg/L.). Luego de dos semanas, los explantes fueron subcultivados a medio de inducción de callo fresco, procedimiento realizado hasta que se observó la presencia de brotes (hojas y tallos).

2.2.4.3.2 Elongación de tallo

Los brotes que mostraban un tamaño de aproximadamente 1 cm de altura, fueron subcultivados a placas con medio de elongación (MS 4,43 g/L; sacarosa 30 g/L

y agar agar 8 g/L, pH 5,8, estéril; suplementado con trans-zeatina 1 mg/L; timentin 300 mg/L; higromicina 5 mg/L). Luego de al menos una semana en placas con medio de elongación, las plántulas de mayor tamaño fueron transferidas a frascos con el mismo medio, subcultivando los explantes a nuevo medio de elongación en frasco, cada 2 semanas.

2.2.4.3.3 Enraizamiento

Las plántulas elongadas, fueron subcultivadas en medio de enraizamiento (MS 2,215 g/L; sacarosa 15 g/L y agar agar 8 g/L, pH 5,8 estéril; suplementado con timentin 300 mg/L e higromicina 5 mg/L).

2.2.4.3.4 Aclimatación a tierra

Las plantas individualizadas con raíces en medio de enraizamiento, se transfirieron posteriormente a una mezcla de sustrato (turba:vermiculita:perlita = 3:1:1). Inicialmente se dejan tapados de modo de retener la humedad, y luego se realiza un agujero en la tapa de modo de permitir la aclimatación a una menor humedad relativa. A la semana siguiente se vuelve a realizar este procedimiento para aumentar la salida de humedad y a la tercera o cuarta semana, se elimina completamente la cubierta. Se regó a saturación 2 veces por semana con una solución acuosa de Phostrogen® a una concentración de 2 g/L.

2.3 Biología Molecular

2.3.1 Partidores

Se diseñaron partidores para poder amplificar por PCR los fragmentos de interés y posteriormente clonarlos en los vectores de entrada. La secuencia codificante de Ac-mCS, obtenida de trabajos previos en el laboratorio (González-Agüero y cols., 2016), fue utilizada para diseñar partidores en 5' y 3' (Ac-mCS.F y Ac-mCS.R, respectivamente) de la secuencia codificante de ADN obtenida a partir de ADNc de chirimoya. Además, se diseñó un segundo partidor en 3' (Ac-mCS.Rns), el cual carece del codón de término de la traducción, el cual fue utilizado para amplificar la secuencia a clonar en el vector pEarleyGate101, utilizado para localizar subcelularmente el producto proteico de dicha secuencia. Finalmente, se diseñó un par de partidores (HindIIIpromPG-F y XbaIpromPG-R) para amplificar mediante PCR, un fragmento del promotor de poligalacturonasa de tomate, los que permitieron amplificar una secuencia de ADN flanqueada por los sitios de restricción HindIII y XbaI en los extremos 5' y 3' respectivamente, fragmento utilizado luego para modificar el vector pGWB2.

Tabla II. Resumen de partidores utilizados. Se muestran los partidores utilizados para las reacciones de PCR realizadas. En rojo se encuentran marcadas las secuencias de restricción y marcadas en verde el codón de inicio de la traducción. En la columna *descripción*, se indican en casos relevantes observaciones respecto a la secuencia. En la columna *tamaño*, se indica el tamaño de cada partidor en pares de bases (pb).

Partidor	Secuencia	Descripción	Tamaño
Ac-mCS.F	5' - ATG TCT TTC TTC CGA AGC ATT TC-3'	En verde, codón de inicio de la traducción para el CDS de <i>Ac-mCS</i> , usado en conjunto con Ac-mCS.R y Ac-mCS.Rns	23 pb
Ac-mCS.R	5' - TCA AGC CGC TGC CTT CCT AC - 3'		20 pb
Ac-mCS.Rns	5' - AGC CGC TGC CTT CCT ACA GTA - 3'	Permite amplificar el fragmento sin el codón de término de la transcripción	21 pb
HindIIIpromPG.F	5' - ACA AAG CTT -TAT AAC AAT TCT AAA TTT AAA CTA -3'	En rojo, secuencia que agrega sitio de restricción para enzima HindIII en el fragmento del promotor de poligalacturonasa	33 pb
XbalpromPG.R	5' - ACA TC TAG AAA - GAT ATA TTG TTA TAT GGT ATG -3'	En rojo, secuencia que agrega sitio de restricción para enzima XbaI en el fragmento del promotor de poligalacturonasa	32 pb
HPT.Chaudhry.F	5' - GCT CCA TAC AAG CCA ACC AC - 3'	Partidor obtenido de Chaudhry y Rashid, 2010	20 pb
HPT.Chaudhry.R	5' - CGA AAA GTT CGA CAG CGT CTC - 3'	Partidor obtenido de Chaudhry y Rashid, 2010	21 pb
LAT52.F	5' - AGA CCA CGA GAA CGA TAT TTG C - 3'	Partidor obtenido de Yang y cols., 2008	22 pb
LAT52.R	5' TTC TTG CCT TTT CAT ATC CAG ACA - 3'	Partidor obtenido de Yang y cols., 2008	24 pb

2.3.2 Reacciones de PCR

Para amplificar las secuencias de ADN que fueron clonadas en este trabajo, se utilizaron 3 programas de PCR que se encuentran expuestos en la Tabla III. La primera secuencia *Ac-mCS*, fue amplificada utilizando la enzima Biolase™ DNA polymerase (Bioline, Alemania). Para cada reacción se utilizó: 1X NH₄ Reaction Buffer, MgCl₂ 5 mM, dNTPs 0.2 mM de cada uno, 0.4 μM de cada partidor, 50 ng de ADNc de chirimoya de diferentes tejidos (hoja, flor y fruto maduro) y 1.25 U de Biolase™ DNA polymerase, adicionando agua Ultrapure para llevar al volumen final de reacción de 25 μL. A partir de esta reacción se determinó el tejido del cual fue amplificada y clonada la

secuencia de Ac-mCS, procediendo posteriormente a repetir la reacción con la enzima Platinum™ *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen™, EE.UU.) utilizando como templado, el ADNc del tejido escogido, donde cada reacción consistió en: 1X *Pfx* Amplification Buffer, dNTPs 0.3 mM cada uno; MgSO₄ 1 mM, partidores 0.3 μM cada uno; 50 ng de ADNc de fruto maduro de chirimoya y 0.5 U de Platinum® *Pfx* DNA Polymerase, llevando a un volumen final de reacción de 25 μL con agua Ultrapure.

La segunda reacción fue utilizada para amplificar la secuencia Ac-mCS, sin el codón de término de la traducción. La reacción consistió en la mezcla de 1X *Pfx* Amplification Buffer, dNTPs 0,3 mM de cada uno, MgSO₄ 1 mM, partidores 0.3 μM cada uno; 2 ng de ADN (vector pCR8-Ac-mCS), y 0,5 U de Platinum® *Pfx* DNA Polymerase, y agua Ultrapure para llevar a un volumen final de reacción igual a 25 μL.

La tercera reacción fue utilizada para amplificar el fragmento del promotor de poligalacturonasa de tomate (promPG), utilizando la enzima Biolase™ DNA polymerase (Bioline, Alemania). En este caso, se utilizó para cada reacción: 1X NH₄ Reaction Buffer, MgCl₂ 5 mM, dNTPs 0,2 mM de cada uno, 0,4 μM de cada partidior, 50 ng de ADNg de *S. lycopersicum* var. Micro-Tom y 1.25 U de Biolase™ DNA polymerase, adicionando agua Ultrapure para llevar al volumen final de reacción de 25 μL.

Las condiciones de temperatura utilizadas para cada reacción, así como el nombre de los partidores utilizados, y las enzimas correspondientes se resumen en la Tabla III. En términos generales, para cada reacción se utilizó un ciclo de denaturación inicial, seguido de 35 ciclos de tres pasos (denaturación, alineamiento y extensión), seguido de un ciclo de extensión final, y un último paso de mantención igual para todas las reacciones realizadas.

Tabla III. Resumen de Programas de PCR. En la tabla se resumen los programas de PCR utilizados para amplificar las secuencias de ADN Ac-mCS, Ac-mCS Rns y promPG (títulos de columna), utilizadas para su clonación en los vectores de entrada. Se indica bajo cada columna la enzima utilizada. Además, para cada reacción, se indican la temperatura y tiempo de cada paso, los partidores usados y el tamaño del amplicón esperado.

	Ciclos	Ac-mCS (Biolase)		Ac-mCS (Pfx)		Ac-mCS Rns (Pfx)		promPG (Biolase)	
		T°C	t (m:s)	T°C	t (m:s)	T°C	t (m:s)	T°C	t (m:s)
Denaturación Inicial	x1	94	1:00	94	4:00	94	4:00	94	1:00
Denaturación		94	0:30	94	0:15	94	0:15	94	0:30
Alineamiento	x35	62	0:30	60	0:30	60	0:30	58	0:30
Extensión		72	1:00	68	1:40	68	1:40	72	1:00
Extensión Final	x1	72	10:00	68	10:00	68	10:00	72	10:00
Hold	x1	4	-	4	-	4	-	4	-
Partidores		Ac-mCS.F Ac-mCS.R		Ac-mCS.F Ac-mCS.R		Ac-mCS.F Ac-mCS.Rns		HindIIIpromPG.F HindIIIpromPG.R	
Tamaño amplicón		1422 pb		1422 pb		1419 pb		1231 pb	

2.3.3 Electroforesis en gel de agarosa

Las reacciones de PCR al igual que los ensayos de restricción enzimática, fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, los geles de agarosa fueron preparados con solución buffer TAE 1X (Tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1mM, pH 8,0), 1% de agarosa y bromuro de etidio 10 µg/mL para el uso convencional, y con un 0,8% de agarosa para la purificación de ADN desde el gel de agarosa (ver 2.3.4). Las muestras fueron preparadas mezclándolas con 0,2 volúmenes de buffer de carga 6X Orange DNA Loading Dye (Thermo Fischer Scientific Inc, EE.UU.), a excepción de aquellas reacciones de PCR en las cuales se utilizó la solución 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega Corporation, EE.UU.), caso en que las muestras fueron directamente cargadas (reacciones de PCR de colonia y de análisis de plantas transgénicas). El gel de agarosa fue ubicado en una cámara de electroforesis (Sub-Cell® GT, Bio-Rad Laboratories Inc., EE.UU.) con buffer TAE 1X, conectada a una fuente de poder (PowePac™ Basic, Bio-Rad Laboratories Inc., EE.UU.) utilizando un potencial eléctrico de 100 V a 120 V por un tiempo de 50 minutos. Posterior al tiempo de corrida, los geles fueron revelados usando un

transiluminador Universal Hood II (Bio-rad Laboratories Inc., Italia), y la captura de imágenes fue realizada utilizando la unidad AlphaDigiDoc® Pro Unit (Alpha Innotech Corp., EE.UU.). Como marcador de peso molecular, se utilizó marcador O'GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder, ready to use (Thermo Fischer Scientific Inc, EE.UU.) y/o el marcador GeneRuler™ 1 kb (Fermentas Life Sciences, EE.UU.), con rangos de tamaño entre 100 y 3000 pb y entre 250 y 10000 pb, respectivamente, usando las cantidades indicadas por el fabricante.

2.3.4 Purificación de ADN desde gel de agarosa

Las purificaciones de ADN desde gel de agarosa fueron realizada utilizando el kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Para ello, el volumen total de la reacción de PCR realizada, fue cargado en un gel de agarosa al 0,8% y los productos separados mediante electroforesis en gel de agarosa durante 50 minutos con un voltaje entre 100 y 120 V. La porción de gel que contenía la banda de tamaño esperado fue aislada del gel y fue purificada siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se eluyó de la columna de purificación utilizando un volumen de 15 μ L de Agua UltraPure (UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen®, EE.UU.).

2.3.5 Cuantificación de ácidos nucleicos

Cada muestra de ADN fue cuantificada mediante espectrofotometría, utilizando el equipo Picodrop™ P100 (Picodrop Limited, Reino Unido) particularmente midiendo la absorbancia a una longitud de onda (λ) igual a 260 nm. Además, se obtuvo los valores de los índices 260/280 y 260/230 entregados de modo de tener un indicador de

la calidad de las muestras de ácido nucleico, considerando un ADN puro, cuando la razón 260/280 tiene un valor aproximado a 1,8 y la razón 260/230, un valor entre 2,0 y 2,2 (Thermo Fisher Scientific Inc, 2011).

2.3.6 Generación de vectores de entrada

Las 3 secuencias de ADN de interés (*Ac-mCS*, *Ac-mCS Rns*, y *promPG*), fueron clonadas en el vector de entrada pCR™8/GW/TOPO®. Para ello, cada fragmento fue amplificado mediante PCR y purificado como fue descrito anteriormente, y luego se agregó un nucleótido dATP en el extremo 3' (*A 3' tailing*) para hacerlo compatible con el vector de entrada, mezclando 1X GoTaq® Reaction Buffer, dATP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, ~100 ng fragmento de ADN purificado y GoTaq Flexi 5U. La reacción fue incubada a 70°C durante 30 minutos y luego fue almacenada a -20°C hasta su clonación en el vector de entrada. La clonación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies Corporation, EE.UU.), es decir, mezclando ~40 ng de fragmento de PCR tratado (purificado y con la adición de nucleótidos adeninas libres en extremo 3'), con 1 µL de Salt Solution (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂), adicionando agua Ultrapure hasta un volumen de 5 µL, y 10 ng de vector pCR™8/GW/TOPO®, TOPO®-treated, incubando la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora, y posteriormente almacenando a -20°C hasta su utilización para la transformación de células de *E. coli* quimiocompetentes (sección 2.2.2.1).

2.3.7 Generación del vector de destinación pGWB2::PG

Para generar el vector pGWB2::PG, se utilizaron los vectores pGWB2 y el vector pCR8::promPG. La secuencia clonada en este último vector, presenta sitios de restricción para las enzimas HindIII y XbaI que flanquean la fragmento del promotor en 5' y 3', las cuales también se encuentran flanqueando el promotor CaMV 35S en el vector pGWB2. Es así como se realizó la doble digestión de los vectores pGWB2 y pCR8::promPG. La reacción fue llevada a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, esto es, por cada reacción se mezcló 20 U de HindIII (Thermo Scientific, EE.UU.), 10 U de XbaI (Thermo Scientific, EE.UU.), Buffer Tango 1X (Thermo Scientific, EE.UU.), 1 µg de ADN, diluido con agua Ultrapure (UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen®, EE.UU.) hasta un volumen final de reacción de 20 µL. Cada reacción fue incubada 2 h a 37°C. Luego, utilizando el kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), se purificó el fragmento de ADN siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, el cual fue resuspendido en 20 µL de agua Ultrapure (UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen®, EE.UU.). Posteriormente, se realizó la reacción de ligación de los productos purificados utilizando la enzima T4 DNA Ligase (Promega Corporation, EE.UU.). Para ello, se mezcló 150 ng del producto purificado de la doble digestión de pGWB2 y 200 ng de pCR8::promPG, 1X Ligase Buffer, y 3 U (Weiss) de T4 DNA Ligase en un volumen de reacción de 10 µL, incubando la reacción 3 h a temperatura ambiente y luego 16 h a 4°C. Posteriormente se transformó células de *E. coli* quimiocompetentes One Shot® ccdB Survival™ 2 T1^R (Invitrogen™, EE.UU.), (sección 2.2.2.1), utilizando la totalidad de la reacción de ligación.

2.3.8 Generación de vectores de expresión

Todos los vectores de destinación ocupados son compatibles con el sistema Gateway, debido a lo cual, para la generación de los vectores de expresión, se utilizó la reacción de recombinación con el mix Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogen™, EE.UU.). El protocolo fue realizado según las indicaciones del fabricante, es decir, para la reacción se mezcló 50 ng de vector de entrada, 150 ng de vector de destinación, Buffer 1X, llevando a un volumen final de reacción de 8 µL con Buffer TE, pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA); posteriormente, se adicionó 2 µL de la mezcla de enzimas LR Clonase™ enzyme mix, seguido de una incubación a 25°C de 90 minutos. Posteriormente se transformó *E. coli* quimicompetentes One Shot™ TOP10 (Invitrogen™, EE.UU.) (sección 2.2.2.1). En la Figura 5 se muestra un esquema de los vectores de expresión generados.

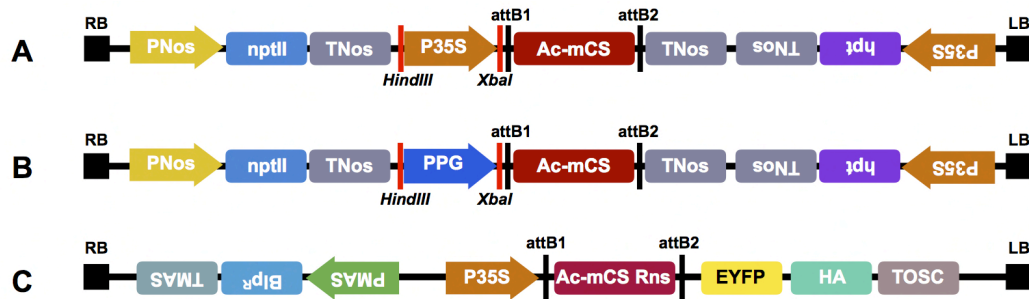


Figura 5. Vectores de expresión utilizados para transformación estable y transitoria. **A** y **B**, Región comprendida entre los bordes izquierdo y derecho (LB y RB, respectivamente) de los vectores de expresión generados y utilizados para la transformación estable de *S. lycopersicum* y **C**, transitoria de *N. tabacum*. **A**, vector pGWB2::Ac-mCS, observándose la posición del inserto Ac-mCS bajo la regulación del promotor CaMV 35S. **B**, vector pGWB2::PG::Ac-mCS, con el inserto Ac-mCS bajo la regulación del fragmento del promotor de poligalacturonasa utilizado. **C**, vector pEarleyGate101::Ac-mCS, con el inserto Ac-mCS Rns y la secuencia codificante para la proteína EYFP, bajo la regulación del promotor CaMV 35S. PNos, nptII: secuencia codificante para neomicina fosfotransferasa II, TNos: terminador de nopalina sintasa, P35S: Promotor de , HindIII: sitio de restricción para la enzima HindIII, XbaI: sitio de restricción para la enzima XbaI, Ac-mCS, attB1 y attB2: sitios para la reacción de recombinación BP Gateway®, hpt: secuencia codificante para higromicina fosfotransferasa, TMAS: terminador de mannopina sintasa, B1p^R, Ac-mCS Rns: secuencia codificante completa de Ac-mCS sin codón de término de la traducción, EYFP: proteína fluorescente amarilla (del inglés *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), HA: tag epitopo de hemaglutinina de influenza humana, TOSC: terminador de octopina sintasa, LB y RB: borde izquierdo y derecho de T-ADN C58, PPG: fragmento del promotor de poligalacturonasa de *S. lycopersicum*.

2.4 Análisis

2.4.1 Análisis *in silico* de localización subcelular

Se realizó el análisis *in silico* de la localización subcelular de la secuencia disponible de *Ac-mCS* (KU524485.1). El análisis se inició utilizando la herramienta BLASTn de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Se utilizó luego 3 herramientas disponibles en el portal de recursos ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB). Se utilizó la secuencia codificante completa (CDS) para realizar el análisis utilizando las herramienta TargetP 1.1 (Emanuelsson y cols., 2000) para determinar si la secuencia de *Ac-mCS* posee una secuencia de destinación, y luego las herramientas MitoFates (Fukasawa y cols., 2015) y MitoProt II v1.101 (Claros y Vincens, 1996) para corroborar la predicción del primer software utilizado. Todas las búsquedas se realizaron utilizando la configuración por defecto de cada una de las herramientas, seleccionando el organismo (planta) en las dos primeras herramientas.

2.4.2 Análisis de Bacterias

2.4.2.1 Reacciones de PCR de colonia

Para comprobar la presencia de los vectores con el inserto adecuado en cada uno de los clones bacterianos se realizaron reacciones de PCR convencional. En cada caso, se utilizó los partidores específicos de la secuencia de ADN de interés. Se realizaron PCR de colonias para amplificar *Ac-mCS*, *Ac-mCS* Rns, y promPG, esto tanto en clones transformados con los vectores de entrada como con los vectores de expresión. Para cada colonia a analizar, se resuspendió una porción de la colonia en 10 μ L de agua destilada Ultrapure. Se incubó 5 minutos a 95°C y luego se centrifugó 5

minutos a 3000 x *g*. Como templado para cada reacción, se utilizaron 4 µL del sobrenadante. Las reacciones utilizadas para cada caso consistieron en la misma reacción (Buffer 10X, dNTPs, ADN polimerasa), cambiando el templado (colonia o templado control), los partidores y el perfil térmico de la reacción (temperatura de alineamiento y tiempo de extensión). Cada reacción consistió en: 1X GoTaq Reaction Buffer, dNTPs 0.25 mM de cada uno, 3 mM MgCl₂, 3 µM partidor (cada uno), 4 µL de la preparación previamente descrita y 2 U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega Corporation, EE.UU.) adicionando agua destilada Ultrapure hasta un volumen final de 20 µL. El perfil térmico, los partidores utilizados y los tamaños de amplicón para cada reacción, se resume en la Tabla IV.

Tabla IV. Reacciones de PCR de colonia. Resumen de los programas de termociclado de las reacciones de PCR de colonia para amplificar Ac-mCS, Ac-mCS Rns y promPG (títulos de columna). Se indica igualmente la enzima utilizada para cada caso, así como la temperatura y tiempo de cada paso del programa de PCR. Finalmente, se indican los partidores utilizados y el tamaño del amplicón esperado.

	Ciclos	Ac-mCS (GoTaq G2)		Ac-mCS Rns (GoTaq G2)		promPG (GoTaq G2)	
		T°C	t (m:s)	T°C	t (m:s)	T°C	t (m:s)
Denaturación Inicial	x1	94	2:00	94	2:00	94	2:00
Denaturación		94	0:30	94	0:30	94	0:30
Alineamiento	x35	62	0:30	60	0:30	53	0:30
Extensión		72	1:30	72	1:30	72	1:30
Extensión Final	x1	72	5:00	72	5:00	72	5:00
Hold	x1	4	-	4	-	4	-
Partidores		Ac-mCS.F Ac-mCS.R		Ac-mCS.F Ac-mCS.Rns		HindIIIpromPG.F HindIIIpromPG.R	
Tamaño amplicón		1422 pb		1419 pb		1231 pb	

2.4.2.2 Minipreparaciones de ADN plasmidial

Para las minipreparaciones de ADN plasmidial de los clones seleccionados, se inocularon en medio LB suplementado con el/los antibiótico/s de selección respectivo/s (Tabla I), como fue descrito previamente (sección 2.2.1.1). Posterior a la incubación, 1

mL del cultivo se almacenó como stock con 40% glicerol, a -80°C. El resto del cultivo fue utilizado para la minipreparación de ADN plasmidial, que fue realizada utilizando el kit E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-tek Inc., EE.UU.), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La elución del ADN plasmidial de la columna se realizó utilizando 50 µL de agua Ultrapure (UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen, EE.UU.).

2.4.2.3 Restricción enzimática

Los ensayos de restricción enzimática fueron llevados a cabo posterior análisis de restricción *in silico* utilizando el software SnapGene versión 3.0 (GSL Biotech, EE.UU.). Cada reacción de restricción enzimática se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, mezclando 1X Restriction Enzyme Buffer (Promega Corporation, EE.UU.), 2 µg Acetylated BSA (Promega Corporation, EE.UU.), 500 ng de ADN plasmidial, y 10 U de cada enzima de restricción utilizada (Promega Corporation, EE.UU.), llevando a un volumen final de reacción de 20 µL con agua ultrapure (UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen®, EE.UU.). Cada reacción fue incubada 1 h a 37°C. El producto de la reacción fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 2.3.3). La Tabla V resume los ensayos de restricción realizados para cada plásmido, detallándose igualmente para cada uno el buffer de restricción utilizado (Restriction Enzyme 10X Buffer, Promega Corporation, EE.UU.).

Tabla V. Ensayos de Restricción de Minipreparaciones de ADN plasmidial. Resumen de los ensayos de restricción de los diferentes vectores. Para cada vector sometido a ensayo de restricción, se muestra la enzima o combinación de enzimas utilizadas, con el respectivo *Buffer* de reacción de cada enzima (se indica entre paréntesis la marca de las enzimas y respectiva solución tampón).

Vector	Enzima de restricción	Buffer
pCR8::Ac-mCS	EcoRV – SacI	MultiCore (Promega)
	EcoRV – BamHI	MultiCore (Promega)
pCR8::Ac-mCS Rns	EcoRV – BamHI	MultiCore (Promega)
pCR8::promPG	HindIII	Tango *(Invitrogen)
	XbaI	
	HindIII – XbaI	
pGWB2::PG	EcoRV	D (Promega)
	BamHI – HindIII	E (Promega)
	EcoRV – NotI	D (Promega)
	EcoRV – SacI	MultiCore (Promega)
pGWB2::PG::Ac-mCS	BamHI – HindIII	E (Promega)
pEarleyGate101::Ac-mCS Rns	SacI	E (Promega)

2.4.2.4 Secuenciación

Para corroborar la integridad de las secuencias clonadas en los vectores de entrada, las muestras fueron secuenciadas usando el servicio de secuenciación de Macrogen (Macrogen Inc, Korea). Cada muestra se envió con una concentración ~100 ng/ μ L y un volumen de 30 μ L. Además, para cada secuenciación se enviaron los mismos partidores utilizados para amplificar las secuencias mediante PCR, a una concentración de 10 μ M, un volumen de 30 μ L de cada uno. Los resultados fueron analizados utilizando el software SnapGene versión 3.0 (GSL Biotech, EE.UU.).

2.4.3 Análisis de Plantas

2.4.3.1 Visualización en microscopio confocal

Las hojas de tabaco infiltradas (sección 2.2.4.1) fueron observadas con el microscopio LSM 510 META (Zeiss, Alemania), luego de 48 h desde el momento de infiltración. Las muestras, preparaciones frescas de 1 cm^2 de hojas de tabaco

montadas en agua destilada, fueron observadas con 2 configuraciones, utilizando para EGFP excitando con láser a 488 nm y filtro BP 505 – 530, para visualizar la expresión de la proteína fluorescente del control positivo de localización mitocondrial y para EYFP excitado a 514 nm y filtro BP 530 – 600, para la visualización de la proteína de fusión Ac-mCS – EYFP. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software LSM Image Browser versión 4.2.0.121 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania).

2.4.3.2 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de hojas de tomate, fue realizada siguiendo el protocolo de Allen y cols., 2006, con algunas modificaciones. Para realizar la extracción se preparó la solución de extracción que contenía para 1 L: 100 mL de solución stock Tris - HCl pH 8,0, 180 mL de solución stock de NaCl 5M, 40 mL de solución EDTA 0,5 M pH 8,0 (ajustado con NaOH), 20 g de CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) y 1% de 2-mercaptoetanol (agregado al momento de usar). Paralelamente, se preparó solución 3 M de acetato de amonio y Solución Buffer TE, la cual contiene para 1 L: 10 mL de solución stock Tris – HCl 1M pH 8,0 y 2 mL solución stock EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,5 M pH 8.0 (pH ajustado con NaOH), llevando a volumen final con agua destilada. Las muestras utilizadas para realizar extracción de ADN genómico, fueron congeladas en nitrógeno líquido, pulverizadas utilizando un mortero y pistilo y luego transferidas a tubos de 2 mL y almacenadas a -80°C hasta su uso. Se calentó la solución de extracción en un baño de agua termoregulado a 65°C. Se agregó 1,2 mL de solución de extracción a cada muestra pulverizada congelada y rápidamente se mezcló utilizando un mezclador tipo vórtex. Se incubaron las muestras a 65°C en baño termoregulado durante 30 minutos, mezclando con el agitador tipo vórtex cada 5 a 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 13500 x g durante

10 minutos a 4°C. En un tubo de 2 mL se agregó 800 µL de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1 v/v. El sobrenadante recuperado de la centrifugación, fue transferido a los tubos con la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, homogeneizando con el agitador tipo vórtex por 20 minutos, en frío (hielo de agua). Las muestras fueron centrifugadas a 13500 x *g* durante 10 minutos a 4°C. La fase acuosa (fase superior) fue transferida a nuevos tubos de 2 mL con 800 µL de 2-propanol preenfriado a -80°C. El contenido de cada tubo fue mezclado e incubado a -20°C por aproximadamente 30 minutos. Luego, los tubos fueron centrifugados a 13500 x *g* durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue resuspendido en 250 µL de solución Buffer TE, pH 8 a temperatura ambiente. A cada tubo con el sedimento resuspendido se agregó 25 µL de solución de acetato de amonio 3M, y se mezcló utilizando el mezclador tipo vórtex. Se agregó a cada tubo 600 µL de etanol 100% frío (-20°C), mezclando e incubando durante 30 minutos a -20°C. Se centrifugó los tubos a 13500 x *g* por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado, y se agregó 500 µL de etanol 70% preenfriado a -20°C. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 13500 x *g* por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y la muestra se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 45 minutos. Finalmente, cada muestra fue resuspendida en 25 µL de agua Ultrapure, fue cuantificada por espectrofotometría y almacenada a -20°C.

2.4.3.3 Reacción de PCR

Dos programas de PCR fueron utilizados para determinar la presencia de secuencias transgénicas en el ADN genómico de tomate extraído anteriormente. El primer programa, fue utilizado para amplificar un fragmento del gen Higromicina

Fosfotransferasa (*HPT*), que se encuentra presente en los vectores de expresión utilizados, y que confiere resistencia a higromicina.

La segunda reacción realizada, fue utilizada para amplificar un fragmento del gen *LAT52* de tomate, reacción llevada a cabo solo como control para corroborar la integridad del ADN de tomate extraído (utilizado como templado).

En cada reacción se utilizó: 1X GoTaq Reaction Buffer, dNTPs 0.25 mM de cada uno, 3 mM MgCl₂, 3 μM partidor (cada uno), 50 ng de ADN templado y 2 U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega Corporation, EE.UU.).

Los programas de ciclado térmico están resumidos en la Tabla VI, así como los partidores utilizados y los tamaños esperados de los amplicones.

Tabla VI. Reacciones de PCR usando ADNg de tomate. Resumen de las reacciones de PCR realizadas para el análisis de presencia de transgén en plantas de tomate. En cada columna se detalla la temperatura y tiempo de cada paso del programa, así como el número de ciclos para cada uno. Se indica finalmente el nombre del partidores utilizados y el tamaño del amplicon esperado.

	Ciclos	<i>HPT</i> (GoTaq G2)		<i>LAT52</i> (GoTaq G2)	
		T°C	t (m:s)	T°C	t (m:s)
Denaturación Inicial	x1	94	1:00	94	1:00
Denaturación		94	0:30	94	0:30
Alineamiento	x35	60	0:30	60	0:30
Extensión		72	0:45	72	0:10
Extensión Final	x1	72	5:00	72	5:00
Hold	x1	4	-	4	-
Partidores		HPT.Chaudhry.F HPT.Chaudhry.R		LAT52.F LAT52.R	
Tamaño amplicón		683 pb		92 pb	

3 RESULTADOS

3.1 Determinación de la localización subcelular de *Ac-mCS*

3.1.1 Determinación *in silico* de la localización subcelular de *Ac-mCS*

El resultado obtenido de la primera herramienta utilizada (TargetP 1.1), mostró la presencia de una secuencia de destinación en la secuencia aminoacídica de la enzima (Figura 6A), mostrando que el puntaje más alto corresponde al de destinación a mitocondria. Además, de acuerdo a los resultados entregados en el software, existe una confiabilidad relativamente alta, mostrando un valor de RC (*Reliability Class*) igual a 2, en una escala de 1 a 5, donde un menor valor, indica una mayor confianza del resultado. Por su parte, el recurso MitoFates identifica una secuencia previa mitocondrial, indicando además que la probabilidad de que se encuentre esta secuencia es igual a 0,979 (resultado no mostrado), además de la existencia de un sitio de corte para una peptidasa mitocondrial (MPP). La última herramienta utilizada, corresponde a Mitoprot II v1.101, software en el cual se indica luego del análisis de la secuencia, que existe una secuencia de destinación y que la probabilidad que sea una secuencia de exportación a mitocondria es igual a 0,9536 (Figura 6B).

3.1.2 Determinación de la localización subcelular de *Ac-mcCS* en hojas de *Nicotiana tabacum*

Para poder realizar los ensayos apropiados para la determinación de la localización subcelular del producto proteico de *Ac-mCS* Rns en la planta modelo *N. tabacum*, se clonó el fragmento *Ac-mCS* en el vector de entrada pCRTM8/GW/TOPO®. Para ello, se amplificó el gen *Ac-mCS* desde

A

CENTERFO
R BIOLOGI
CAL SEQU
ENCEANA
LYSIS CBS

TargetP 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

```
### targetp v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions included.
Using PLANT networks.
```

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
AcmeCS	473	0.211	0.812	0.019	0.018	M	2	25
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

B

MitoProt II - v1.101

Input sequence length : 473 aa

VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

Net charge of query sequence : +0
Analysed region : 37
Number of basic residues in targeting sequence : 5
Number of acidic residues in targeting sequence : 1
Cleavage site : 16
Cleaved sequence : MSFFRSISALSRLRS

HYDROPHOBIC SCALE USED

	GES	KD	GVH1	ECS
H17	1.159	1.347	0.185	0.552
MesoH	-0.190	0.395	-0.346	0.287
MuHd_075	36.387	25.942	10.797	7.129
MuHd_095	38.365	21.976	9.414	8.209
MuHd_100	40.777	25.461	10.023	9.750
MuHd_105	33.602	24.517	8.605	9.350
Hmax_075	12.833	14.000	2.329	4.153
Hmax_095	9.450	11.800	0.328	3.071
Hmax_100	7.100	12.800	0.301	3.720
Hmax_105	17.033	18.550	3.257	6.113

PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.9536

Figura 6. Resultados de predicción de la localización subcelular de Ac-mCS. Resultados entregados por los programas **A.** TargetP y **B.** MitoProt II. En ambos casos se muestran los resultados entregados para cada uno de los programas. En ambos casos, se muestra la predicción de una secuencia de destinación mitocondrial.

una minipreparación de ADN plasmidial del vector pCR8::Ac-mCS (sección 2.3.6 y 2.4.2.2) utilizando la enzima *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen™, EE.UU.). El fragmento de 1419 pb (Figura 7A) se purificó desde gel de agarosa y posteriormente fue ligado al vector mediante la reacción de topoisomerización.

El producto de la topoisomerización fue posteriormente utilizado para realizar la transformación *E. coli* quimicompetentes One Shot™ TOP10 (Invitrogen™, EE.UU.), y las colonias obtenidas de dicha transformación fueron analizadas mediante PCR de colonia (sección 2.4.2.1) (Figura 7B). Como puede observarse, los clones 2, 3, 5, 7 y 8, muestran un amplicón similar al del control positivo, y debido a esto se realizó la restricción de sus plásmidos utilizando las enzimas BamHI y EcoRV (digestión doble), para determinar la dirección en la cual fue clonado el amplicón en el vector pCR™8/GW/TOPO®. Al realizar el diseño del ensayo se determinó que para la clonación del fragmento en sentido, la restricción enzimática debe generar 2 fragmentos de restricción de 3278 pb y 958 pb, y del mismo modo, la restricción enzimática del vector con la secuencia en antisentido generaría como producto 2 fragmentos de 3519 pb y 717 pb. Es así como el clon 2 muestra los fragmentos esperados para el caso en que la clonación del fragmento fuera en antisentido (Figura 7C). Por otro lado, los clones 3, 5, 7 y 8, muestran bandas con tamaños compatibles con los esperados para la clonación del fragmento en sentido (Figura 7C). Como consecuencia, el clon 3 fue escogido arbitrariamente para realizar la recombinación homóloga entre los vectores pCR8::Ac-mCS Rns y el vector de destinación pEarleyGate101 (sección 2.3.8), y posteriormente para transformar células de *E. coli* quimicompetentes One Shot™ TOP10 (Invitrogen™, EE.UU.) (sección 2.2.2.1).

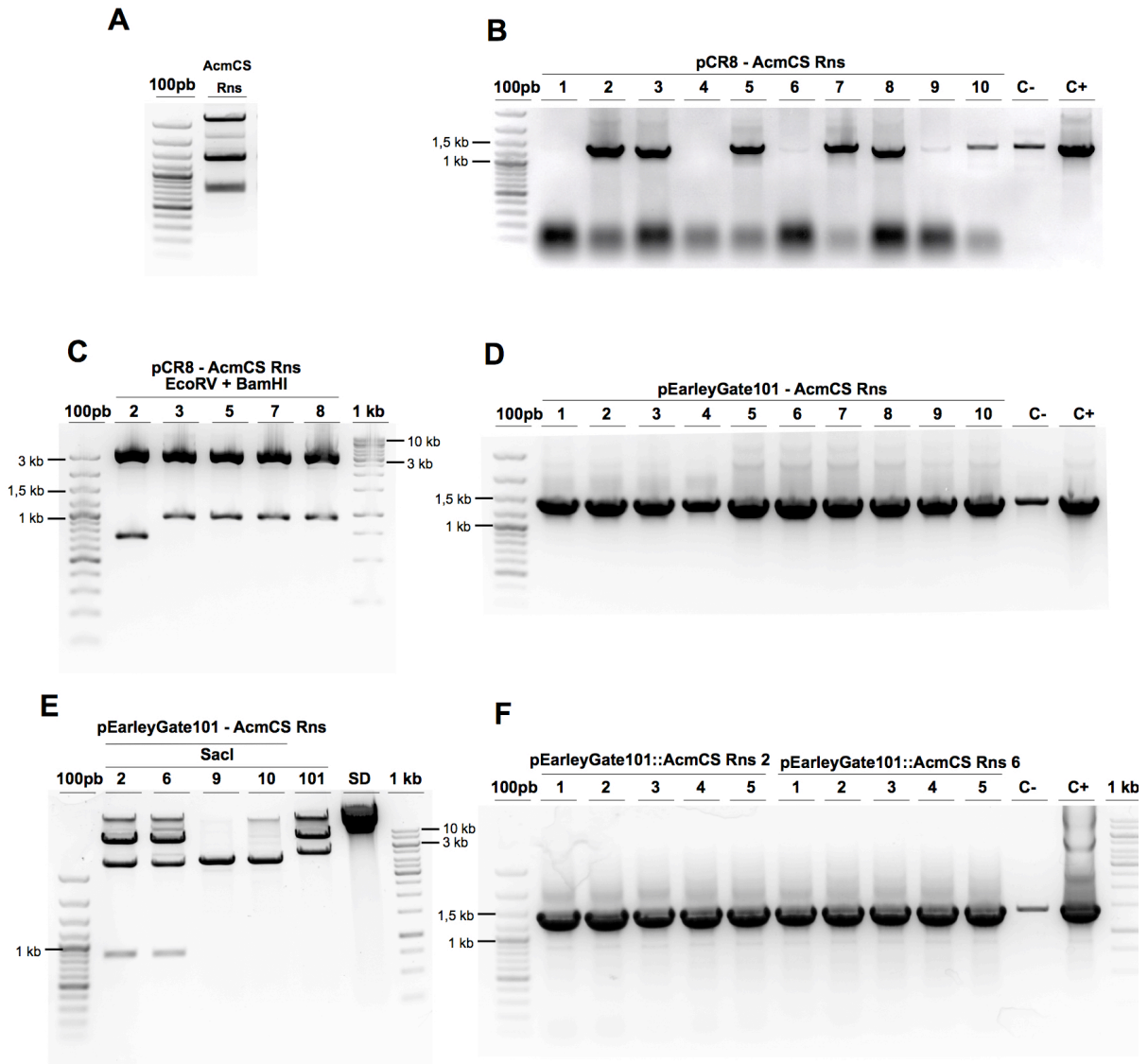


Figura 7. Clonación del fragmento *Ac-mCS* Rns. Se muestra en la figura, en el panel **A**, el producto de PCR *Ac-mCS* Rns amplificado con la enzima *Pfx*, con un tamaño esperado de 1419 pb, clonado en el vector de entrada pCR™8/GW/TOPO®. **B**, análisis de PCR de las colonias transformadas con el producto de topoisomerización pCR8::*Ac-mCS* Rns. (-) corresponde al control negativo de amplificación, usando agua ultrapura en lugar de ADN como templado y el control positivo (+), corresponde a 1 ng de la minipreparación de ADN plasmidial del vector pCR8::*Ac-mCS*. **C**, Ensayo de restricción realizado con las enzimas *EcoRV* y *BamHI* para los clones seleccionados del panel **B**, mostrando todos los clones (a excepción del 2) el patrón de restricción esperado para la clonación con el amplicón en sentido. **D**, PCR de colonias transformadas con el vector pEarleyGate101::*Ac-mCS*. (-) control negativo usando agua como templado y (+) control positivo, usando 1 ng del vector pCR8-*Ac-mCS* como templado. **E**, ensayo de restricción con la enzima *SacI*, realizado a 4 clones seleccionados (2, 6, 9 y 10), al vector pEarleyGate101 vacío (101) y al vector vacío sin digerir (SD). El panel **F**, muestra el resultado del PCR de colonias de las colonias de *A. tumefaciens* GV3101, transformadas con 2 clones provenientes del resultado obtenido en el panel **E**, los controles (-) y (+), corresponden a los mismos usados en los previamente, mostrados en los paneles **B** y **D**. En cada caso (100pb) corresponde al marcador de peso molecular O'geneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoScientific, EE.UU.) y (1kb) corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

En la Figura 7D, se muestra el PCR de colonia, donde se observa que a excepción del clon 4, todos muestran una banda del tamaño e intensidad como la observada en el control positivo. Del resultado anterior, se seleccionaron clones para realizar un ensayo de restricción de sus minipreparaciones de ADN plasmidial (sección 2.4.2.3), utilizando la enzima *SacI*, donde se espera obtener 3 fragmentos de restricción para pEarleyGate101::*Ac-mCS* Rns; de 7448 pb, 3842 pb y 855 pb. Se obtuvo que los clones 2 y 6 poseen bandas con tamaños similares a los esperados (Figura 7E). Finalmente se utilizaron ambas minipreparaciones de ADN plasmidial para proceder a transformar células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* GV3101 (sección 2.2.2.2). Algunos de los clones obtenidos fueron analizados mediante PCR de colonia como se observa en la Figura 7F, donde se muestra que todos los clones de *A. tumefaciens* transformados, con cualquiera de las dos minipreparaciones seleccionadas, mostraron poseer el fragmento esperado con una intensidad similar a la mostrada por el control positivo, y de un tamaño esperado similar al de éste. El control negativo por otro lado también muestra un amplicón notorio, sin embargo, la intensidad de la banda es considerablemente menor que en los otros carriles, y por lo tanto, su presencia fue obviada. Considerando lo anterior, se escogió el clon 1, de la transformación con la construcción pEarleyGate101::*Ac-mCS* Rns C.2 para continuar con el procedimiento de transformación transitoria de hojas de *N. tabacum*.

3.1.2.1 Transformación transitoria de *Nicotiana tabacum* y análisis con microscopía confocal.

Con el fin de determinar la localización subcelular de la proteína *Ac-mCS*, se procedió a infiltrar hojas de *N. tabacum* Wild Type (WT) (tabaco genotipo silvestre) con

el cultivo de *A. tumefaciens* transformado con el vector pEarleyGate101::*Ac-mCS* Rns, además de sus respectivos controles positivo (mt-gb) y negativo (pEarleyGate101 vacío). El procedimiento llevado a cabo se explica en la sección 2.2.4.1, y el resultado de microscopía se muestra en la (Figura 9) .

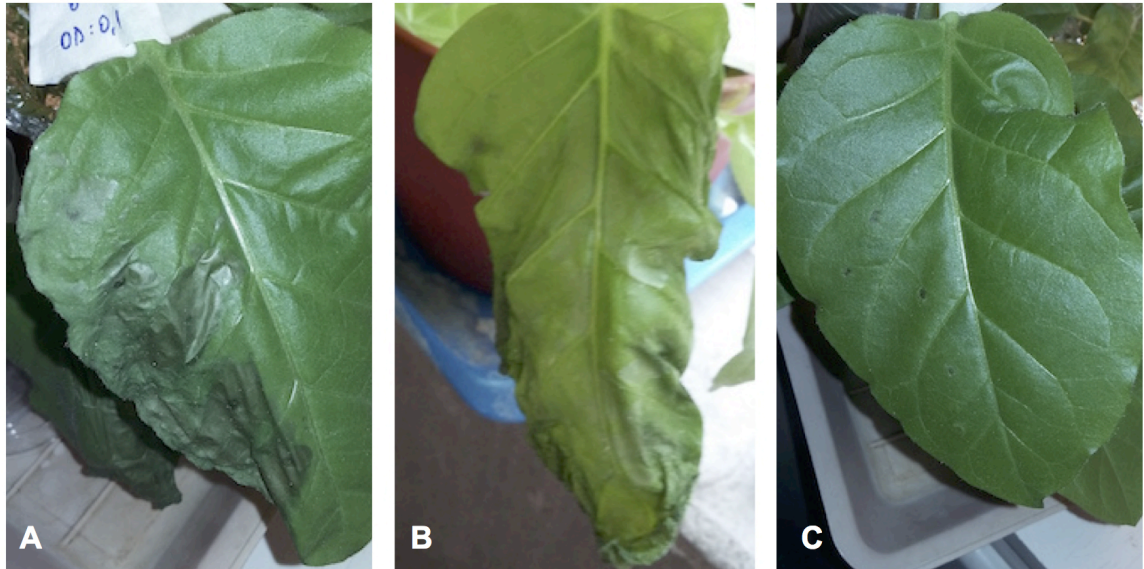


Figura 8. Daño por efecto de la Agroinfiltración. Hojas de *Nicotiana tabacum* luego de 2 días de haber sido infiltradas con una suspensión de *A. tumefaciens*. En **A** y **B**, se muestran dos de las hojas infiltradas con una suspensión de *A. tumefaciens* GV3101, transformada con el vector pEarleyGate101::*Ac-mCS* Rns (clones 2 y 6). En **C**, se muestra una de las hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* portador del vector pEarleyGate 101 vacío.

Es importante notar que la agroinfiltración con el vector pEarleyGate::*Ac-mCS* Rns produjo un daño importante en las hojas infiltradas, pero no así el resto de la planta, efecto no observado en las hojas infiltradas sólo con el medio de infiltración utilizado o infiltradas con el control negativo para microscopía (pEarleyGate101 vacío) (Figura 8).

Pese al considerable daño generado por la agroinfiltración con la suspensión de *A. tumefaciens* GV3101 pEarleyGate101::*Ac-mCS* Rns, fue posible observar en microscopía confocal, utilizando zonas infiltradas de la hoja, pero con un menor daño.

Como se observa en la Figura 9, particularmente para la fila correspondiente a la co-infiltración con *A. tumefaciens* portador del vector pEarleyGate101::*Ac-mCS* Rns junto a *A. tumefaciens* portador del vector mt-gb, es posible observar que hubo detección de fluorescencia correspondiente a EYFP, así como fluorescencia correspondiente a EGFP en mitocondria, observando al superponer las imágenes que existe colocalización en la expresión de las proteínas fluorescentes, mostrando que la localización subcelular del producto proteico de la secuencia clonada, es decir, de *Ac-mCS*, es efectivamente mitocondrial. Igualmente, se observa que en la infiltración realizada con *A. tumefaciens* portador del vector pEarleyGate101, no se detecta fluorescencia de EYFP ni EGFP, indicando que el vector por si solo no es responsable del resultado observado en la co-infiltración. Además se observa en la infiltración con *A. tumefaciens* portador del vector mt-gb, que existe detección de fluorescencia para EGFP pero no para EYFP, corroborando entonces que la fluorescencia de EYFP detectada, no es producto del vector mt-gb. Finalmente, en la última fila se muestra una magnificación realizada con el software del microscopio confocal de un área donde se observa la co-infiltración y donde es posible observar nuevamente, la co-localización del producto proteico del vector pEarleyGate101::*Ac-mCS* y mt-gb.

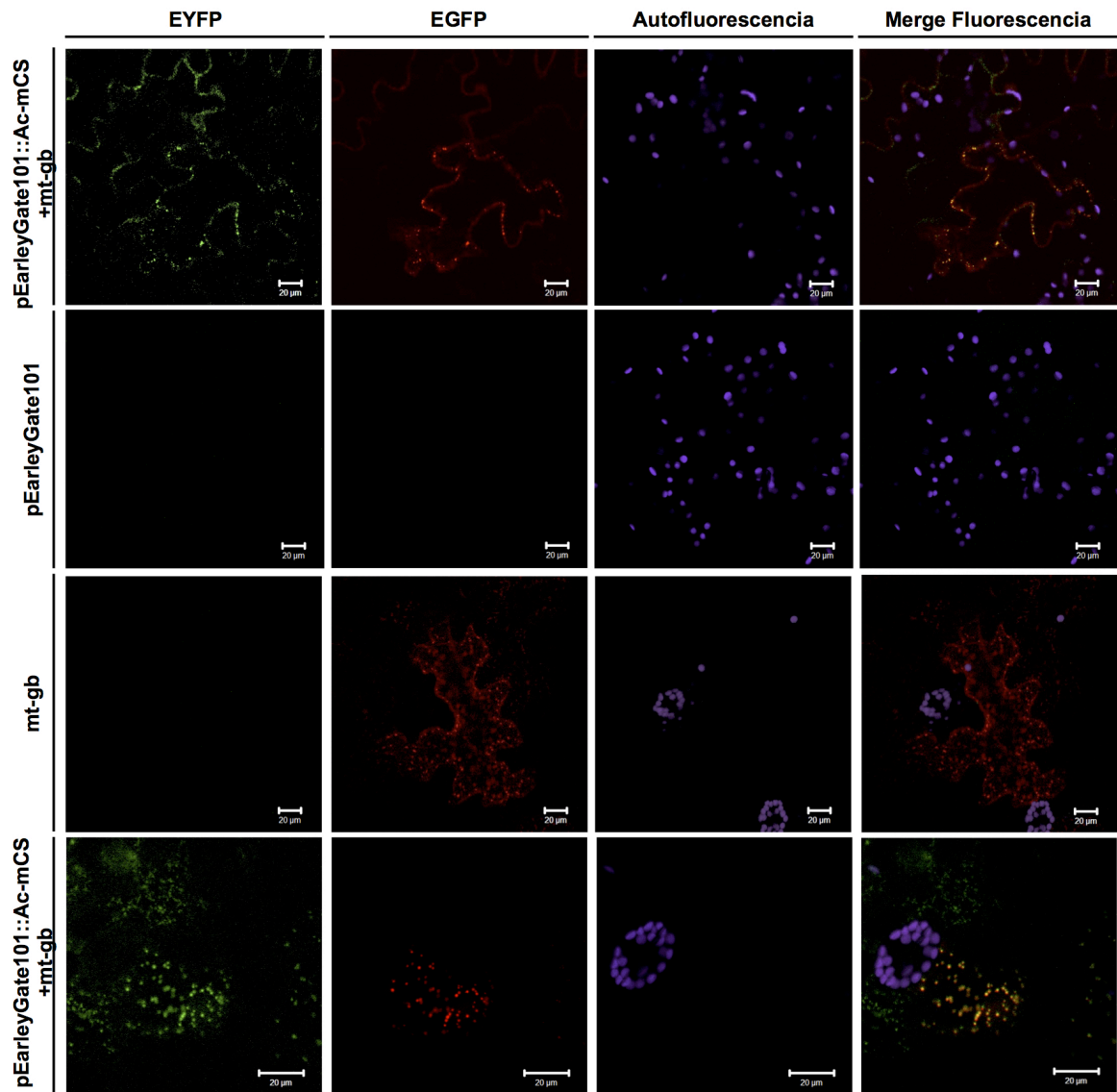


Figura 9. Determinación de la localización subcelular de Ac-mCS. Se muestran fotografías con una magnificación de 40X obtenidas de la observación con microscopía confocal de las hojas agroinfiltradas. La configuración para la observación en cada uno de los canales fue previamente descrita en el texto. A la izquierda de cada fila, se muestra el nombre del vector utilizado para realizar la transformación transitoria de hojas de tabaco. pEarleyGate101::Ac-mCS + mt-gb corresponde a la única infiltración doble, uno de los cultivos portador del vector con la secuencia de Ac-mCS clonada, y el otro cultivo con el control positivo de transformación. pEarleyGate101 corresponde al control negativo y mt-gb, corresponde al control positivo de transformación transitoria y localización subcelular mitocondrial. Arriba de cada columna, se indica el nombre de la fluorescencia detectada. La última fila, corresponde a un zoom 2X realizado con el software del microscopio confocal a la coinfiltración previamente descrita. EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein), EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), Autofluorescencia (Autofluorescencia de clorofila en cloroplastos), Merge fluorescencia (superposición de todas las anteriores). Las imágenes están artificialmente coloreadas. La barra blanca en la esquina inferior de cada cuadro indica un largo de 20 μm .

3.2 Generación de vectores para expresión estable en plantas, constitutiva y fruto-específica, portadores de *Ac-mCS* y transformación de *S. lycopersicum* var *Micro* - Tom

La primera actividad para la clonación del fragmento *Ac-mCS* y realizar las actividades posteriores, corresponde a la amplificación mediante PCR de la secuencia de *Ac-mCS*. Para ello, la secuencia codificante desde el codón de inicio al codón de término de la secuencia obtenida de trabajos previos en el laboratorio (González-Agüero y cols., 2016), fue amplificada utilizando la enzima Biolase™ DNA polymerase (Bioline, Alemania) y como templado ADNc proveniente de hoja, flor y fruto maduro de *Annona cherimola* cv. Concha Lisa,. Como se observa en la Figura 10A, correspondiente al resultado de electroforesis en gel de agarosa para la amplificación del fragmento *Ac-mCS* (con un tamaño aproximado al esperado de 1422 pb), existe mayor intensidad de banda (mayor cantidad de amplicón) en el carril correspondiente a ADNc de fruto maduro (FM). En el carril, es posible ver una banda.

Considerando lo anterior, se decidió utilizar como templado ADNc de fruto maduro de *Annona cherimola* cv. Concha Lisa, para realizar las reacciones de PCR con el fin de amplificar el fragmento a clonar, utilizando la enzima Platinum™ Pfx DNA polymerase (Invitrogen™, EE.UU.).

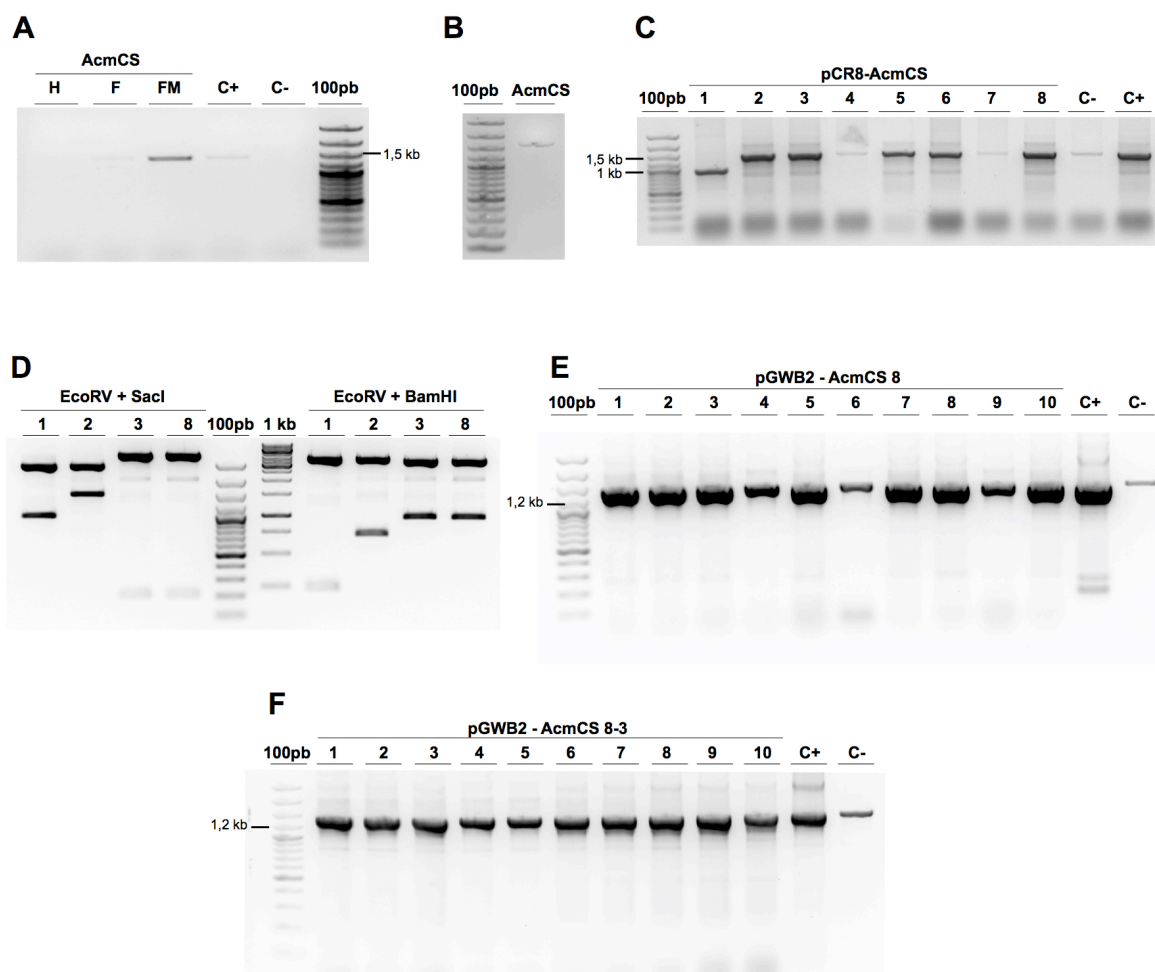


Figura 10. Clonación del Fragmento *Ac-mCS*. **A**, Amplificación mediante PCR desde cDNA de H:Hoja, F: Flor, FM: Fruto Maduro; +: control positivo usando 50 ng de cDNA de fruto de chirimoya como templado, y -: control negativo usando agua como templado. **B**, El producto de PCR *Ac-mCS* purificado desde PCR convencional usando la enzima *Pfx* con un tamaño esperado de 1422 pb, fue purificado y clonado en el vector de entrada pCR™8/GW/TOPO®. **C**, PCR de colonias de *E. coli* transformadas con el producto de la reacción de topoisomerización pCR8::*Ac-mCS*. **D**, Restricciones dobles, utilizando las enzimas *EcoRV* y *SacI*, y *EcoRV* y *BamHI*, de 1 ug de las minipreparaciones de ADN plasmidial de clones seleccionados. Los fragmentos esperados para la primera doble restricción, corresponden a 2 fragmentos, de 4035 pb y 204 pb, y con las enzimas *EcoRV* y *BamHI* genera dos fragmentos, de 3278 pb y 961 pb, si el fragmento ha sido clonado en sentido. Los fragmentos mencionados son observables en los carriles 3 y 8, para ambas restricciones. **E**, PCR de colonias de los clones de *E. coli* transformados con pGWB2::*Ac-mCS*, producto de la recombinación (LR reaction) entre el vector de entrada pCR8-*Ac-mCS* clon 8 y el vector de destinación pGWB2. (+) control positivo y (-) control negativo, usando 1 ng del vector pCR8::*Ac-mCS* y agua, respectivamente. **F**, PCR de colonia de *A. tumefaciens* transformado con el vector pGWB2::*Ac-mCS* seleccionado (pGWB2::*Ac-mCS* clon 3). (+) Control positivo y (-) control negativo, usando respectivamente 1 ng del vector pCR8::*Ac-mCS* y agua. Para todos los casos (100pb) corresponde al marcador de peso molecular O'geneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoScientific, EE.UU.) y (1kb) corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

El fragmento fue Ac-mCS fue amplificado mediante PCR (sección 2.3.2), y clonado en el vector de entrada pCR™8/GW/TOPO® posterior a la purificación desde gel de agarosa y cuantificación.. El producto de ligación (topoisomerización), fue utilizado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* cepa One Shot™ TOP10 (Invitrogen™, EE.UU.) (sección 2.2.1.1), y las colonias obtenidas fueron analizadas mediante PCR de colonia. En la Figura 10B, se muestra el fragmento Ac-mCS posterior a la purificación desde gel de agarosa y el resultado de la reacción de PCR de colonias de la transformación con pCR8::Ac-mCS se muestran en la Figura 1010C. Los clones 1, 2, 3, 5, 6, 8 (Figura 10C) muestran un amplicón y a excepción del clon 1, todos ellos tienen un fragmento aproximadamente en el tamaño esperado. Se seleccionaron los clones 1, 2, 3, y 8 para realizar ensayos de restricción correspondientes para poder corroborar si poseen el fragmento esperado y en qué orientación. Para lo anterior, se realizaron minipreparaciones de ADN plasmidial (sección 2.4.2.2). Se diseñó un ensayo de restricción doble con las enzimas EcoRV y SacI, y otro ensayo con las enzimas EcoRV y BamHI, para determinar tanto la presencia como la direccionalidad del fragmento clonado (*Ac-mCS*).

En caso de haberse clonado en sentido los fragmentos de restricción esperados para la doble digestión enzimática usando EcoRV y SacI, corresponden a dos fragmentos de 4035 y 204 pb; y para la doble digestión usando las enzimas EcoRV y BamHI, dos fragmentos de 3278 y 961 pb. Las colonias 3 y 8 de acuerdo a lo observado en la electroforesis en gel de agarosa muestran para ambos casos el patrón de bandas esperado. Por otro lado, en caso de la presencia del fragmento en antisentido, los tamaños de los fragmentos de restricción esperados, corresponden a 2773 y 1466 pb para la primera digestión doble y de 3522 y 717 pb para la segunda, por lo que la colonia 2, muestra contener el fragmento *Ac-mCS*, clonado en antisentido.

El clon 1, fue descartado debido a que los fragmentos de restricción no concuerdan con los tamaños esperados.

Luego de su secuenciación y comprobar que concordaba con la secuencia de *Ac-mCS* esperada, el clon número 8 de *E. coli* portador del vector pCR8::*Ac-mCS* fue utilizado para la recombinación homóloga con el vector de destinación pGWB2 (sección 2.3.8), usándose el producto para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* cepa One Shot™ TOP10 (Invitrogen™, EE.UU.). El procedimiento llevado a cabo es el mismo descrito previamente en esta sección, utilizando los antibióticos respectivos enunciados en la Tabla I. Los clones fueron analizados mediante PCR de colonia, resultado que se muestra en la Figura 10E, donde se observó que todos los clones muestran una banda con una intensidad similar a la observada en el control positivo, con un tamaño cercano al esperado (1422 pb), a excepción de los clones 4, 6 y 9, que pese a mostrar un tamaño similar, muestran menor intensidad. De manera arbitraria, se escogió el clon pGWB2::*Ac-mCS* número 3, y fue utilizado para realizar una minipreparación de ADN plasmidial, fue utilizado para transformar células quimiocompetentes de *A. tumefaciens*, y que luego de cultivar los clones obtenidos fueron analizados mediante PCR de colonia (Figura 10F). El resultado de esto último, se muestra en la Figura 10F, donde se observa que todos los clones analizados, muestran una banda de intensidad similar a mostrada en el control positivo. En consecuencia, el clon 3 fue seleccionado para transformar explantes de *S. lycopersicum*.

3.2.1 Generación del vector de destinación pGWB2::PG

El fragmento del promotor de poligalacturonasa, fue amplificado por PCR y posteriormente clonado en el vector de entrada pCR™8/GW/TOPO®. En la Figura 11A, se muestra el resultado de un PCR con gradiente de temperatura de alineamiento para la amplificación del fragmento del promotor de poligalacturonasa flanqueado por los sitios de restricción *HindIII* y *XbaI* en el 5' y 3' de la secuencia respectivamente, fragmento que posee un tamaño de 1231 pb.

En el rango de temperatura de alineamiento probado, se observa la presencia de amplicones (visibles) desde los 49 a los 62°C. Al momento de repetir la reacción de PCR con una enzima con actividad correctora de errores, como es la enzima Platinum™ *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen™, EE.UU.), no fue posible estandarizar las condiciones de PCR, y no fue posible obtener un amplicón. Debido a lo anterior, se decidió clonar el fragmento de PCR obtenido previamente con la enzima Taq polimerasa convencional (Biolase™ DNA polymerase, Bioline, Alemania) (Figura 11A). En la Figura 11B, se muestra el PCR de colonias realizado con las únicas colonias obtenidas del evento de ligación y transformación realizado para la clonación en el vector pCR™8/GW/TOPO®, donde además se puede observar que únicamente el clon 11 presentó un amplicón, el cual muestra un tamaño concordante con el esperado (1231 pb), y además similar al control positivo.

Los vectores necesarios para la generación de la construcción deseada pGWB2::PG (pGWB2 y pCR8::promPG), fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción *XbaI* y *HindIII*. Producto de la doble digestión enzimática, se espera para el vector pGWB2, dos fragmentos de 16371 y 865 pb; y para el vector pCR8::promPG la digestión completa genera tres fragmentos de 2579, 1225 y 250 pb. En la Figura 11C,

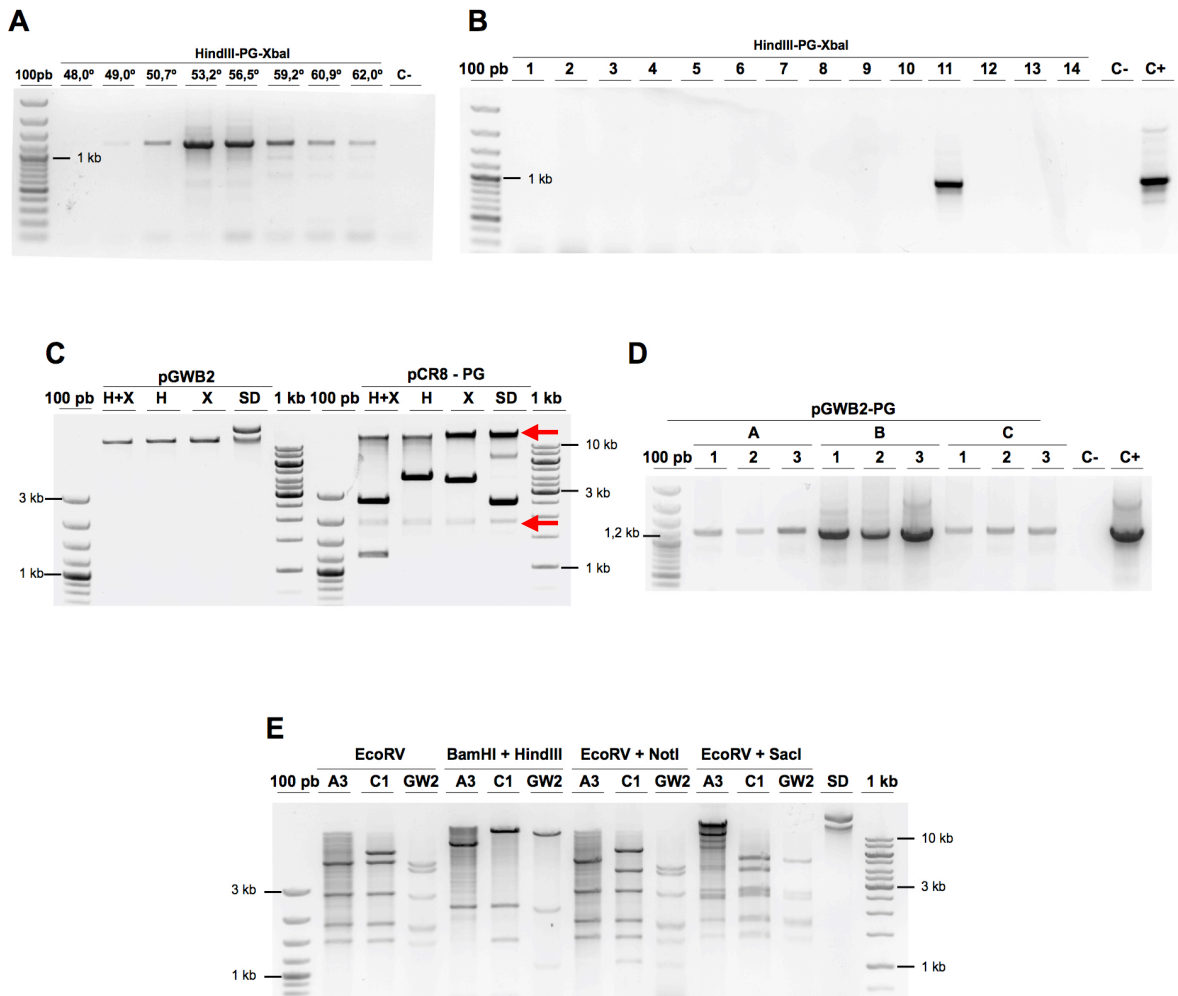


Figura 11. Clonación del Fragmento HindIII-promPG-XbaI y construcción del vector pGWB2::PG. A, Amplificación del fragmento HindIII-promPG-XbaI de 1231 pb, en gradiente de temperatura de alineamiento entre 48 y 62°C. El fragmento del tamaño aproximado mostrado en **A**, fue posteriormente purificado desde gel de agarosa y clonado en el vector de entrada pCRTM8/GW/TOPO®, **B**, PCR de colonia, realizado a todas las colonias de *E. coli* transformadas con el producto de topoisomerización entre el vector de entrada y el fragmento mostrado en **A**, solo el clon 11 muestra un amplicón similar al del control positivo. (+) Control positivo y (-) control negativo, utilizando como templado respectivamente 50 ng de ADN_g de *S. lycopersicum* var. Micro Tom y agua. **C**, Ensayo de restricción con las enzimas HindIII (H), XbaI (X) y doble digestión con ambas enzimas (H+X), usando como templado 1 ug de vector pGWB2 y pCR8::promPG. Para las digestiones simples se espera la linealización del vector pGWB2 de 17236 pb y para la doble digestión, dos fragmentos de 16371 y 865 pb; y para el vector pCR8::HindIII promPG XbaI, la digestión simple con XbaI genera fragmentos de 3804 y 250 pb; con la enzima HindIII se genera el vector lineal de 4054 pb y la doble digestión enzimática, genera fragmentos de 2579, 1225 y 250 pb. **D**, El fragmento de digestión del vector pGWB2 de 16371 pb y el fragmento del vector pCR8- HindIII promPG- XbaI de 1225 pb, fueron ligados y el producto utilizado para transformar *E. coli*. Se muestra en la figura el resultado del análisis de PCR de colonias transformadas con dicho producto de ligación A, B y C, hacen referencia a proporciones diferentes de ambos fragmentos (proporción vector inserto 1:3, 1:1, 3:1), y 1, 2 y 3, corresponden a clones de cada una de las transformaciones. **E**, restricción enzimática de los plásmidos obtenidos de los clones A3, C1 y del vector pGWB2 vacío. Los tamaños esperados respectivos, se muestran en la **Tabla VII**. De acuerdo a esto, el clon C1, muestra los fragmentos de restricción esperados para la construcción realizada. En los casos correspondientes (100pb): marcador de peso molecular O'geneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoScientific, EE.UU.) y (1kb): marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Flechas rojas, indican bandas inesperadas mencionadas en el texto.

se observa el resultado de la restricción doble y simple utilizando cada una de las enzimas mencionadas, para ambos vectores.

Aunque en la figura no es posible observarlo, al momento de la realización del gel, se pudo ver tenuemente una banda cercana a 900 pb (según el marcador de peso molecular) en el segundo carril, correspondiente a la doble digestión efectuada al vector pGWB2, utilizando las enzimas *HindIII* y *XbaI*. Al observar en la parte del gel correspondiente al vector pCR8::promPG (Figura 11C), es posible observar la presencia de bandas que no concuerdan con el tamaño esperado (Figura 11C, flechas rojas), por ejemplo, una banda que se encuentra sobre las 10000 pb, y una que se encuentra cerca de las 2000, ambas presentes en el control sin digerir, indicando que no es una banda extra en la digestión sino algún tipo de contaminación con otro ácido nucleico en la minipreparación. En la doble digestión del vector pCR8::promPG, es esperable observar una banda de 250 pb la se encontraba presente, aunque no pueda apreciarse claramente en el gel.

Habiendo observado que las bandas esperadas se encontraban visibles en el ensayo de restricción, se realizó la purificación de éstas, y luego se ligó los fragmentos de restricción necesarios para tal propósito tal (sección 2.3.7)

El producto de ligación entre los fragmentos de restricción fue utilizado para transformar células de *E. coli* One Shot® ccdB Survival™ 2 T1^R (Invitrogen™, EE.UU.), (sección 2.2.2.1). Las colonias seleccionadas fueron analizadas mediante PCR de colonia (Figura 11D), para amplificar un fragmento de 1237 pb. En todos los carriles se observa un fragmento cercano al tamaño esperado, cuyo tamaño es similar al del

control positivo. Particularmente los clones B1, B2, y B3, parecen tener un amplicón de un tamaño e intensidad similar al control positivo.

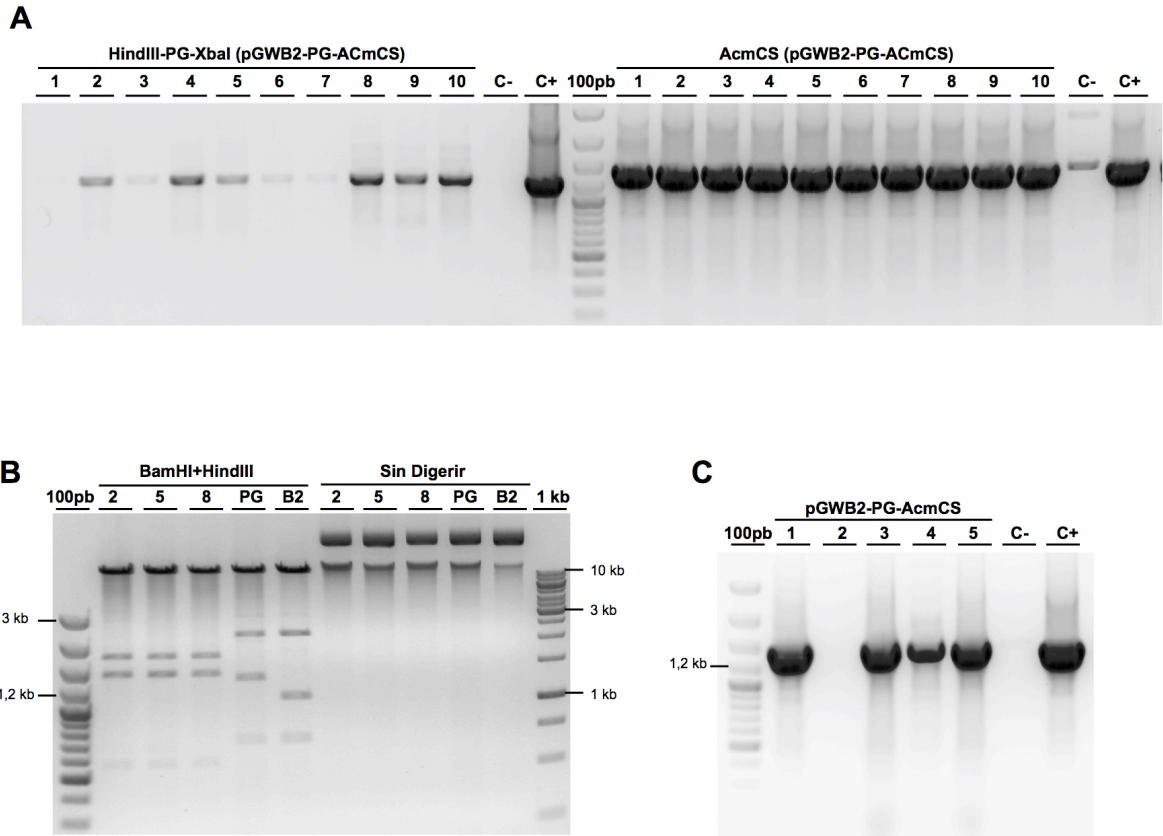


Figura 12. Construcción del vector pGWB2::PG::Ac-mCS. **A**, El vector obtenido en la Figura 11E, fue posteriormente recombinado con el vector de entrada portador del fragmento *Ac-mCS*, producto con el cual se transformó *E. coli*. En la figura, se muestra PCR de colonias para determinar la presencia del fragmento HindIII-promPG-XbaI, parte del vector pGWB2::PG, y del fragmento *Ac-mCS*. (C-) Control negativo usando agua como templado y positivos (+), usando 1 ng del vector pCR8-HindIII-promPG-XbaI como templado para el caso análisis de HindIII-promPG-XbaI, y 1 ng del vector pCR8::Ac-mCS para análisis de *Ac-mCS*. **B**, Ensayo de restricción para los clones seleccionados del paso anterior, es decir, pGWB2::PG::Ac-mCS clon 2, 5 y 8 (2, 5 y 8, en la figura respectivamente), pGWB2::PG (PG), y pGWB2 (B2), en doble restricción con las enzimas BamHI y HindIII, además de los mismos ADN sin digerir como control. Los clones muestran el mismo patrón de digestión, correspondiente a los tamaños esperados. **C**, PCR de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con el vector pGWB2::PG::Ac-mCS. (C+) control positivo, usando 1 ng de pCR8::Ac-mCS como templado, (C-) control negativo usando agua como templado de la reacción. (100pb): marcador de peso molecular O'geneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoScientific, EE.UU.) y (1kb): marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Se decidió seguir analizando algunos de los clones anteriormente expuestos, con ensayos de restricción. Al realizar ensayos de restricción de los clones A3 y C1, utilizando las enzimas *EcoRV*, *BamHI+HindIII*, *EcoRV+NotI* y *EcoRV+SacI*, se llegó a obtener el resultado mostrado en la Figura 11E. Debido a la cantidad de fragmentos esperados en el ensayo de restricción, éstos se resumen en la Tabla VII.

Tabla VII. Fragmentos de restricción de pGWB2 y pGWB2::PG. Resumen de los fragmentos de restricción para los 4 ensayos de restricción diferentes realizados (*EcoRV*, *BamHI+HindIII*, *EcoRV+NotI*, *EcoRV+SacI*) utilizando los vectores pGWB2:PG y pGWB2.

EcoRV		BamHI + HindIII		EcoRV + NotI		EcoRV + SacI	
pGWB2::PG	pGWB2	pGWB2::PG	pGWB2	pGWB2::PG	pGWB2	pGWB2::PG	pGWB2
6499 pb	5005 pb	13230 pb	13230 pb	6499 pb	4390 pb	5005 pb	5005 pb
5005 pb	4390 pb	2217 pb	2217 pb	3934 pb	3934 pb	3960 pb	2736 pb
2736 pb	2736 pb	1446 pb	1086 pb	2736 pb	2736 pb	2736 pb	2539 pb
1801 pb	1801 pb	703 pb	703 pb	1801 pb	1801 pb	2539 pb	1851 pb
1429 pb	2749 pb			1429 pb	1749 pb	1801 pb	1801 pb
126 pb	1429 pb			1071 pb	1429 pb	1429 pb	1749 pb
	126 pb			126 pb	1071 pb	126 pb	1429 pb
					126 pb		126 pb

Al comparar los fragmentos esperados (Tabla VII) con los fragmentos obtenidos (Figura 11E), se puede observar que el clon C1 contiene el vector deseado. Como consecuencia, se utilizó la minipreparación de ADN plasmidial del clon C1 de *E. coli* para realizar los siguientes procedimientos, particularmente la recombinación homóloga (reacción LR), con el vector portador del inserto de interés pCR8::Ac-mCS obtenido en la sección 3.2.1, y siguiendo la metodología previamente utilizada para la recombinación con el vector pGWB2. El producto de recombinación fue utilizado para transformar *E. coli* quimiocompetente One Shot® TOP10 (Invitrogen™, EE.UU.), los clones obtenidos (Figura 12A) fueron analizados mediante PCR de colonias y ensayo de restricción (Figura 12B), del mismo modo en que fue realizado para el vector

pGWB2::Ac-mCS; y finalmente se realizó una minipreparación de ADN plasmidial del clon 2 de *E. coli* transformado con el vector pGWB2::PG::Ac-mCS. Posteriormente, con los resultados obtenidos (Figura 12A y B) se transformó *A. tumefaciens* GV3101 quimiocompetente, con el vector seleccionado (minipreparación del clon 2 de *E. coli*) y su presencia fue corroborada mediante PCR convencional, (Figura 12C). Los clones 1, 3 y 5, muestran una banda de intensidad (aunque saturada) similar a la del control positivo.

3.2.2 Transformación estable de explantes de *Solanum lycopersicum* con las construcciones pGWB2::Ac-mCS y pGWB2::PG::Ac-mCS

La Figura 13, muestra los diferentes estados de explantes de tomate (cotiledones de tomate), sometidos al protocolo de transformación de explantes mediada por *A. tumefaciens*, y los siguientes procedimientos de organogénesis somática. Luego de 15 a 20 días en oscuridad, se obtuvieron cotiledones de aproximadamente 10 mm de largo notoriamente cloróticos, condición que se revirtió luego de dos días cultivadas con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (Figura 13A). Los cotiledones co-cultivándose con la suspensión celular de *A. tumefaciens* (portando el vector de interés), permanecen sin modificaciones aparentes, a excepción de un grado de deshidratación producto de la manipulación (Figura 13B). Luego de aproximadamente 2 semanas de haber subcultivado los explantes al primer medio para la organogénesis somática (medio de inducción de callo), se muestra un evidente engrosamiento de los cotiledones, aumentando su ancho y su rigidez producto de las hormonas que suplementan el medio de cultivo (Figura 13C). En este punto, la manipulación de los explantes generó frecuentemente su fragmentación de manera involuntaria, lo que además generó un aumento del número de explantes.

Debido a que el medio utilizado en esta etapa ya estaba suplementado con antibiótico de selección (higromicina), los explantes utilizados como control para la selección mostraron signos evidentes de daño tisular. Los explantes transformados con el gen Ac-mCS, mostraron un particular retraso en la organogénesis, principalmente desde la elongación de tallos. Entre 6 a 7 semanas de haber sido iniciada la manipulación para inducir la organogénesis somática, los explantes transformantes presentaron un menor tamaño, comparado con los explantes transformados con los vectores vacíos y con los explantes sometidos a organogénesis somática. Luego de 4 meses de haber sido iniciada la organogénesis somática, se obtuvieron las primeras plántulas con hojas y tallos diferenciados y por lo tanto individualizables. El desarrollo de raíces en medio de enraizamiento demoró cerca de 3 semanas en las plantas transgénicas, en los casos en que hubo formación de raíces. En términos comparativos, en esta etapa fue notoria la falta de crecimiento en las plantas transgénicas particularmente cuando se compararon con las plantas obtenidas como control de organogénesis (no sometidas a transformación pero sí cultivadas *in vitro* para inducir la organogénesis somática) (Figura 13E). Finalmente, luego de aproximadamente 6 meses de haber iniciado la transformación, se comenzaron a enraizar y posteriormente aclimatar las primeras líneas transformantes correspondientes en un inicio a 4 líneas (Figura 13E), y luego llegando a aclimatar otras 4 plántulas en tierra, además de otras 36 en etapa de elongación y enraizamiento que fueron analizadas a nivel molecular.

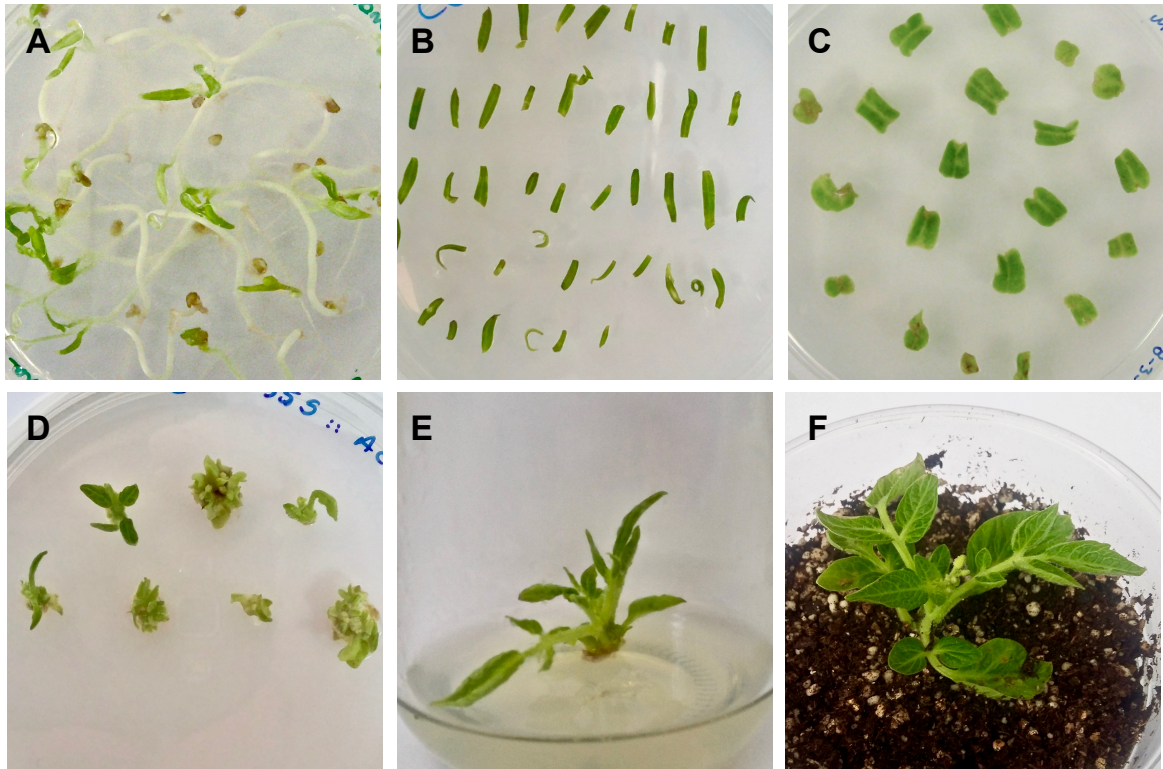


Figura 13. Transformación de explantes de *S. lycopersicum* y organogénesis somática. Plántulas y los explantes de cotiledones de tomate en diversas etapas del procedimiento de transformación estable y organogénesis somática **A**, Plántulas de tomate en medio germinación. **B**, Cotiledones de tomate co-cultivados con un cultivo del clon de *Agrobacterium tumefaciens* portador del vector de interés para la transformación estable transformación estable. **C**, Cotiledones de tomate en medio de Inducción de callo, a 2 semanas de haber sido expuestos a *A. tumefaciens* para transformarlos establemente. **D**, Explantes en medio de elongación aproximadamente 5 semanas después. **E**, Planta en medio de enraizamiento, obtenida a partir de un cotiledón transformado y que pasó por todo el proceso de organogénesis somática mostrado en los cuadros anteriores. **F**, Planta en aclimatación en sustrato sólido.

3.2.3 Análisis molecular de plántulas

Las plántulas obtenidas a partir del proceso de transformación mediada por *A. tumefaciens*, fueron analizadas mediante PCR. Para ello, se obtuvo ADNg desde hojas de las plántulas transformantes (sección 2.4.3.2).

Se amplificó el gen *LAT52*, utilizando unos partidores que generan un amplicón de 92 pb (Tabla II), descrito como un gen de copia única (Yang y cols., 2008), en este caso,

utilizado para comprobar el estado y calidad del ADN utilizado. El resultado de dicha reacción de PCR, se muestra en la Figura 14A y C.

Igualmente, se realizó una reacción de PCR utilizando partidores para un fragmento del gen que confiere resistencia a higromicina (*HPT*, ver Tabla II) con un tamaño de amplicón de 683 pb en 8 líneas (Figura 14) El PCR mostrado en la Figura 14A y B, corresponde a las primeras 4 líneas obtenidas y en Figura 14C y D, se muestra el análisis realizado posteriormente a otras 4 plantas en etapa de enraizamiento, que presentaban un mayor tamaño y que se encontraban más próximas a la aclimatación. Se observa que de las 4 líneas analizadas inicialmente, todas presentaron el amplicón de higromicina (Figura 14A), al igual que el amplicón del *LAT52*, utilizado como control de la integridad del ADNg. Por otro lado para las líneas analizadas posteriormente, todas muestran el amplicón para *LAT52*, pero solo la línea 7 muestra el amplicón de *HPT*, Esto indica que finalmente se obtuvieron 5 líneas transgénicas para 35S::*AcmCS* y ninguna con la construcción del promotor fruto específico (Figura 14). En el Anexo I (Figura S1), se muestra el resultado de las 4 líneas mostradas en la Figura 14 C y D, junto a otras 36 líneas transformantes analizadas por PCR luego del segundo evento de transformación, en el cual se incluyó plantas en etapa de elongación y enraizamiento. Se observó en primer lugar que todas las líneas analizadas muestran el amplicón esperado para *LAT52*, así como en los controles correspondientes. De las 27 líneas analizadas transformadas con la construcción PG::*Ac-mCS*, se observa la presencia de una banda muy tenue en el tamaño esperado para *HPT* en los carriles rotulados HPT, de las líneas 1, 2, 3, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 23, 24, 25, y 27, ninguno de intensidad similar a cualquiera de los controles positivos (TG1 y GW), por lo que fueron descartadas, considerando que no habían plantas transgénicas. Para la construcción 35S::*Ac-mCS*, de las 7 líneas analizadas sólo la línea 7 muestra una

banda para HPT con el tamaño esperado, similar al observado en el control positivo (TG1 y GW) en tamaño e intensidad de la banda. Finalmente, para las líneas analizadas transformadas con la construcción PG::*ccdB-cmR*, no se observa un amplicón correspondiente a HPT, indicando que las 6 líneas analizadas no son transgénicas. Del total de líneas mostradas en la Figura S1, solo la línea 7, portadora de la construcción 35S::*Ac-mCS* resultó ser transgénica (resultado mostrado igualmente en la Figura 14 C y D),

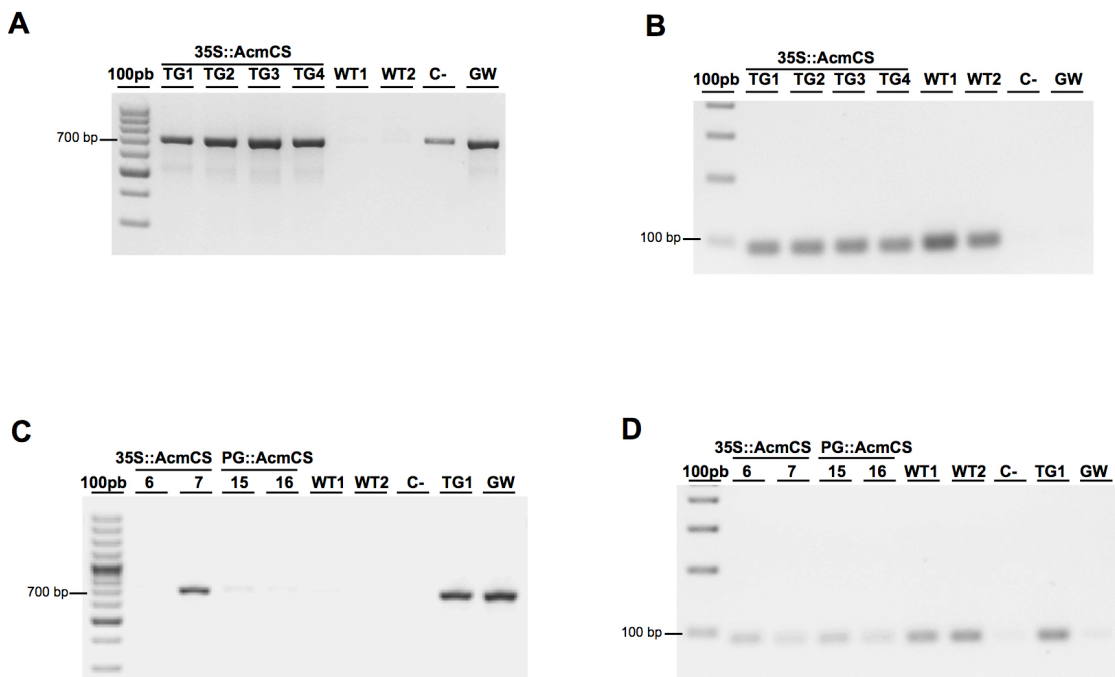


Figura 14. Análisis molecular de plántulas de *S. lycopersicum* transformantes. PCR de las plántulas de tomate transformantes para el gen *AcmCS*. Se amplificó un fragmento del gen de resistencia a higromicina de 683 pb (*HPT*) para determinar la presencia del transgén (**A** y **C**) y de un fragmento del gen *LAT52* de 92 pb (**B** y **D**) como control de integridad del ADNg. **A**), PCR del fragmento de *HPT* y de **B**) *LAT52*, en las líneas transformantes TG1, TG2, TG3 y TG4 en etapa de aclimatación, **C** PCR del fragmento de *HPT* y de **D**) *LAT52* en las líneas transformantes 6 y 7 con la construcción 35S::*Ac-mCS* y las líneas 15 y 16 con la construcción PG::*Ac-mCS*. (GW) control positivo corresponde al vector pGWB2::*Ac-mCS*, (-) control negativo usando agua como templado, WT1 y WT2, corresponden a ADNg de tomate (var. Micro-Tom) silvestre. 100pb: marcador de peso molecular O'geneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoScientific, EE.UU.).

4 DISCUSIÓN

4.1 Transformación transitoria y localización subcelular

4.1.1 Localización subcelular de Ac-mCS *in silico*

La secuencia nucleotídica de *Ac-mC* disponible de trabajos previos en el laboratorio (González-Agüero y cols., 2016) y cuya secuencia nucleotídica y aminoacídica se encuentran anotadas bajo el número de acceso de GeneBank KU524485.1, fue analizada mediante un análisis *in silico* con el fin de contrastar los resultados obtenidos con una predicción bioinformática. Al revisar los resultados obtenidos luego del uso de la herramienta BLASTn de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), y refiriéndose particularmente a los 10 primeros resultados entregados, fue posible notar que prácticamente todos corresponden a enzimas mCS de diversos organismos, siendo la totalidad de ellos de planta

Se utilizaron 3 herramientas disponibles en línea en el portal de recursos ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB). La utilización de las herramientas se limitó a verificar la presencia de una secuencia de destinación, y particularmente de destinación a mitocondria, corroborando la predicción informada en la literatura (González-Agüero y cols., 2016). La primera de ellas llamada TargetP 1.1, herramienta que permite predecir la localización subcelular (Figura 12) indicando la presencia de secuencias de destinación a plastidios, mitocondria, vía secretoria u otros. Luego del análisis, el software entrega un puntaje asociado para cada posible destinación analizada. Para *Ac-mCS*, se muestra que el mayor puntaje asignado, corresponde a destinación a mitocondria. Paralelamente entrega un parámetro indicador de la confianza del resultado, *Reliability class* (RC), correspondiente a la diferencia entre mayor y el segundo mayor puntaje asignado a

cada destinación (Emanuelsson y cols., 2007). En este caso, el valor de RC igual a 2, indicando un resultado confiable.

El segundo recurso utilizado corresponde a la herramienta MitoFates (Fukasawa y cols., 2015), la cual reconoce una secuencia previa mitocondrial (en el extremo amino terminal), indicando que la probabilidad de que se encuentre una “pre-secuencia” es igual a 0,979, indicando incluso un sitio de corte para MPP (*Mitochondrial processing peptidase*) que es la enzima encargada de la restricción de secuencias señal para proteínas mitocondriales (Fukasawa y cols., 2015).

La tercera herramienta utilizada, corresponde a MitoProt II v1.101 (Claros y Vincens, 1996). Al ingresar la secuencia disponible de Ac-mCS, el programa identifica una secuencia de destinación a mitocondria, indicando que la probabilidad de que en la secuencia aminoacídica introducida se encuentre presente una secuencia de exportación a mitocondria es igual a 0,9536 (ver Figura 12B).

Aunque los otros resultados sobre sitio de corte del péptido señal, o de su longitud poseen importancia en sí, se escapan al objetivo inicial de la utilización de estas herramientas. Sin embargo, mediante las tres herramientas se corroboran los resultados obtenidos en trabajos previos en el laboratorio, y durante el desarrollo del seminario de título, los cuales serán detallados en la sección 4.1.2.

4.1.2 Transformación transitoria de *Nicotiana tabacum*

La secuencia amplificada mediante PCR fue clonada con todos los pasos respectivos hasta la generación de una línea clonal de *A. tumefaciens*, portador del vector de expresión pEarleyGate101::Ac-mCS Rns. El vector utilizado, genera una proteína de fusión entre el producto proteico de la secuencia clonada (*Ac-mCS*) y una proteína fluorescente (EYFP). Posteriormente, realizó la transformación transitoria de

hojas de *N. tabacum*, siguiendo el protocolo descrito por Sparkes y cols., 2006. En resumen, se llegó a infiltrar hojas de tabaco con un cultivo celular de *A. tumefaciens* GV3101, portador del vector pEarleyGate101::Ac-mCS con una densidad óptica a 600 nm de 0,1 ($DO_{600} = 0,1$). Pese a que este valor es el mismo descrito en la publicación anteriormente citada, se probaron otras densidades ópticas del cultivo $DO_{600} = 0,5$; 0,1 y 0,01, y aunque no se muestran resultados, fue notorio que a una densidad óptica mayor que la indicada, se produjo un daño considerable en las hojas de tabaco, de modo que no fue posible realizar la visualización de las muestras frescas en microscopía confocal. El efecto observado de la transformación transitoria podría deberse a que la sobreexpresión del gen resulta ser letal para la especie utilizada, retrasando el crecimiento dada la sobreexpresión de un péptido con posible función citrato sintasa, o generando una evidente muerte celular en el caso de la infiltración de tabaco con densidades ópticas muy altas. Al revisar las posibles causas de la muerte, una de las explicaciones que se encuentra en la literatura ante la muerte de las hojas agro-infiltradas es posible encontrarla en la misma publicación utilizada como referencia para la transformación transitoria, donde los autores indican que la muerte de la hoja puede deberse a la sobreexpresión de un gen con un efecto letal cuando se expresa en tejido foliar o en un nivel muy alto (Sparkes y cols., 2006). Para el caso particular, dado que no impidió la posterior observación en microscopía, no fue necesario realizar modificaciones al protocolo mismo para realizar los posteriores análisis, sin embargo, sí se probó realizando una disminución de la densidad óptica del cultivo como una manera de determinar si genera un daño menor, y tal como se esperaba, reducir a la mitad o a un tercio la densidad óptica (de una $DO_{600} = 0,1$ a 0,05 o 0,03) minimizó el daño al tejido utilizado pero a su vez, disminuyó la transformación de modo que al observar en microscopía sólo un reducido número de células mostró

fluorescencia lo que en términos prácticos habría dificultado excesivamente la co-localización al realizar la co-transformación con el vector portador de *Ac-mCS* y su control positivo. Por otro lado, al realizar la visualización de muestras con una densidad óptica menor, no fue posible visualizar células efectivamente transformadas, de modo que fuera un resultado evidente, y no fuera necesaria forzar una interpretación para ver el resultado. Debido a esto, la densidad óptica utilizada para la infiltración fue la misma indicada en la publicación de Sparkes y cols., 2006.

Dada la conveniencia de utilizar un control positivo para la localización subcelular, se decidió utilizar el vector mt-gb, descrito por Nelson y cols., 2007, el cual porta la secuencia de destinación COX4 (citocromo c oxidasa IV), una enzima mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*, y la secuencia que codifica la proteína fluorescente verde (EGFP). Luego de realizar los pasos respectivos hasta obtener *A. tumefaciens* GV3101 transformado con el vector mt-gb, se continuó con la transformación transitoria utilizando 4 densidades ópticas, $OD_{600} = 0,1; 0,05; 0,03$ y $0,01$. En este caso, las densidades ópticas fueron probadas teniendo como punto de partida, la transformación realizada con el vector pEarleyGate101::*Ac-mCS* Rns. En este caso, y considerando que una densidad óptica mayor a 0,1 podría ser negativo para las hojas con el protocolo utilizado, se llegó a observar que se obtenía fluorescencia en todos los casos a excepción de la densidad $DO_{600} = 0,01$. Finalmente se realizó el ensayo mediante la co-infiltración, utilizando densidad óptica de *A. tumefaciens* GV3101 *Ac-mCS* igual a 0,1 y para *A. tumefaciens* GV3101 mt-gb igual a 0,03; experimento cuyos resultados se muestran en la Figura 9. La transformación únicamente con el vector portador del gen de interés no se muestra, aunque sí fue realizada con anterioridad, mostrando resultados similares a los expuestos en la Figura 9. Al comenzar a analizar los resultados obtenidos, es posible observar 3 puntos

principales. En primer lugar, constatar que en la transformación con el vector pEarleyGate101 sin inserto no se detectó fluorescencia, mostrando que por si solo no es responsable de la fluorescencia observada en las transformaciones realizadas con el vector. En segundo lugar, que el vector mt-gb, utilizado como control positivo de localización mitocondrial, sólo es responsable de la fluorescencia detectada para EGFP, y no interfiere en la detección de la fluorescencia de EYFP. Finalmente, en relación a la co-transformación considerando los resultados de microscopía confocal (Figura 9) resulta notorio primero que hay detección de fluorescencia para cada transformación de modo individual (pEarleyGate101::Ac-mCS y mt-gb), y además en la co-infiltración, siendo efectiva la co-transformación y observándose en la superposición de las imágenes (Figura 9) que ambas proteínas (Ac-mCS::EYFP y EGFP) poseen la misma localización subcelular. Como una observación paralela, pero no menos importante, se utilizó igualmente para cada muestra analizada, el microscopio con una configuración para detectar la fluorescencia de cloroplastos para tener una referencia de la localización considerando que no se realizó la visualización del campo claro para estas muestras, y por lo tanto, no hay mayor referencia que las fluorescencias detectadas. Ahora bien, en relación a la localización subcelular y particularmente a la localización mitocondrial, dos argumentos pueden ser utilizados para justificar la aseveración de que la localización del producto proteico expresado fusionado a la proteína EYFP poseen localización subcelular. El primer argumento corresponde a la localización de la fluorescencia mostrada por la proteína EGFP. Considerando que en la publicación de Nelson y cols., 2007, de la cual proviene el vector mt-gb, se muestra la colocalización entre uno de los vectores con la secuencia de destinación a mitocondria (control de destinación a mitocondria) y la de una proteína de *A. thaliana* cuya localización predicha utilizando programas computacionales (dos de los cuales

fueron usados en este seminario para predecir la localización *in silico* de Ac-mCS) muestra que la proteína en cuestión posee localización mitocondrial, esto solo como una manera de justificar la utilización de este vector como control de localización.. El segundo argumento puede resultar más subjetivo debido a que depende del criterio del observador. Para poder establecer que las estructuras observadas corresponden a mitocondrias es necesario tener en consideración que las mitocondrias son pleomórficas, y aunque suelen describirse como estructuras esféricas u ovoides de un tamaño promedio de 0,2 a 1,5 μm de diámetro, su morfología puede modificarse desde una apariencia puntiforme o esférica, a una estructura tubular más elongada, modificándose igualmente la cantidad de mitocondrias observándose que el aumento en el tamaño, también tiene una relación con la menor cantidad de mitocondrias visibles, las cuales en su conformación esférica puede ser entre cientos a miles por célula vegetal (Logan, 2006). Además, resulta relevante mencionar que la morfología mitocondrial puede verse modificada no solamente durante ciertas fases del ciclo celular donde pueden encontrarse mitocondrias con “tentáculos” (fase G1 hasta fase S del ciclo celular), con un volumen aumentado (fase G2), o con tamaño aumentado debido a su fusión (durante mitosis) (Seguí-Simarro y cols., 2008); sino que además, variables como la intensidad lumínica, la carencia de oxígeno, o los niveles de azúcares particularmente sacarosa (que puede ser suministrada mediante el riego) pueden intervenir en los procesos de fusión y fisión mitocondrial (Jaipargas y cols., 2015).

Para el caso particular se observa en el resultado mostrado en la Figura 9 que la morfología resulta ser la más convencional, observándose en ambos casos mostrados (co-transformación y transformación con mt-gb) la misma apariencia tanto de forma como distribución. Considerando los dos argumentos planteados

anteriormente, resultaría apropiado aseverar que la localización subcelular de Ac-mCS, resulta ser mitocondrial, corroborando de este modo los resultados obtenidos con las aproximaciones bioinformáticas realizadas.

4.2 Transformación estable de *S. lycopersicum*

En relación a la transformación estable de tomate, existen dos puntos importantes a considerar. El primero de ellos, corresponde a la generación del vector de expresión pGWB2::PG sobre la cual se discutirá en la sección 4.2.1. El segundo corresponde a la transformación y organogénesis misma de tomate, caso para el que se realizará la discusión de los resultados en la sección 4.2.2.

4.2.1 Generación del vector de expresión pGWB2::PG

Un paso que inicialmente resultaba relevante para este seminario de título, e incluso sigue resultando relevante para futuros experimentos desprendidos de éste, es la obtención de líneas transgénicas que expresen el producto génico de *Ac-mCS*. Para ello, y como fue mencionado con anterioridad en la propuesta de estudio, se estableció la posibilidad de realizar la transformación de *S. lycopersicum* var. Micro-Tom, utilizando vectores binarios compatibles con el sistema Gateway™ (Nakagawa y cols., 2007), de modo de facilitar la obtención de los vectores de expresión. Sin embargo, la utilización de un promotor CaMV 35S, de expresión constitutiva podría tener efectos que resultaran inesperados como bajos o nulos niveles de expresión en ciertos tejidos, o variaciones de expresión entre diferentes especies de plantas (Dutt y cols., 2014), o bien otros efectos producto de la sobreexpresión misma de un transgén considerando que la enzima que se deseaba expresar en forma heteróloga en tomate (Ac-mCS), es

una enzima del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, vía metabólica universal para los organismos aeróbicos, involucrado no sólo en la obtención de ATP y poder reductor, sino que además involucrado en otros procesos como la asimilación de nitrógeno, regulación del equilibrio redox y almacenamiento de citrato (Sweetlove y cols., 2010); y pudiendo ser entonces un caso en que la expresión de un gen bajo la regulación del promotor 35S interfiera con el crecimiento y desarrollo normal de una planta (Dutt y cols., 2014). Por ello, la utilización de un promotor alternativo, que limitara la expresión del producto génico deseado al órgano blanco para los posteriores estudios resultaba una opción a considerar. Para ello, y como fue mencionado en la sección 1.4, se decidió utilizar una región del promotor de poligalacturonasa descrito por Montgomery y cols., 1993, particularmente uno de los fragmentos de 1150 pb (como describen los autores) mostrado en la Figura 3. Es necesario destacar que la generación del vector podría resultar útil para estudios posteriores. Como se menciona posteriormente en la sección 4.2.2, la incapacidad de obtener plantas por factores que en parte son aún desconocidos podría haberse sorteado de poder haber transformado efectivamente con el vector pGWB2::PG portador del inserto deseado. Debido a lo anterior, se ha realizado previamente transformación utilizando promotores que permiten la expresión de genes de manera tejido específica y tiempo específica (Fernandez y cols., 2009; Dutt y cols., 2014). El caso particular del fragmento del promotor de poligalacturonasa permite la expresión de manera específica en frutos y cuya expresión aumenta igualmente durante el proceso de maduración (Montgomery y cols., 1993; Fernandez y cols., 2009). Considerando lo anterior, la obtención del vector resulta ser una buena alternativa para realizar estudios en frutos, restringiendo la expresión génica a un tejido y tiempo particular, lo que por lo demás se correlaciona con el momento de aparición de efectos observados en trabajos previos del laboratorio, como el aumento de la

acumulación de transcrito de *Ac-mCS*, mayor actividad enzimática de mCS y aumento de la acidez titulable (a lo largo de la maduración de frutos de chirimoya).

4.2.2 Transformación y organogénesis somática de *S. lycopersicum*

Para la realización de la transformación estable de *S. lycopersicum* con la secuencia codificante de la enzima *Ac-mCS*, y posterior organogénesis somática, se realizó el protocolo descrito por Sun y cols., 2006 y en relación al proceso mismo, existen varios puntos a discutir. Como fue mostrado con anterioridad, se han obtenido en total 5 plántulas transgénicas. Aunque se realizaron transformaciones con 4 construcciones (pGWB2::*Ac-mCS*, pGWB2::PG::*Ac-mCS* y los respectivos vectores vacíos pGWB2 y pGWB2::PG), utilizando en promedio 100 cotiledones por cada construcción (400 cotiledones por cada transformación), y habiendo obtenido plántulas luego del proceso de organogénesis somática, finalmente sólo se obtuvo 5 plantas transgénicas, de las cuales las 4 primeras (mostradas en la Figura 14A y B), mostraron contaminación con microorganismos aún estando en la etapa de elongación de tallos, y pese a que fueron sometidas a procesos de esterilización superficial, subcultivados al medio correspondiente suplementado con un agente biocida (PPM™, Plant Cell Technology Inc., EE.UU) y posteriormente a aclimatación en tierra esperando su enraizamiento en sustrato, no pudieron ser recuperadas. Por otro lado, considerando el procedimiento de organogénesis, es de notar que los controles positivos y negativos mostraron los resultados esperados, es decir, fue posible obtener plántulas y luego plantas enraizadas en sustrato para el control positivo, correspondiente a cotiledones de tomate sin transformar incubados en los medios con las correspondientes hormonas sin presencia de antibiótico de selección, y por otro lado, los cotiledones sin transformar que fueron cultivados en medio con higromicina a la concentración

indicada previamente para la selección de individuos transgénicos no sobrevivieron a los cultivos, mostrando que efectivamente la presencia del antibiótico generó la muerte de cotiledones no transgénicos utilizados como control, resultado esperable considerando que la utilización y la efectividad de este agente de selección ya ha sido previamente reportada no solo para tomate (Chaudhry y Rashid, 2010), sino también para la selección de plantas transgénicas de diversos cultivos obtenidos tanto por embriogénesis como por organogénesis somática (Zuraida y cols., 2013).

Es necesario indicar que si bien fue posible regenerar plantas producto de la organogénesis hasta etapa adulta, sólo se obtuvieron líneas transgénicas para 35S y ninguna con la construcción PG::Ac-mCS. Todas las plántulas obtenidas fueron analizadas mediante PCR para amplificar un fragmento de *LAT52* (Figura 14B y D) como un control de la integridad del ADNg., determinando que el ADN extraído de cada muestra podía ser utilizado como templado para el análisis de la presencia de *HPT* (mediante PCR). Las líneas TG1, TG2, TG3, TG4 (Figura 14A) y 7 (Figura 14C), muestran claramente un amplicón con un tamaño similar al esperado para el fragmento de *HPT* comprobando su transgénesis. Desafortunadamente, no fue posible obtener plantas adultas de las 5 líneas transgénicas debido a la contaminación de los cultivos, durante las diferentes etapas del cultivo *in vitro*, principalmente en las etapas de elongación y enraizamiento. En la Figura S1 del Anexo I, es posible observar el análisis por PCR realizado a otras 40 líneas transformantes en etapa de elongación *in vitro*. De las líneas obtenidas posterior a la organogénesis somática (Figura 14C, líneas 6, 7, 15 y 16), sólo la línea 7, portadora de la construcción 35S::Ac-mCS, muestra un amplicón para el fragmento esperado de *HPT*. El bajo porcentaje de líneas transgénicas *in vitro* puede deberse a que la selección con el uso de antibiótico no resultó efectiva. Por otro lado, las plantas transgénicas obtenidas sufrieron la contaminación con

microorganismos, lo que no permitió llegar a tener plantas en sustrato totalmente desarrolladas, y por lo tanto, tampoco obtener flores ni frutos.

Los explantes transformados con la construcción 35S:*Ac-mCS*, mostraron un crecimiento más lento en los procesos de organogénesis, particularmente en el paso desde la inducción de callo a elongación respecto al control positivo lo que se condice con la presión de selección ejercida por el antibiótico. Como ejemplo, mientras plantas obtenidas desde el control positivo de organogénesis estaban siendo aclimatadas, los explantes transformados con *Ac-mCS* aún seguían en etapa de inducción y elongación, mostrando un claro retraso en la diferenciación celular desde callo y en el crecimiento. Tanto el retraso observado en el crecimiento, como el efecto observado y mencionado previamente (Figura 13), podrían también ser debido a la acción de la sobreexpresión del gen *Ac-mCS*, lo que se explica por lo menos para aquellos explantes sometidos al proceso de transformación a excepción de aquellos explantes transformados con el vector pGWB2::PG vacío (Figura S1). Aunque los autores del protocolo utilizado para realizar la transformación de tomate (Sun y cols., 2006), indican un tiempo de 3 meses para todo el proceso de transformación y organogénesis somática, sólo la individualización de plántulas obtenidas desde el control positivo tomó un tiempo cercano a 5 meses.

Como ha sido mencionado anteriormente, la encima CS forma parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el cual no ocurre de manera aislada en la mitocondria, sino que existe un flujo de los diferentes metabolitos (Figura 2), como malato y citrato, entre compartimentos celulares como mitocondrias y el citosol, así como en el glioxisoma, mostrando que existen varias alternativas de regulación para el mismo punto en el ciclo TCA en los compartimentos previamente mencionados. Por lo menos para el caso de tomate, se ha realizado la clonación y transformación de prácticamente todos los genes

que intervienen en el ciclo TCA, habiéndose caracterizado los efectos de la transformación tanto a nivel fenotípico como a nivel metabólico (Araújo y cols., 2012). Como antecedente particular para el caso de tomate y *Arabidopsis*, se sabe que la transformación realizada de plantas con las enzimas citrato sintasa no generan alteraciones evidentes a nivel fenotípico (ni su sobreexpresión, ni silenciamiento), particularmente en lo que se refiere al crecimiento, aunque sí existen algunas alteraciones a nivel metabólico, como un flujo reducido a través del ciclo TCA, un aumento en la tasa respiratoria e igualmente una inhibición de la asimilación de nitrato (Sienkiewicz-Porzucek y cols., 2008). Lo mencionado anteriormente, se contrapone con lo observado durante la realización de la organogénesis somática de los explantes de tomate transformados con *Ac-mCS*, aunque como fue mencionado, la contaminación por un posible mal manejo del cultivo *in vitro* fue tal vez el principal problema, sí es evidente que hubo problemas con el proceso de organogénesis. Los explantes de la transformación con *Ac-mCS* mostraron una considerable demora en la obtención de brotes y posteriormente en la elongación al compararlo con el proceso de organogénesis realizado con los explantes control.

Se ha descrito que la sobreexpresión de la enzima citrato sintasa otorga resistencia a ciertas condiciones abióticas, particularmente en relación a minerales y nutrientes como son altas concentraciones de aluminio (Miyasaka y cols., 1991; de la Fuente y cols., 1997) y deficiencia de fosfato (Koyama y cols., 2000; Krishnappa, 2011), mostrando en ambos casos que plantas transgénicas que sobreexpresan enzimas CS muestran una mayor resistencia a las condiciones de tratamiento correspondiente (niveles aumentados de aluminio o deficiencia de fosfato en el medio). Particularmente respecto al aluminio de la Fuente y cols., 1997 indican y concluyen que

la excreción de ácidos orgánicos resulta ser un mecanismo de tolerancia a aluminio en plantas superiores. Por su parte, Krishnappa, 2011 indica que la actividad citrato sintasa se encuentra aumentada a nivel de raíz en condiciones de deficiencia de fosfato, lo que igualmente fue observado en líneas transgénicas de zanahoria (*Daucus carota*) por Takita y cols., 1999, quienes observaron que en células capaces de crecer en fosfato insoluble (IPG, del inglés *Insoluble Phosphate Grower*), existía un aumento en la actividad mCS, y postulando igualmente la importancia de la excreción de ácidos orgánicos como un mecanismo de protección ante suelos con carencia de nutrientes.

Tomando como punto de partida lo anterior, es decir, que la sobreexpresión de citrato sintasa en plantas genera un aumento de ácidos orgánicos exudados y particularmente de citrato, es posible pensar que igualmente puede verse alterado el uso de fuentes de nitrógeno disponibles para ser usada. Volviendo a los explantes mismos, aunque no en todos los casos, en muchos sí era notoria una coloración menos verdosa que la habitual, así como más oscuros hablando comparativamente con explantes control. Lo anterior podría ser concordante con un fenotipo con una disponibilidad limitada de nitrógeno, correspondiente a cantidad de clorofila reducida y acumulación de antocianinas (Scheible y cols., 2004). Considerando que las principales formas inorgánicas de nitrógeno absorbidas por las plantas corresponden a nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+), y que la disponibilidad de nitrógeno puede verse alterada por variaciones en el pH (Sarasketa y cols., 2016), posibles modificaciones en el pH del medio por efecto de la excreción de ácidos orgánicos al medio sí podrían traducirse en una desregulación en la absorción de nitrógeno. Más aún, considerando que existe un nivel de toxicidad asociado a un contenido alto de amonio cuya presencia además se relaciona con un bajo pH en el medio (Sarasketa y cols., 2016), es muy posible que los problemas observados durante la organogénesis no resulten de la

transformación misma, o de efectos directos a nivel celular, sino por el contrario, que la explicación resulte ser una opción más sencilla, y que sea debido a alteraciones que impiden el ingreso apropiado de nutrientes necesarios para el crecimiento.

5 CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

En primer lugar, y a modo de conclusión, es posible centrarse en dos puntos principales como son, la localización subcelular y la obtención del vector pGWB2::PG.

- La proteína codificada por Ac-mCS, cuya localización subcelular mitocondrial fue primero predicha mediante herramientas bioinformáticas, posee localización mitocondrial corroborado mediante microscopía confocal, luego de la transformación transitoria en hojas de *N. tabacum*, lo cual hasta el momento representa un nuevo conocimiento que contribuye a la caracterización de la enzima en estudio.
- Se generó un vector de destinación, pGWB2::PG, portador de un fragmento del promotor de poligalacturonasa de tomate, capaz de dirigir la expresión génica específicamente en frutos durante la maduración, que será de utilidad para futuros estudios de expresión heteróloga de proteínas durante la maduración frutos.
- Es necesario realizar nuevos eventos de transformación para poder continuar con las actividades en relación al estudio de la enzima citrato sintasa mitocondrial de chirimoya, de modo de obtener plantas transgénicas que permitan realizar análisis fenotípicos y transcriptómicos que brinden mayor conocimiento respecto a la enzima Ac-mCS y por otro lado, junto a la realización de nuevos ensayos que permitan ayudar a determinar la causa de la falta de crecimiento de las plántulas portadoras de Ac-mCS.

6 ANEXOS

6.1 Anexo I

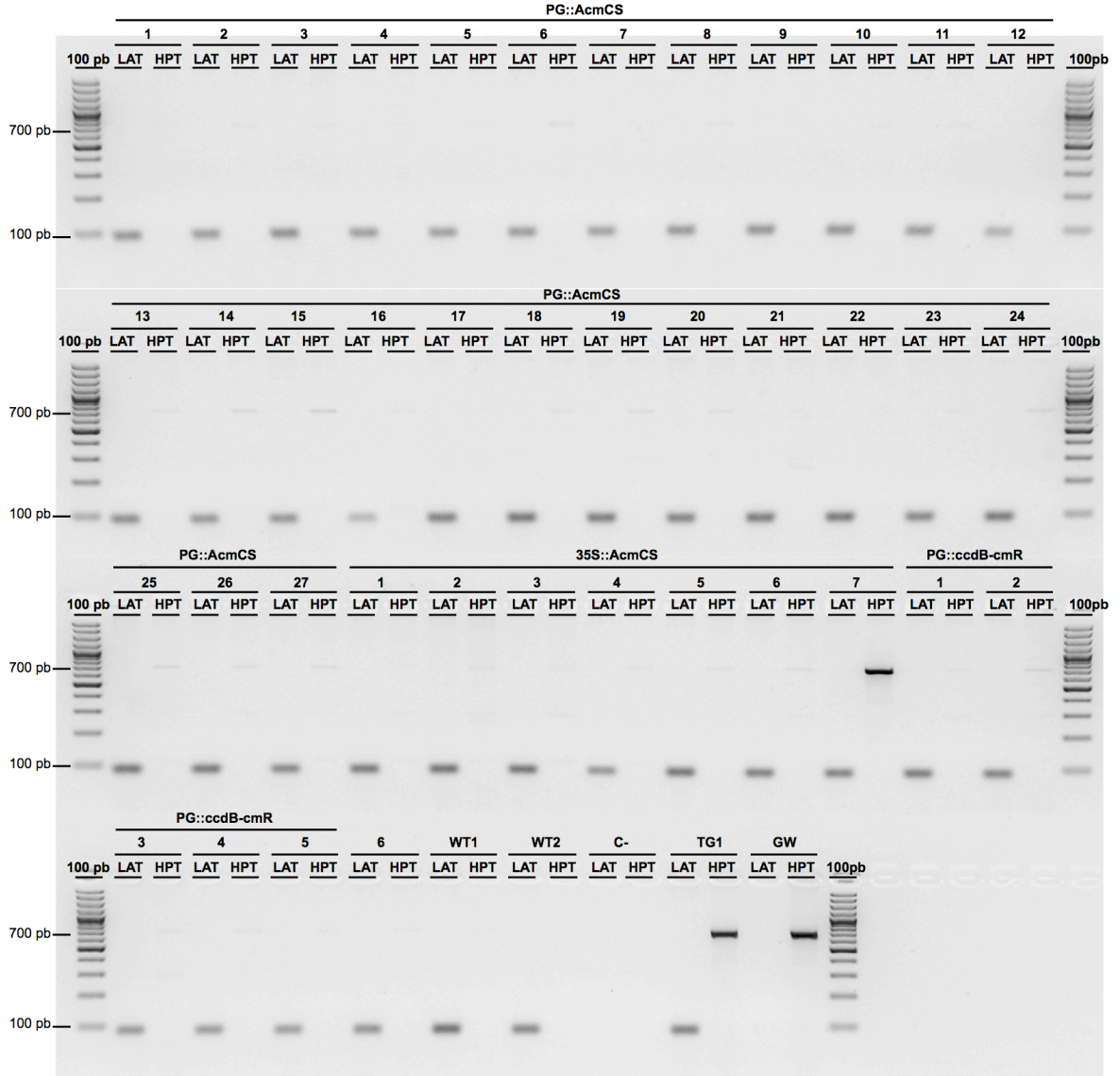


Figura S1. Análisis molecular de plántulas de *S. lycopersicum* transformantes. Se muestra el análisis de PCR de las plántulas de tomate transformantes para el gen *Ac-mCS*. Se analizó cada ADNg extraído desde hojas de las plantas de tomate mediante PCR para amplificar un fragmento del gen de Higromicina y un fragmento del gen *LAT52* (presente en el genoma de tomate). Los carriles agrupados poseen el nombre de la construcción con la cual fueron sometidas a transformación y el número identificador respectivo (sobre cada carril) y bajo cada número, se indica el producto de la reacción respectiva (*LAT* y *HPT*). WT1 y WT2 corresponden al control usando agua como templado, TG1, control usando ADNg de la planta 1 transformada previamente con el vector pGWB2::*Ac-mCS* por PCR. 35S::*Ac-mCS* y PG::*Ac-mCS*: transformación con las construcciones de promotor y gen respectivo, TG1 a 4 y los números corresponden a los identificadores de las plantas para cada caso. (GW) control positivo, usando 2 ng de vector pGWB2::*Ac-mCS*, (-) control negativo usando agua como templado, WT1 y WT2, corresponden a ADNg de tomate (var. Micro-Tom) silvestre.(100pb): marcador de peso molecular O'geneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoScientific, EE.UU.).

7 BIBLIOGRAFÍA

- Allen GC, Flores-Vergara M a, Krasnyanski S, Kumar S, Thompson WF** (2006) A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nat Protoc* **1**: 2320–2325
- Anoop VM, Basu U, McCammon MT, McAlister-Henn L, Taylor GJ** (2003) Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol* **132**: 2205–2217
- Araújo WL, Nunes-Nesi A, Nikoloski Z, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2012) Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant Cell Environ* **35**: 1–21
- Bicas JL, Molina G, Dionísio AP, Barros FFC, Wagner R, Marística MR, Pastore GM** (2011) Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. *Food Res Int* **44**: 1843–1855
- Bird CR, Smith CJS, Ray JA, Moureau P, Bevan MW, Bird AS, Hughes S, Morris PC, Grierson D, Schuch W** (1988) The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **11**: 651–662
- Chaudhry Z, Rashid H** (2010) An improved Agrobacterium mediated transformation in tomato using hygromycin as a selective agent. *African J Biotechnol* **9**: 1882–1891
- Claros MG, Vincens P** (1996) Computational Method to Predict Mitochondrially Imported Proteins and their Targeting Sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779–786
- Deng W, Luo K, Li Z, Yang Y, Hu N, Wu Y** (2009) Overexpression of Citrus junos mitochondrial citrate synthase gene in *Nicotiana benthamiana* confers aluminum tolerance. *Planta* **230**: 355–365
- Dutt M, Dhekney SA, Soriano L, Kandel R, Grosser JW** (2014) Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Hortic Res* **1**: 1–17
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* **45**: 616–629
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H** (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**: 953–971
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, Von Heijne G** (2000) Predicting subcellular

- localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**: 1005–1016
- Etienne A, Génard M, Lobit P, Mbéguié-A-Mbéguié D, Bugaud C** (2013) What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *J Exp Bot* **64**: 1451–1469
- Fernandez AI, Viron N, Alhagdow M, Karimi M, Jones M, Amsellem Z, Sicard A, Czerednik A, Angenent G, Grierson D, y cols.** (2009) Flexible Tools for Gene Expression and Silencing in Tomato. *Plant Physiol* **151**: 1729–1740
- Fukasawa Y, Tsuji J, Fu S-C, Tomii K, Horton P, Imai K** (2015) MitoFates: Improved Prediction of Mitochondrial Targeting Sequences and Their Cleavage Sites. *Mol Cell Proteomics* **14**: 1113–1126
- Giovannoni J** (2001) Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 725–749
- González-Agüero M, Tejerina Pardo L, Zamudio MS, Contreras C, Undurraga P, Defilippi BG** (2016) The Unusual Acid-Accumulating Behavior during Ripening of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill .) is Linked to Changes in Transcription and Enzyme Activity Related to Citric and Malic Acid Metabolism. *Molecules*. doi: 10.3390/molecules21050398
- Han D, Wang Y, Zhang L, Ma L, Zhang X, Xu X, Han Z** (2012) Isolation and functional characterization of MxCS1: a gene encoding a citrate synthase in *Malus xiaojinensis*. **56**: 50–56
- Jaipargas E-A, Barton KA, Mathur N, Mathur J** (2015) Mitochondrial pleomorphy in plant cells is driven by contiguous ER dynamics. *Front Plant Sci* **6**: 1–14
- Koyama H, Kawamura A, Kihara T, Hara T, Takita E, Shibata D** (2000) Overexpression of Mitochondrial Citrate Synthase in *Arabidopsis thaliana* Improved Growth on a Phosphorus-Limited Soil. *Plant Cell Physiol* **41**: 1030–7
- Koyama H, Takita E, Kawamura A, Hara T, Shibata D** (1999) Over Expression of Mitochondrial Citrate Synthase Gene Improves the Growth of Carrot Cells in Al-Phosphate Medium. **40**: 482–488
- Krishnappa R** (2011) Overexpression of gene encoding Citrate Synthase in Pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp) to enhance Phosphorus uptake under Phosphorus deficient conditions. University of Agricultural Sciences, Bengaluru
- de la Fuente JM, Ramirez-rodriguez V, Cabrera-ponce JL, Herrera-estrellat L**

- (1997) Aluminum Tolerance in Transgenic Plants by Alteration of Citrate Synthesis. **276**: 1–3
- Lau JM, Cooper NG, Robinson DL, Korban SS** (2009) Sequence and in silico characterization of the tomato polygalacturonase (PG) promoter and terminator regions. *Plant Mol Biol Report* **27**: 250–256
- Lin Q, Li S, Dong W, Feng C, Yin X, Xu C, Sun C, Chen K** (2015) Involvement of CitCHX and CitDIC in developmental-related and postharvest-hot-air driven citrate degradation in citrus fruits. *PLoS One* **10**: 1–16
- Logan DC** (2006) Plant mitochondrial dynamics. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1763**: 430–441
- López-Bucio J, De la Vega OM, Guevara-García A, Herrera-Estrella L** (2000) Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat Biotechnol* **18**: 450–453
- Manríquez DA, Muñoz-Robredo P, Gudenschwager O, Robledo P, Defilippi BG** (2014) Development of flavor-related metabolites in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit and their relationship with ripening physiology. *Postharvest Biol Technol* **94**: 58–65
- MINAGRI** (2016) Minagri anuncia importante paso que abre nuevas oportunidades para exportación de limones y chirimoyas a EE.UU. <http://www.minagri.gob.cl/minagri-anuncia-importante-paso-que-abrenuevas-oportunidades-para-exportacion-de-limones-y-chirimoya/>
- Miyasaka SC, Buta JG, Howell RK, Foy CD** (1991) Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans root exudation of citric acid. *Plant Physiol* **96**: 737–743
- Montgomery J, Pollard V, Deikman J, Fischer RL** (1993) Positive and negative regulatory regions control the spatial distribution of polygalacturonase transcription in tomato fruit pericarp. *Plant Cell* **5**: 1049–1062
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**: 34–41
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* **51**: 1126–1136
- ODEPA** (2014) Superficie de Frutales por Región. <http://www.odepa.cl/superficie-de->

frutales-por-region-2/

- Palma T, Aguilera JM, Stanley DW** (1993) A review of postharvest events in cherimoya. *Postharvest Biol Technol* **2**: 187–208
- Perfectti F, Pascual L** (2005) Geographic variation for isozymes in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Genet Resour Crop Evol* **51**: 837–843
- Sadka A, Dahan E, Or E, Roose ML, Marsh KB, Cohen L** (2001) Comparative analysis of mitochondrial citrate synthase gene structure, transcript level and enzymatic activity in acidless and acid-containing Citrus varieties. *Aust J Plant Physiol* **28**: 383–390
- Sarasketa A, González-Moro MB, González-Murua C, Marino D** (2016) Nitrogen Source and External Medium pH Interaction Differentially Affects Root and Shoot Metabolism in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **7**: 1–12
- Scheible W-R, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M** (2004) Genome-Wide Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism, Protein Synthesis, Cellular Growth Processes, and the Regulatory Infrastructure of Arabidopsis in Response to Nitrogen. *Plant Physiol* **136**: 2483–2499
- Seguí-Simarro JM, Coronado MJ, Staehelin LA** (2008) The Mitochondrial Cycle of Arabidopsis Shoot Apical Meristem and Leaf Primordium Meristematic Cells Is Defined by a Perinuclear Tentaculate/Cage-Like Mitochondrion. *Plant Physiol* **148**: 1380–1393
- Sienkiewicz-Porzucek A, Nunes-Nesi A, Sulpice R, Lisec J, Centeno DC, Carillo P, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR** (2008) Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. *Plant Physiol* **147**: 115–127
- Sparkes IA, Runions J, Kearns A, Hawes C** (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* **1**: 2019–2025
- Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H** (2006) A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol* **47**: 426–431
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010) Not just a

- circle: Flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci* **15**: 462–470
- Takita E, Koyama H, Hara T** (1999) Organic Acid Metabolism in Aluminum-Phosphate Utilizing Cells of Carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Physiol* **40**: 489–495
- Taylor JE, Tucker GA, Media SB** (1993) Biochemistry of Fruit Ripening. doi: 10.1007/978-94-011-1584-1
- Thermo Fisher Scientific Inc** (2011) T042 Technical bulletin: Assessment of nucleic acid purity. Wilmington, Delaware USA
- Wise AA, Liu Z, Binns AN** (2006) Three Methods for the Introduction of Foreign DNA into *Agrobacterium*. *En K Wang*, ed, *Agrobacterium Protoc. Methods Mol. Biol.*, Second Edi. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 43–53
- Yang L, Zhang H, Guo J, Pan L, Zhang D** (2008) International Collaborative Study of the Endogenous Reference Gene LAT 52 Used for Qualitative and Quantitative Analyses of Genetically Modified Tomato. 3438–3443
- Zuraida AR, Rahiniza K, Zulkifli AS, Alizah Z, Zamri Z, Aziz A** (2013) Hygromycin as selective marker in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of indica rice MR 219. *J Trop Agric food Sci* **41**: 71–79