

UCH-FC
Biotecnología
06
C.1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



“TRANSFORMACIÓN DE ARABIDOPSIS THALIANA CON DIFERENTES VECTORES BINARIOS PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DE ALBUMINA SFA8 DE GIRASOL”

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

JOSE ANTONIO RAMIRO O'BRIEN OPAZO

Dr. Pablo Valenzuela Valdés
Director Seminario de Título

Pablo Valenzuela

Dr. Vivian Wilhelm Bavestrello
Co-Directora

Vivian Wilhelm

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Michael Handford
Presidente Comisión

Michael Handford

Dra. Claudia Stange
Correctora

Claudia Stange



Santiago de Chile, junio de 2007



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**TRANSFORMACIÓN DE *ARABIDOPSIS THALIANA* CON DIFERENTES VECTORES
BINARIOS PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DE ALBÚMINA SFA8 DE GIRASOL**

Memoria de Título
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

José Antonio Ramiro O'Brien Opazo

Director de Memoria de Título: Dr. Pablo D. T. Valenzuela Valdés
Co-Director de Memoria de Título: Dra. Vivian Wilhelm Bavestrello
Profesor patrocinante: Dr. Mario Rosemblatt Silber

Fundación Ciencia Para la Vida

Junio, 2007
Santiago - Chile



Hace 7 años atrás empezó esta etapa que ahora está llegando a su fin, cuando entré a Bachillerato. Ahí supe por primera vez de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, donde me cambié a estudiar, para terminar no menos loco que mis compañeros. Como olvidar esas interminables noches de estudio y carretes varios, donde se pueden rescatar fechas memorables como Bariloche, congresos, los esperados cumpleaños o los clásicos partidos de fútbol de Pitilla y Pianteam. Durante este periodo, cuando había terminado los ramos, inesperadamente conocí a una mujer que siempre estuvo ahí pero nunca me había detenido a mirarla, Fabiola, quien sigue a mi lado hasta el día de hoy. Así fue como después llegué a la Fundación para realizar mi memoria de título, donde luego de una tímida llegada, logré llegar a conocer a muchos personajes, ahora amigos.



*"La inteligencia no consiste sólo en el conocimiento,
sino también en la destreza para aplicar
los conocimientos a la práctica"*

Aristóteles



A mis padres...

Agradecimientos

Antes que nada, quiero agradecer a los doctores Pablo Valenzuela y Mario Roseblatt por haberme recibido en la Fundación Ciencias Para la Vida para poder desarrollar esta memoria de título.

También quiero agradecer a la Dra. Vivian Wilhelm por haber sido un pilar fundamental en este trabajo, por su apoyo y estrictez, y por toda su enseñanza que me motivó aún más a seguir el camino de la ciencia. A Consuelo Bruno, por toda su ayuda y consejos, que fueron esenciales en este trabajo.

A toda la gente de la Fundación, en particular a Sebastián, Francisco, Marisol, Nicole, Concho, Carola y Eve; por toda su ayuda, apoyo y risas, y por crear un ambiente grato de trabajo y más que compañeros ser amigos.

No puedo dejar de mencionar a todos mis amigos, de la Universidad y del colegio, en especial a Pilar, Carola, Maca, Paula, Felipe y a todos los que han estado presentes siempre, en esas interminables horas de estudio, por su confianza, amistad y por todos los buenos momentos.

A mi familia, en especial a mis padres, por haberme apoyado siempre, ya que sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible.

Finalmente, quisiera agradecer a Fabiola, por su incondicional amor, cariño y comprensión, que en todo momento llevo conmigo.



Índice



Agradecimientos.....	III
Índice	IV
Índice de figuras y tablas	VIII
Lista de abreviaturas.....	X
Resumen.....	XII
Abstract.....	XIV
1. Introducción.....	1
1.1 Cultivo de salmónidos.....	1
1.2 Fuentes de proteínas para alimentación.....	1
1.3 Importancia de la proteína en los peces.....	2
1.4 Secuencias codificantes y no codificantes para aumentar el valor nutritivo en semillas.....	4
1.6 Objetivo general.....	6
1.7 Objetivos específicos.....	6
2. Materiales y métodos	8
2.1 Reactivos y enzimas.....	8
2.2 Plantas utilizadas.....	8
2.3 Cepas bacterianas.....	8
2.4 Medios de cultivo.....	9
2.5 Antibióticos	9
2.6 Mezcla de tierra utilizada para el cultivo de plantas.....	10

2.7 Esterilización de semillas	10
2.8 Cultivo de plantas	10
2.9 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante inmersión floral	11
2.10 Selección de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas.....	11
2.11 Preparación de explantes de lupino a partir de eje embrionario.....	12
2.12 Transformación de explantes de lupino.....	12
2.14 Vectores de clonamiento	13
2.15 Oligonucleotidos.....	14
2.16 Condiciones de crecimiento de cultivos bacterianos	15
2.17 Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> Novablue y BL21(DE3)	16
2.18 Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 y LBA4404.....	16
2.19 Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> Novablue y BL21(DE3).....	16
2.20 Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 y LBA4404.....	17
2.21 Purificación de ADN genómico de hoja de poroto, maravilla y arvejas.....	17
2.22 Purificación de ARN de semillas de plantas de <i>A. thaliana</i> y girasol.....	18
2.23 Purificación de ADN plasmidial.....	19
2.24 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
2.25 RT-PCR.....	20
2.26 Purificación de productos de PCR.....	20



2.27	Análisis de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa.....	20
2.28	Purificación de fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa.....	21
2.29	Digestión de ADN mediante endonucleasas de restricción.....	21
2.30	Desfosforilación de ADN.....	21
2.31	Extracción fenol-cloroformo	22
2.32	Ligación de fragmentos de ADN.....	22
2.33	Secuenciación y análisis de secuencias.....	23
2.34	Ensayo de reacción de GUS	23
2.35	Inducción de la síntesis de proteínas.....	24
2.36	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes	24
2.37	Purificación de la proteína recombinante utilizando la resina de afinidad níquel- agarosa	25
2.38	Purificación de la proteína recombinante mediante electroelución.....	26
2.39	Extracción de proteína a partir de semillas de girasol y de <i>A. thaliana</i>	27
2.40	Generación del anticuerpo policlonal contra albúmina de girasol SFA8.....	27
2.41	Análisis de la respuesta inmune mediante ELISA.....	28
2.42	Análisis de la proteína SFA8 mediante <i>western blot</i>	29
3.	Resultados	31
3.1	Aislamiento de secuencias promotoras, codificantes y terminadoras.....	31
3.2	Construcción de vectores binarios con las secuencias promotoras, codificantes y terminadoras aisladas.....	34



3.3 Transformación de <i>A. thaliana</i> mediante <i>A. tumefaciens</i> con los diferentes vectores binarios construidos	36
3.4 Generación de anticuerpos policlonales contra la albúmina de girasol SFA8	40
3.5 Análisis de las proteínas de semillas de plantas transgénicas mediante <i>western</i> <i>blot</i>	42
3.6 Estudios de regeneración y transformación de explantes de lupino	47
4. Discusión.....	51
4.1 Construcciones binarias.....	51
4.2 Transformación de <i>A. thaliana</i>	54
4.3 Expresión de SFA8 en las líneas transgénicas.....	55
4.4 Transformación y regeneración de explantes de lupino.....	60
5. Conclusiones.....	63
6. Proyecciones y trabajo futuro.....	64
7. Referencias	65
Anexo 1	70
Anexo 2.....	71
Anexo 3.....	72
Anexo 4.....	73
Anexo 5.....	74
Anexo 6.....	74
Anexo 7.....	75



Índice de figuras y tablas

Figura 1. Esquema de los vectores pGEM-T, pCAMBIA 1305.1 y pET-28a.	14
Figura 2. Productos de PCR purificados correspondientes a las secuencias promotoras, codificantes y terminadoras aisladas.	32
Figura 3. Digestión de secuencias clonadas en vector de clonamiento pGEM-T con enzimas de restricción.	33
Figura 4. Diseño de los vectores pVSVA8, pVSKVA8, pFSFA8, pFSKFA8, pFSAA8 y pFSKAA8	36
Figura 5. Análisis por electroforesis en geles y PCR de los vectores construídos.	37
Figura 6. Selección de plantas de <i>A. thaliana</i> provenientes de semillas de plantas transformadas con el vector pFSKFA8.	38
Figura 7. Análisis por PCR de la presencia del gene <i>sfa8</i> en ADN de hojas de diferentes líneas de plantas transgénicas.	39
Figura 8. Confirmación de clonamiento de la albúmina de girasol <i>sfa8</i> en el vector pET- 28a y expresión de la proteína recombinante.	41
Figura 9. Análisis por <i>western blot</i> contra SFA8 de los extractos de proteína soluble de girasol y <i>A. thaliana</i>	42
Figura 10. Análisis mediante electroforesis en gel PAGE-SDS de los extractos solubles de proteína de las líneas de plantas transgénicas generadas.	44
Figura 11. Análisis por <i>western blot</i> contra SFA8 de los extractos de proteína de las líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	45



Figura 12. Intensidades relativas de las bandas correspondientes a la proteína SFA8 del <i>western blot</i> de las diferentes líneas transgénicas.....	47
Figura 13. Etapas de la regeneración de explantes de lupino.	48
Figura 14. Plántulas de lupino transformadas con gen de resistencia a higromicina luego de 5 semanas en medio de germinación.	49
Figura 15. Análisis por PCR de los callos de las plántulas transformadas 1 y 2 y de una planta silvestre sin transformar.	50
Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados.....	15
Tabla 2. Eficiencia de transformación de <i>A. thaliana</i>	40



Lista de abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
Amp	Ampicilina
ARN	Acido ribonucleico
BAP	Bencilaminopurina
BrEt	Bromuro de etidio
DO	Densidad óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acido etilen-diaminotetraacético
Gen	Gentamicina
g	Fuerza de gravedad
H ₂ O	Agua
h	Hora
Hig	Higromicina
IBA	Ácido indol butírico
IPTG	Isopropil tio-β-D-galactósido
Kan	Kanamicina
kb	Kilobases
mL	Mililitro

L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
mM	Milimolar
MS	Medio Murashige-Skoog
NAA	Ácido naftalenacético
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rif	Rifampicina
s	Segundos
SFA8	Albúmina de girasol 8
TAE	Amortiguador Tris-acetato-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Temperatura de hibridización
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad
µg	Microgramo
µL	Microlitro
UV	Ultravioleta
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

Resumen

El elevado precio que ha alcanzado la harina de pescado, debido a la gran demanda, ha llevado a la industria salmonera a considerar otras fuentes de proteínas para la alimentación de salmones. El candidato más atractivo es la semilla de lupino debido a su alto contenido proteico. Pero al igual que otras legumbres, esta semilla posee un bajo contenido de metionina, aminoácido esencial para el desarrollo de salmones. Por esto, se propone aumentar el contenido de metionina de las semillas de lupino, introduciendo a éstas mediante transformación, un gen que codifique para una proteína rica en contenido de metionina.

Se aisló el gen de albúmina de girasol *sfa8*, que codifica para una proteína que contiene un alto contenido de metionina, con y sin la secuencia de retención en retículo (KDEL). Para su expresión se aislaron secuencias promotoras y terminadoras de los genes de faseolina y vicilina, y la secuencia terminadora del gen de arceolina. Con estas secuencias reguladoras se construyeron seis diferentes vectores binarios con los cuales se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* como planta modelo para seleccionar la construcción que produzca una mayor expresión de la proteína exógena.

Posteriormente, *sfa8* fue expresado en *E. coli* y con la proteína purificada se generaron anticuerpos policlonales en conejo, que demostraron reconocer en forma eficiente tanto la proteína recombinante así como la proteína nativa en semillas de girasol. Con estos anticuerpos se evaluó la acumulación de la proteína SFA8 en las semillas de las plantas transgénicas mediante *western blot*. Los resultados mostraron que la mayor expresión se obtiene con la construcción que posee la secuencia KDEL y el promotor de faseolina y

terminador de arceolina. Le siguen en nivel de expresión las líneas que contenían la construcción de *sfa8* sin la secuencia KDEL bajo el promotor y terminador de vicilina. Como una aproximación preliminar a la transformación en lupino, se transformaron explantes de eje embrionario de lupino mediante *Agrobacterium tumefaciens*, de los cuales 2 callos fueron resistentes al antibiótico de selección. Se confirmó por PCR que sólo uno de estos callos provenía de los explantes resistentes y poseía el gen reportero, sin embargo no se logró regenerar una plántula a partir de éste. Para abordar este problema, se intentó regenerar plántulas de lupino silvestres preparadas a partir de explantes, pero no se logró desarrollo de raíz.

Abstract

The high price of fishmeal and its increasing demand have encouraged the salmon industry to search for other protein sources for fish nutrition. The most attractive candidate is lupin seeds, due to their high protein content. However, like other legume seeds, it has a low methionine content, an essential aminoacid for salmon development. Therefore, we propose to increase the level of methionine in lupin seeds by introducing an exogenous gene coding for a protein rich in methionine.

We isolated the gene of the sunflower albumin *sfa8*, that codes for a protein rich in methionine. The coding segment was cloned alone or in the presence of the reticulum targeting signal (KDEL). To express these sequences, we also isolated the promotor and terminator sequences from the faseolin and vicilin genes as well as the terminator sequence from the arceolin gene. Six different binary constructions were built with these regulatory sequences, and used to transform *Arabidopsis thaliana* plants, in order to select the most efficient construction for the expression of the heterologous protein.

The recombinant protein SFA8 was expressed in *E. coli* and polyclonal antibodies were produced in rabbits against the purified protein. The antibodies recognized the native protein present in sunflower seeds as well as the recombinant protein. The evaluation by *western blot* of protein extracts obtained from transgenic plant seeds indicates that the highest level of expression was obtained with the construction of *sfa8* fused to the KDEL coding segment under the control of the phaseolin promotor and arceolin terminator sequences. The second highest expression was detected in transgenic lines

containing the *sfa8* sequence without the KDEL coding segment under the regulation of the vicilin gene promotor and terminator sequences.

As a preliminary approximation to transformation of lupin, we transformed lupin explants from seeds embryo axes with *Agrobacterium tumefaciens*, and obtained two explants resistant to higromycin, the antibiotic included in the selection medium. Analysis by PCR indicated that only one of these explants had the reporter gene. However, the explants did not regenerate into plants. In order to approach this problem, we tried different protocols to regenerate lupin embryo axes, but we were unsuccessful in the development of roots from explants.

1. Introducción

1.1 Cultivo de salmónidos

En los últimos 10 años, la industria acuícola ha desarrollado un espectacular crecimiento, lo que ha posicionado a Chile entre los 10 países más importantes de la acuicultura a nivel mundial con una producción de aproximadamente 500.000 toneladas durante el 2006, y exportando 387.141 toneladas, solamente superado por Noruega con 619 mil toneladas. De entre las especies de salmónidos que se cultivan en Chile, las más importantes corresponden al salmón del Atlántico que representó el 55% de las exportaciones con 213.298 toneladas, la sigue la trucha arcoiris con un 24% de los envíos correspondiente a 93.222 toneladas y finalmente el salmón coho con un 20% de los envíos, equivalente a 79.350 toneladas (Aqua, 2007).

El fuerte crecimiento de esta industria en los últimos años ha transformado a las salmoneras en una de las industrias más importantes para el desarrollo económico del país, posicionándose como uno de los principales sectores exportadores. Esto se puede ver reflejado en las exportaciones que en el año 2006 sumaron US\$ 2.207 millones, lo que implica un crecimiento de un 28% con respecto al 2005 (Prochile, 2007).

1.2 Fuentes de proteínas para alimentación

El fuerte desarrollo de las industrias salmoneras, significa también una mayor demanda de las materias primas para la alimentación de los peces, que requieren dietas complejas y que poseen un elevado costo, ya que la alimentación representa entre un 40% a 50% de los costos operacionales en el cultivo de especies salmonídeas (Serrano, 2004). Este elevado valor se debe a que la harina de pescado es la principal materia prima y se

utiliza como fuente de aminoácidos esenciales y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Debido a su alto contenido proteico y de ácidos grasos, ésta también es utilizada en las dietas de aves, cerdos, ovejas y vacunos (Serrano, 2004). Por estas razones, en los últimos años ha habido un creciente aumento en la demanda de harina de pescado, y sus niveles de producción a nivel mundial no han registrado el mismo aumento que la industria salmonera, por el contrario, la producción de ésta ha registrado una disminución (Serrano, 2004).

En este escenario, a mediano plazo se generará una escasez de harina de pescado, lo que aumentará su demanda y su precio. Debido a esto, en los últimos años ha habido una tendencia a buscar fuentes alternativas de proteínas y ácidos grasos con características similares a la harina de pescado, tanto en su composición de aminoácidos esenciales y ácidos grasos; y que además tenga un precio competitivo en el mercado.

1.3 Importancia de la proteína en los peces

El requerimiento proteico en los peces es considerablemente más alto que el de los mamíferos, llegando a ser hasta 4 veces mayor (Barletta, 2002). Actualmente, en la industria de salmónidos se utiliza 1,9 kg de peces en forma de harina de pescado para producir 1 kg de pez cultivado (Naylor y col., 2000). Este elevado valor se debe a la ineficiencia de los peces en la conversión de carbohidratos a energía, debiendo utilizar también las proteínas como fuente energética.

Debido a esto y con el fin de optimizar su uso, se han estado invirtiendo grandes recursos con el fin de encontrar fuentes proteicas renovables, ya que considerando el

fuerte y continuo crecimiento de la industria de salmónidos, se prevé una escasez de harina de pescado a mediano y largo plazo.

Para esto, se han probado fuentes proteicas de origen animal y vegetal, todas ellas más baratas que la harina de pescado, siendo la más exitosa la harina de origen vegetal, ya que a diferencia de la fuente proteica de origen animal, ésta es un fuente renovable y de menor costo, lo que la hace más atractiva para la industria acuícola. De entre las fuentes de origen vegetal, las leguminosas de grano han sido extensamente probadas, siendo la harina de lupino la que ha obtenido mayor éxito, debido a que al contrario de la soya, no es de consumo humano, lo que disminuye su precio, y hoy en día ya está siendo utilizada para la alimentación en peces. En cuanto al crecimiento y digestibilidad en peces, se ha logrado un reemplazo de hasta un 40% en la dieta sin observar diferencias significativas en el crecimiento (Naylor y col., 2000; Farhangi, 2001; Glencross y col., 2003; Ogunji, 2004; Serrano, 2004). A pesar de su elevado contenido proteico, el lupino, al igual que la soya y otras leguminosas, es deficiente en metionina. Jackson y col. calcularon los niveles de aminoácidos esenciales necesarios en la dieta del pez *Oreochromis mossambicus* y encontraron que la metionina era el limitante cuando se alimentaban con cacahuate, soya, raps y algodón. Además, demostraron que cuando su porcentaje en la dieta cae bajo 0,65% se observa una fuerte baja en el crecimiento (Jackson y col., 1982). También en experimentos realizados por Glencross y col. (2003) se demostró que el crecimiento en los peces se ve afectado por la cantidad de metionina presente en la dieta, encontrándose también una relación directa entre ésta y el crecimiento diario. Para solucionar este problema, una de las alternativas es la transformación de estas leguminosas, como por ejemplo el lupino. Si bien, ésta es una planta recalcitrante, está

descrito que es posible de transformar mediante *Agrobacterium tumefaciens* *Lupinus angustifolius* (Molvig y col., 1997; Pigeaire y col., 1997) y *Lupinus luteus* (Li y col., 2000); y también la transformación de *Lupinus albus* mediante *Agrobacterium rhizogenes* (Uhde-Stone y col., 2005). Pero debido a la dificultad que presenta la transformación de estas especies, en este trabajo se utilizó *A. thaliana* como planta modelo para estudiar la expresión del gen de interés bajo diferentes promotores y secuencias terminadoras.

1.4 Secuencias codificantes y no codificantes para aumentar el valor nutritivo en semillas

Numerosos trabajos reportan el incremento del valor nutritivo de semillas de variadas especies con fines alimenticios (van der Klei y col., 1993; Tabe y col., 1995; Lacorte y col., 1997; Molvig y col., 1997; Muntz y col., 1998; Lee y col., 2003), siendo sólo uno de estos, con lupino (Molvig y col., 1997), donde solo se logra una acumulación de la proteína recombinante con alto contenido de metionina de un 5% de la proteína total. Esto no es suficiente para suplir el déficit de este aminoácido esencial (Glencross y col., 2003), ya que si bien esta proteína representa un 5% de la proteína total, el porcentaje de metionina en la semilla no alcanzaría a llegar al 0,65% necesario para evitar una baja en el crecimiento.

En todos estos trabajos donde se incrementó el valor nutritivo de semillas, se utilizó proteínas de albúmina de variadas especies, como *Helianthus annuus*, *Arabidopsis thaliana* y *Sesamum indicum* que son ricas en aminoácidos sulfurados. En este trabajo nos enfocaremos en el uso del gen de la albúmina de girasol *sfa8* (nº de acceso X56686

de la base de datos NCBI), cuya proteína contiene 16 metioninas y 8 cisteínas, y además, no se encuentra bajo ninguna patente, a diferencia de otras.

Molvig y col., (1997) utilizaron el gen de la albúmina de girasol *sfa8* para aumentar el contenido de metionina en lupino, para lo cual utilizaron el promotor y la secuencia terminadora 3'UTR del gen de vicilina de arveja, específico de semilla (nº de acceso AJ276876 y X14076 de la base de datos NCBI, respectivamente), logrando duplicar el porcentaje de metionina en la semilla. Sin embargo, la alimentación de los peces con esta nueva fuente proteica no alcanzó los niveles de crecimiento obtenidos con la harina de pescado (Glencross y col., 2003).

Por otra parte, van der Geest y col. (1994) caracterizaron el promotor y la secuencia terminadora 3'UTR del gen de faseolina de poroto, específico de semilla en plantas de tabaco, utilizando el gen reportero *gus* (van der Geest y col., 1994; van der Geest & Hall, 1996; van der Geest & Hall, 1997), encontrando en el promotor múltiples motivos similares a secuencias de regiones de unión a matriz (MAR) de *Drosophila* y ratón. Estos se encontrarían en un fragmento de 673 pb, que incluye una región de 55 pb que se ha demostrado que funciona como un "enhancer", al igual que una secuencia de la región de unión a matriz, el sitio de unión de topoisomerasa II y un motivo de desenrollamiento que también se encuentran en la secuencia. Geert De Jaeger y col. (2002) utilizaron las secuencias reguladoras del gen de faseolina (nº de acceso J01263 de la base de datos NCBI) y la secuencia terminadora 3'UTR del gen de arceolina (nº de acceso M68913 de la base de datos NCBI) en *A. thaliana*, logrando niveles de acumulación del fragmento variable de un anticuerpo superiores al 36%. Estos elevados niveles se deben también a la utilización de la secuencia de retención de retículo KDEL,

que si bien no tiene ningún efecto sobre la estabilidad del ARN mensajero, lo tiene a nivel de proteína, al ser destinadas al retículo endoplásmico (Schouten y col., 1996).

1.6 Objetivo general

- Transformar *A. thaliana* con un gen de una proteína vegetal rica en metionina, regulado por diferentes promotores y secuencias terminadoras específicos de semilla con el fin de comparar los niveles de expresión producidos por éstos, y seleccionar aquella construcción que produzca la mayor acumulación de proteína exógena para utilizarla posteriormente en la transformación de lupino.

1.7 Objetivos específicos

- 1) Construir diferentes vectores binarios que contengan un gen de semilla regulado por diferentes promotores específicos de semilla.
 - Aislamiento de secuencias promotoras, codificantes y terminadoras.
 - Construcción de vectores binarios con las secuencias promotoras, codificantes y terminadoras aisladas.
- 2) Evaluar y comparar la expresión de un gen de semilla bajo los diferentes promotores mediante la transformación estable en *A. thaliana*.
 - Transformación de *A. thaliana* mediante *A. tumefaciens* con los diferentes vectores binarios construidos.
 - Generación de anticuerpos policlonales contra la albúmina de girasol SFA8.

- Análisis de las proteínas de semilla de plantas transgénicas mediante *western blot*.
- 3) Transformar y regenerar plántulas de lupino a partir de eje embrionario de semillas de lupino.
- Estudios de regeneración y transformación de explantes de lupino.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos y enzimas

Los reactivos utilizados en el desarrollo de esta tesis fueron de grado análisis o biología molecular y se adquirieron en Sigma Chemical, Merck y Phytotechnology. Las enzimas de restricción, T4 ADN ligasa, los desoxiribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, la fosfatasa alcalina de camarón, y los estándar de peso molecular de ácidos nucleicos (1kb, y una mezcla de λ DNA/*Hind* III y ϕ /X 174RF DNA/*Hae* III), se obtuvieron de Invitrogen. La Taq ADN polimerasa se obtuvo de Promega. La triptona, extracto de proteína y agar fueron adquiridos en Laboratorios Difco. Los kit comerciales que se utilizaron para la purificación de productos de PCR, ADN plasmidial y ADN a partir de geles son de E.Z.N.A. Omega Bio-tek.

2.2 Plantas utilizadas

Las plantas utilizadas para el desarrollo de esta tesis fueron: *Pisum sativum* (arveja) de la variedad *Perfected Freezer 400*, *Helianthus annuus* (maravilla) de la variedad G-100, *Phaseolus vulgaris* (poroto) de la variedad *Apolo*, *Arabidopsis thaliana* de la variedad *Columbia* y *Lupinus albus* de la variedad *Uniharvest*.

2.3 Cepas bacterianas

Para la mantención y multiplicación de los vectores se utilizó la cepa Nova Blue de *Escherichia coli*; para la producción de la proteína recombinante SFA8 se utilizó la cepa

de *E. coli* BL21 (DE3) y para la transformación de *A. thaliana* se utilizó *Agrobacterium tumefaciens*, cepas GV3101 y LBA4404.

2.4 Medios de cultivo

LB. Bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L. Para medio sólido se adiciona agar 15 g/L.

SOC. Bactotripton 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L, glucosa 1M y MgCl₂ 0,1M.

MS. Sales MS (macroelementos, microelementos y quelatos de hierro) 4,3 g/L, mioinositol 0,1 g/L, sacarosa 30 g/L. Para medio sólido se agregó agar-agar 7 g/L.

Medio de co-cultivo. Medio MS agar al que se le adicionaron las hormonas BAP 10 mg/L y NAA 1 mg/L; vitamina B5 1 mg/L y acetosiringona 100 µM.

Medio de germinación. Medio MS agar al que se le adicionaron las hormonas BAP 1 mg/L y NAA 0,1 mg/L; vitamina B5 1 mg/L y timentina 150 µg/ml

Medio de inducción de raiz. Medio MS agar al que se le adicionaron las hormonas BAP 0,1 mg/L, NAA 0,01 mg/L y IBA 1 mg/L; vitamina B5 1 mg/L.

2.5 Antibióticos

Las soluciones stock de antibióticos se prepararon en H₂O miliQ y fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de poro de 0,22 µm de (Millipore). Los antibióticos se prepararon en las siguientes concentraciones: ampicilina

(Amp, 100 mg/mL), gentamicina (Gen, 100 mg/mL), kanamicina (Kan, 50 mg/mL), rifampicina (Rif, 100 mg/mL en dimetil sulfóxido) e higromicina (Hig, 100 mg/mL).

2.6 Mezcla de tierra utilizada para el cultivo de plantas

Para el cultivo de plantas en tierra se utilizó la siguiente mezcla: 4 partes de tierra biológica compost (Anasac), 1 parte de perlita (Harbolite), 1 parte de vermiculita (Harbolite) y ½ parte de turba seleccionada (Anasac).

2.7 Esterilización de semillas

Las semillas de las diferentes plantas utilizadas para germinación in-vitro se esterilizaron según el siguiente protocolo. Las semillas se lavaron con 20 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 1% y Tween 20 al 0,1% v/v (para *A. thaliana* 1 mL) durante 10 min, luego se lavó una vez con H₂O miliQ esteril, después con 20mL etanol 70% durante 1 min (para *A. thaliana* 1 mL) y finalmente se realizaron 5 lavados con H₂O miliQ estéril. Todo el procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar.

2.8 Cultivo de plantas

Las plantas de poroto, arveja y maravilla sólo se cultivaron *in vitro*, donde se crecieron en frascos con 20 ml de medio MS agar. Las plantas de *A. thaliana* germinadas *in vitro* se traspararon a maceteros, teniendo cuidado de eliminar el medio de cultivo restante. Estas plantas se mantuvieron cubiertas con plástico durante la primera semana con el fin de mantener la humedad. Luego se dejaron crecer durante 2 meses aproximadamente, regándolas 2 a 3 veces por semana. Una vez que las silicuas se comenzaron a secar, se

envolvieron en bolsas de papel y se suspendió su riego durante 2 semanas, para finalmente terminar de secarlas por una semana y recolectarlas. Todas las semillas se mantuvieron a temperatura ambiente y las plantas de la generación T1 se crecían, tanto *in vitro* como en tierra, a 23°C y con ciclo de luz de 16 h.

2.9 Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión floral

La transformación de *A. thaliana* se realizó según el protocolo descrito por Clough (Clough y Bent, 1998). Se utilizó *A. tumefaciens* de la cepa GV3101 transformada con el vector binario de interés crecida a 28°C con agitación constante en medio LB suplementado con Rif 10µg/mL, Gen 50µg/mL y Kan 50µg/mL, hasta una DO_{600nm} entre 0,55-0,65. Luego el cultivo se centrifugó a 5.500g por 20 min y el sedimento bacteriano se resuspendió en medio MS que contiene Silwett L-77 al 0,05% v/v. La transformación se realizó sumergiendo las inflorescencias de las plantas de 10 cm de altura durante 1 min en el medio MS descrito, con agitación. Posteriormente, las plantas se mantuvieron en posición horizontal y en oscuridad por 16 horas, cubiertas con papel plástico para mantener la humedad. Pasado este tiempo se sacaron las plantas de la oscuridad a la cámara de crecimiento a 23°C, con ciclos de luz de 16 horas. Luego de 2 semanas se dejaron de regar las plantas para colectar semillas.

2.10 Selección de semillas de *Arabidopsis thaliana* transformadas

Para la selección de las semillas transformadas, las semillas, previamente contadas se esterilizaron y se germinaron en placas de medio MS agar suplementadas con

higromicina 7,5 µg/ml. Las que sobrevivieron a la presencia del antibiótico se traspasaron a maceteros para recolectar semillas. Se calculó la eficiencia de transformación, considerando el número de semillas (un volumen de 50 µl corresponde a 1250 semillas) y contando el número de transformantes obtenidos, con lo cual se determinó el porcentaje de transformación.

2.11 Preparación de explantes de lupino a partir de eje embrionario

Para la preparación de explantes se utilizó el protocolo descrito por Pigeaire y col. (Pigeaire y col., 1997). Las semillas de lupino se esterilizaron y se germinaron en placas Petri de H₂O-agar 0,8%, dejándolas en oscuridad a 4°C por 24 h, para luego incubarlas durante 12 h a 24°C. Los explantes fueron preparados en una campana de flujo laminar, donde a las semillas se les sacó la cubierta con la ayuda de un bisturí, se separaron los cotiledones y luego se cortó una sección de 5 mm del eje embrionario y se les sacó los 2 primeros pares de hojas.

2.12 Transformación de explantes de lupino

Para la transformación se utilizó el protocolo descrito por Pigeaire y col. (Pigeaire y col., 1997). Los explantes generados se pincharon 7 a 10 veces con una jeringa de tuberculina, para ser luego incubados por 30 min con agitación con un cultivo de *A. tumefaciens* de la cepa LBA4404 crecida en medio LB a 28°C hasta una DO_{600nm} de 0,6 y luego resuspendida en medio MS. Luego los explantes se traspasaron a placas Petri

con medio de co-cultivo, donde se siguió el mismo protocolo de regeneración de explantes.

2.13 Regeneración de explantes de lupino

Para la regeneración se utilizó el protocolo descrito por Pigeaire y col. (Pigeaire y col., 1997). Los explantes producidos se crecieron por 3 días en medio de co-cultivo en placas petri, luego se traspasaron a frascos con medio de germinación, y se cambiaron a medio nuevo a intervalos de 2 semanas. Una vez que los explantes desarrollaron el tallo y las hojas, éstos se pasaron a medio de inducción de raíz, donde se mantuvieron hasta que éstos se desarrollaron, cambiándose a medio nuevo a intervalos de 2 semanas.

2.14 Vectores de clonamiento

Para el clonamiento de productos de PCR se utilizó el vector pGEM-T. Para la expresión de la proteína recombinante de la albúmina de girasol SFA8 se utilizó el vector de expresión pET-28a y tanto para la construcción de vectores binarios como para la transformación de explantes de lupino se utilizó el vector comercial pCAMBIA1305.1.

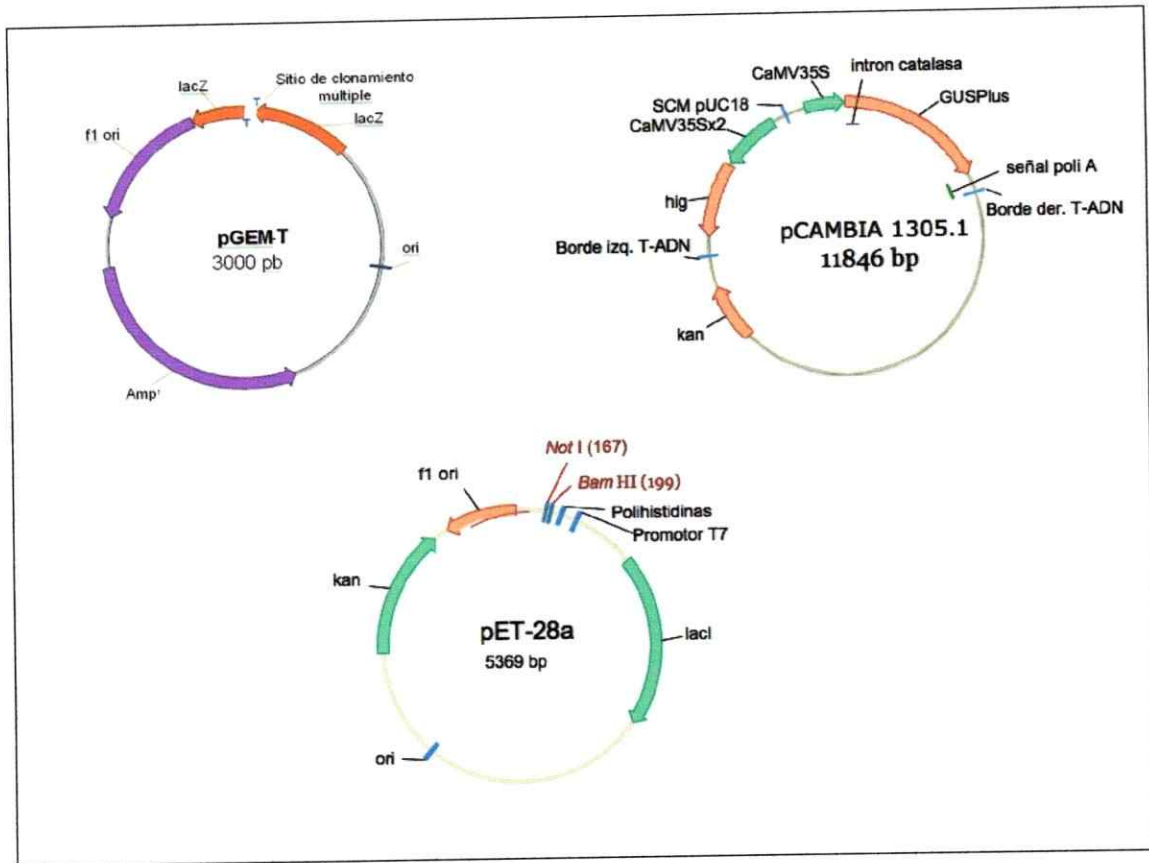


Figura 1. Esquema de los vectores pGEM-T, pCAMBIA 1305.1 y pET-28a.

El vector pGEM-T se compone de amp^r (gen de resistencia a ampicilina); f1 ori (origen de replicación del fago f1); lacZ (región codificante para la β-galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento múltiple); T (timidinas no apareadas en los extremos 3' de cada hebra para la inserción de los amplificadores de PCR). El vector pCAMBIA 1305.1 se compone de kan (gen de resistencia a kanamicina); hig (gen de resistencia a higromicina); CaMV35S (promotor del virus del mosaico de la coliflor); SCM pUC18 (sitio de clonamiento múltiple pUC18); GUSPlus (gen de la β-glucuronidasa); Borde izq T-ADN (borde izquierdo de secuencia de inserción en el genoma); Borde der T-ADN (borde derecho de secuencia de inserción en el genoma). El vector pET-28a se compone de kan; ori (origen de replicación bacteriano derivado de pBR322); f1 ori; lacI (represor del operon lac); promotor T7 y secuencia codificante del péptido T7 y polihistidina.

2.15 Oligonucleótidos

Para el diseño y análisis de los partidores se utilizó el programa OLIGO, y fueron sintetizados por Invitrogen. La temperatura de hibridación (T_m) fue calculada según la

formula: $T_m = 2 (A+T) + 4 (G+C)$. En la Tabla 1 se muestra la lista de partidores utilizados y sus secuencias.

Tabla1. Secuencias de partidores utilizados.

En rojo se indican los sitios de restricción para EcoRI, en rosado para XbaI, en verde para BamHI y en azul para HindIII.

Nombre	Partidor	Tm (°C)
SFA8 F	5' CAGGGATCCATGGCAAGGTTTTTCGATCGTG 3'	62
SFA8 R	5' CAGTCTAGACTACATTTGGCATGGTTGGGA 3'	62
SFA8KDEL R	5'CAGTCTAGACTATAGCTCATCTTTCTCACTAGT CATTTGGCATGGTTGGG 3'	78
ProFas F	5' CACGAATTCATTGTACTCCCAGTATCATT A 3'	56
ProFas R	5' CAGGGATCCAGTAGAGTAGTATTGAATATGAG 3'	60
ProVic F	5' CATGAATTCGATCTTGGTGTGATAAAACATAA 3'	60
ProVic R	5' CAGGGATCCGTTGATTGAAACTAATATCTCAC 3'	60
3' Fas F	5' CAGTCTAGATAAGTATGAACTAAAATGCATGT 3'	58
3' Fas R	5' CTGAAGCTTATCATAACATCCTTTGTTTATTCA 3'	60
3' Vic F	5' CAGTCTAGAAATGTTTCTTAATGAGTGGACA 3'	58
3' Vic R	5' CAGAAGCTTTATTAATTGATTGATGATTGTATATC 3'	62
3' Arc F	5' CATTCTAGACTCCCAAACAACCTCC 3'	52
3' Arc R	5' GTC AAGCTTACAATTGTTTTAGACTGAATATAAC 3'	62
Act F	5' GTTGGGATGAACCAGAAGGA 3'	60
Act R	5' GAACCACCGATCCAGACACT 3'	58
Gusplus F	5' CGACGGCAAGTTCCTCATCA 3'	62
Gusplus R	5' TTGGTCCAGCGCTCGCGAA 3'	62
pCAMBIA R	5' CCGTTGGTTGGTCAAGTCCT 3'	62

2.16 Condiciones de crecimiento de cultivos bacterianos

Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C con agitación constante durante 16 horas en medio líquido y en placas de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente al vector utilizado. Se prepararon alícuotas en glicerol para su conservación, tomando un volumen de un cultivo líquido y agregándole glicerol hasta un 20% final y almacenándolo a -80°C.

2.17 Preparación de células competentes de *Escherichia coli* Novablue y BL21(DE3)

Para la preparación de las células competentes se utilizó el método descrito por Sambrook (Sambrook y col., 1989).

2.18 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y LBA4404

Las células competentes se prepararon según el método descrito por Chen y col. (Chen y col., 1994).

2.19 Transformación de células competentes de *Escherichia coli* Novablue y BL21(DE3)

La transformación de células competentes de *E. coli* Novablue y BL21 (DE3) se realizó según el protocolo descrito por Inoue y col. (Inoue y col., 1990). La transformación se llevó a cabo con 1µl del ADN de interés en una concentración de entre 100-200µg/µl, que se mezcló con una alícuota de 100µl de células competentes, luego se incubó en hielo durante 30 min, seguido de una incubación a 42° por 1 min y 2 min más en hielo. Para la recuperación de las células se agregó 800µl de medio SOC y se incubó 1h a 37°C con agitación. Finalmente se centrifugó por 2 min a 3000 x g, se botó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en el medio remanente (100-200µl) y se plaqueó en medio sólido LB agar con el antibiótico correspondiente al vector de interés. Cuando se utilizó el vector pGEM-T, antes de plaquear, se le añadió a las placas 10µL de IPTG 1M y

50 μ L de XGal 50mg/ml para seleccionar las colonias por α -complementación. Las placas se dejaron creciendo durante la noche a 37°C.

2.20 Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y LBA4404

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 se realizó según el protocolo descrito por Chen y col. (Chen y col., 1994). La transformación se llevó a cabo con 1 μ g del ADN del vector de interés. Se tomó una alícuota de 100 μ l de células competentes previamente preparadas y se le agregó 1 μ g del ADN del vector de interés, luego se congeló en nitrógeno líquido por 5 min y después se incubaron durante 25 min a 37°C. Posteriormente se le agregó 1ml de medio LB con los antibióticos de selección de la cepa, y se incubó durante 3h a 28°C con agitación. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 3 min a 4000 x g. Finalmente se botó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en el medio remanente (100-200 μ l) y se plaqueó en medio sólido LB agar con los antibióticos de selección de la cepa y del vector de interés, y se creció durante 48h a 28°C.

2.21 Purificación de ADN genómico de hoja de poroto, maravilla y arvejas.

Para la extracción de ADN genómico a partir de hoja se siguió el protocolo descrito por Murray y Tomson (Murray y Tomson, 1980). Se cortaron hojas sin nervaduras de las plantas deseadas y se molieron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se tomaron 100mg de este tejido y se le agregó 600 μ l de buffer CTAB (CTAB 3%; Tris-

HCl 1M pH 8,0; NaCl 1,4M; EDTA 20mM). Se incubó durante 30min a 65°C, mezclando periódicamente. Luego se añadió 700µl de Cloroformo/alcohol isoamilico (24:1) y se agitó por inversión repetidas veces y se centrifugó a 13.000 x g por 10 min. A la fase acuosa recuperada se le añadió 700µl de isopropanol frío para precipitar el ADN por 20 min a -80°C. Luego se centrifugó por 10 min a 13.000 x g a 4°C, para luego botar el sobrenadante y secar el pellet a temperatura ambiente. Una vez seco se resuspendió en 100µl de H₂O MQ con RNAsa 1mg/ml y se incubó durante 30 min a 37°C. Luego se agregó un volumen de cloroformo/alcohol isoamilico 24:1 para eliminar las impurezas, se homogenizó y se centrifugó a 13.000 x g por 10 min. La fase acuosa se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol puro a -80°C durante 30 min, luego se centrifugó a 4°C por 10 min a 13.000 x g. Se boto el sobrenadante y el sedimento se lavó 2 veces con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en un volumen entre 50-100µl de H₂O MQ estéril.

2.22 Purificación de ARN de semillas de plantas de *A. thaliana* y girasol

Para la extracción de ARN a partir de semillas se siguió el protocolo descrito por Chang (Chang S., 1993). La cantidad inicial de tejido utilizado fue 5 mg para *A. thaliana*, y 20 mg para girasol. Estas se colocaron en tubos Eppendorf y se congelaron en nitrógeno líquido, para ser molidas con un taladro y una punta cónica que se adapta al tubo Eppendorf en contacto con hielo seco. Luego se añadió 600µl del tampon de extracción (CTAB 2%, PVP (K30), 2%, TrisHCl, 100mM, EDTA 25mM, NaCl 2M, Spermidina 0,5g/l, Ácido Ascórbico 8mM, β-mercaptoetanol 2%, pH 8.0) y se calentó a 65°C

durante 15 min, luego se extrajo 2 veces con igual volumen de cloroformo:IAA (24:1), separando las fases por centrifugación a 10.000 x g durante 10min. La fase superior se cambió a un tubo nuevo y se le agregó 150µl de LiCl 10M, y se incubó durante la noche a 4°C. Luego se centrifugó durante 20 min a 10.000 x g a 4°C, y el sedimento se resuspendió en 30-50µl de SDS 0,5%, y se extrajo con igual volumen de cloroformo:IAA (24:1), se recuperó la fase superior y se le añadió 2 volúmenes de etanol 100% frío y se precipitó a -80°C por 30 min. Finalmente se centrifugó a 10.000 x g y se dejó secar el sedimento a temperatura ambiente y se resuspendió en 50µl de H₂O DEPC.

2.23 Purificación de ADN plasmidial

Para la purificación de ADN plasmidial desde bacterias se utilizó el kit Plasmid Miniprep Kit de E.Z.N.A. Omega Bio-Tek. El protocolo que se utilizó es el descrito por el fabricante y se llevó a cabo con 3ml de cultivo inicial. Para el caso de *A. tumefaciens*, el ADN plasmidial obtenido se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* Novablue según el protocolo descrito (2.19), para luego hacer una purificación de ADN plasmidial a partir de éstas, el cual se utilizó para los posteriores análisis.

2.24 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En todas las reacciones se utilizó la Taq ADN polimerasa de Promega con su tampón correspondiente, MgCl₂ 1,5 mM final, dNTPs 0,8 mM final, partidores a una concentración de 0,5 µM y se ocuparon entre 50-200 ng de ADN como templado, llevando la reacción a un volumen final de 50µl. El modelo del termociclador utilizado

fue PTC-100 (MJ research) donde se usó el siguiente programa: un ciclo de desnaturación inicial de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 3 etapas; 1 min a 94°C, 1 min a una temperatura de entre 50-60°C dependiendo de la T_m de los partidores utilizados, y un tiempo entre 30 s a 2 min de elongación a 72°C, dependiendo del tamaño del amplificado. Finalmente una etapa de elongación de 10 min a 72°C.

2.25 RT-PCR

La obtención del ADNc a partir de ARN se realizó mediante la transcripción reversa según el siguiente protocolo. Se incubó el ARN con el oligo dT (25 ng/ul) por 10 min a 70°C. Luego se incubó 3 min en hielo, y se adicionó buffer 5X, inhibidor de ribonucleasa (25 unidades), transcriptasa reversa M-MLV (200 unidades), dNTP (10 uM) y agua DEPC. La mezcla de reacción presentó un volumen final de 25 ul y fue incubada a 37° C por 1 h. El ADNc obtenido se utilizó como templado para las reacciones de PCR que se realizaron como se describió previamente.

2.26 Purificación de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit Cycle-Pure Kit de E.Z.N.A Omega Bio-Tek. El protocolo utilizado fue el descrito por el fabricante.

2.27 Análisis de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa

El ADN purificado, aislado por PCR o de plasmidio, fue analizado mediante electroforesis en geles de 0,8% a 2% de agarosa, dependiendo del tamaño del ADN. Para esto se utilizó el tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM pH 8,3) y BrEt

0,2 µg/mL. Antes de cargar las muestras en el gel, se agregó una solución de carga 10x (azul de bromofenol 0.25% p/v y glicerol 50% v/v en tampón TE). Para la electroforesis se utilizó un voltaje de 90 volts por 30 a 60 min dependiendo del tamaño de los fragmentos a resolver.

2.28 Purificación de fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa

Una vez finalizada la digestión, se separaron las bandas mediante electroforesis en un gel de 1% a 2% de agarosa dependiendo del tamaño de las bandas, teñido con BrEt 1 µg/ml. La banda que contenía el fragmento de ADN de interés se cortó del gel con un bisturí y se purificó con un kit de extracción de geles Gel Extraction Kit E.Z.N.A Omega Bio-Tek. Para la purificación se siguió el protocolo descrito por el fabricante.

2.29 Digestión de ADN mediante endonucleasas de restricción

Para la digestión se utilizó entre 1-5 U por cada µg de ADN y se utilizó el tampón correspondiente para cada enzima. La mezcla se incubó por 1-4 h a la temperatura correspondiente para cada enzima.

2.30 Desfosforilación de ADN

Con el fin de evitar que los vectores se recircularizaran en presencia de la ligasa luego de la digestión, éstos fueron desfosforilados. Para ésto se utilizó la fosfatasa alcalina de camarón (1U) con su respectivo tampón y entre 4-10 µg de ADN, y se llevó la mezcla a un volumen final de 100 µl. Se incubó a 37°C por 30 min y luego a 45°C por 30 min.

Después se le agregó EDTA a una concentración final de 10 mM y se incubó a 80°C por 15 min para inactivar la fosfatasa. Para purificar el ADN se hizo una extracción fenol-cloroformo.

2.31 Extracción fenol-cloroformo

El ADN se llevó a un volumen final de 100 µL, luego se le agregó 1 volumen de fenol saturado básico, y se mezcló por inversión repetidas veces. Se centrifugó a 12.000 x g por 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó 1 volumen de fenol : cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a 12.000 x g por 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1), se homogenizó por agitación y se centrifugó. Al sobrenadante recuperado se le añadió 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M pH: 5,2 y 2 volúmenes de etanol y se precipitó durante la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó durante 20 min a 4°C a 13.000 x g. Se descartó el sobrenadante, se secó el sedimento a temperatura ambiente y se resuspendió en agua estéril.

2.32 Ligación de fragmentos de ADN

Los productos de PCR o de digestión se ligaron con vectores de clonamiento en una razón molar de 1:7 de vector respecto al inserto. Para esto se utilizó 1 µl de la enzima T4 ADN ligasa de Promega, con su respectivo tampón 2x, se utilizaron 25-50 ng de vector y entre 200-300 ng de inserto. Se ligó a temperatura ambiente durante 1 h y luego se transformó de acuerdo a los protocolos descritos.

2.33 Secuenciación y análisis de secuencias

Las secuencias codificantes y no codificantes aisladas y clonadas en el vector pGEM-T fueron secuenciadas por MacroGen, Inc. (Seoul, Korea), utilizando los partidores M13 F y M13 R. Los análisis de las secuencias se realizaron con el programa Vector NTI Suite 8.0 (Invitrogen) y mediante el programa Blast de la base de datos NCBI. Las secuencias en base a las cuales se diseñaron los partidores también se obtuvieron de la base de datos NCBI.

2.34 Ensayo de reacción de GUS

El ensayo de GUS se llevó a cabo según el protocolo descrito por Jefferson y col. (1987). El ensayo se realizó a partir de una hoja completa de cada planta. Las hojas se colocaron en un tubo Eppendorf con el tampón de tinción (100 mM NaH₂PO₄ pH 7; 10 mM EDTA; 0,1% Tritón X-100; 0,1 mM X-Gluc) y se incubaron en una cámara de desecación durante 10 min a una presión negativa de 50 cm de Hg. Luego se incubaron durante la noche a 37°C. Para fijar las hojas, éstas se incubaron en el tampón de fijado (formaldehído 1,48%, ácido acético 4% y etanol 28,5%) durante 30 min. Posteriormente, con el fin de remover la clorofila éstas se deshidrataron, incubándolas en etanol 95% durante 10 min y rehidrataron, incubándolas en etanol 75% durante 10 min, para finalmente mantenerlas en H₂O destilada y observar la coloración azul.

2.35 Inducción de la síntesis de proteínas

La expresión de albúmina de girasol SFA8 se realizó en células BL21(DE3) previamente transformadas con el vector recombinante pET-28a que contenía el ADNc del gen *sfa8*. Para inducir la expresión de la proteína, se inocularon 50 mL de medio LB-Kan (kanamicina 50 µg/mL) con 1,5 mL de cultivo fresco de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) recombinante crecida durante la noche, y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,5$ a $0,7$. Luego se tomó 1 mL correspondiente al tiempo 0 de inducción y al resto del cultivo se le agregó IPTG a una concentración final de 1 mM. Hecho esto, se tomó una alícuota a cada hora durante las siguientes 3 h. Las alícuotas de 1 mL se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en 200 µL de tampón PBS en presencia de PMSF 1 mM. Las muestras se sonicaron tres veces durante 15 s a intensidad media, manteniendo los tubos en frío para evitar la degradación de la muestra. Luego de sonicar, la suspensión se centrifugó a 13.000 x g por 10 min para separar la fracción proteica soluble, de las proteínas insolubles y los restos celulares.

2.36 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

Las muestras a analizar se prepararon mezclándolas con 1 volumen de tampón de corrida 2X que contiene Tris 62,5 mM (pH 6,8), SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,02% y β-mercaptoetanol 50 mM. En el caso de las fracciones proteicas insolubles, éstas se resuspendieron directamente en 50 µL de tampón de corrida. Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min antes de cargar los geles. Los geles de poliacrilamida

fueron preparados de acuerdo a Laemmli y col. (Laemmli, 1970). El gel concentrador es al 4,5% de acrilamida:bisacrilamida (30:1) en Tris 0,125 mM (pH 6,8), SDS 0,1%, TEMED 0,1% y persulfato de amonio al 0,13%. El gel separador es al 12,5% o 15% de acrilamida:bisacrilamida (30:1), en Tris 0,375 mM (pH 8,8), SDS 0,1%, TEMED 0,25% y persulfato de amonio al 0,037%. El tampón de corrida corresponde a Tris-glicina. (Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%, pH 8,3). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 a 110 voltios hasta que el frente de corrida salió del gel. Posteriormente el gel se tiñó con una solución que contiene azul de Coomassie 0,5%, metanol 45% y ácido acético al 10%, durante aproximadamente 30 min con agitación, y se destiñó con la misma solución sin colorante. Los geles fueron secados en un secador modelo 583 Gel Dryer de la marca Bio-Rad a 80°C durante 60 min en condiciones de vacío. Como patrón de tamaños moleculares se utilizó el estándar de Invitrogen, *BenchMark Prestained Protein Ladder* que incluye tamaños de proteína de 8,4 kDa hasta 176,5 kDa y el estándar de Fermentas, *PageRuler Prestained Protein Ladder* que incluye tamaños de proteína de 11 kDa hasta 170 kDa.

2.37 Purificación de la proteína recombinante utilizando la resina de afinidad níquel-agarosa

El cultivo bacteriano (inducido por 3 horas con IPTG), se centrifugó a 4.000 x g a 4°C durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 4 mL de Tris 50 mM pH 8,0 en presencia de PMSF 1 mM. Luego se sonicó 4 veces durante 25 segundos manteniendo los tubos en hielo y se centrifugó por 10 min a 15.000 x g a 4°C. La fracción soluble se separó del material insoluble. La purificación de la

proteína recombinante, se realizó utilizando la resina de afinidad níquel-agarosa (Ni-NTA). Dado que la proteína se encontraba principalmente en la fracción insoluble, ésta se solubilizó en urea, determinando primero la concentración óptima de urea para solubilizar la proteína recombinante. Se probaron soluciones de urea 1 M hasta 8 M en Tris 50 mM (pH 8,0). Luego de que la proteína fue solubilizada en una concentración de urea 8M, se purificó con la resina de afinidad de Ni-NTA según el protocolo entregado por el fabricante para su purificación en condiciones desnaturantes, con la misma concentración de urea usada para solubilizarla.

2.38 Purificación de la proteína recombinante mediante electroelución

Con el fin de purificar la proteína a gran escala, se realizó una electroforesis seguida de una electroelución. Para esto se utilizó el mismo material insoluble que en el punto 2.36, y se resuspendió en 600µl de tampón de corrida 2X que contiene Tris 62,5 mM (pH 6,8), SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,02% y β-mercaptoetanol 50 mM. Se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% y luego se aisló la banda correspondiente a la proteína recombinante. El procedimiento se realizó con extractos de proteína obtenida de 6 matraces de 50 ml de cultivo bacteriano inducido. Finalmente, las bandas se electroeluyeron en una cámara de electroelución BioRad modelo 422, con una membrana que filtra proteínas sobre 15 kDa.

2.39 Extracción de proteína a partir de semillas de girasol y de *A. thaliana*

Para esto se utilizó el siguiente protocolo: Se pesaron 5 mg de semillas de *A. thaliana* ó 25 mg de semillas de girasol y se congelaron en N₂ líquido, luego se molieron con un taladro y una broca en un tubo Eppendorf en hielo seco para evitar que se caliente el tubo. Una vez molido el tejido, se le agregaron 75µl para *A. thaliana* y 400µl para girasol del tampón de extracción (SDS 2% v/v, β-mercaptoetanol 0,7% v/v, Tris pH 8,0 40 mM y glicerol 17% v/v), se homogenizó y luego centrifugó a 12.000 x g por 2 min. Luego se tomó el sobrenadante y se le agregó los siguientes inhibidores de proteasas: aprotinina (1µg/ml), leupeptina (1µg/ml) y pepstalina (1µg/ml). El sedimento también se guardó a -20°C al igual que el sobrenadante.

2.40 Generación del anticuerpo policlonal contra albúmina de girasol SFA8

Para producir el anticuerpo policlonal contra SFA8, se inmunizó un conejo con el extracto purificado por electroelución de la proteína recombinante. La concentración de la proteína recombinante en el extracto bacteriano purificado se estimó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida, comparando las bandas de las proteínas recombinantes con cantidades conocidas de seroalbúmina de bovino, usado como estándar. Se utilizó 1 conejo de la raza New Zealand White que fué inyectado subcutáneamente con el extracto purificado que contenía 320 µg de proteína recombinante en 800 µL de una emulsión con adyuvante de Freund. La primera inyección se realizó con adyuvante de Freund completo y los refuerzos a los 15 y 30, 45 y 60 días se realizaron con adyuvante de Freund incompleto. La sangría se realizó 10

días después de la 2^a, 3^a y última inyección. El título de anticuerpos contra la proteína, en el suero del conejo, se evaluó mediante ELISA.

2.41 Análisis de la respuesta inmune mediante ELISA

Para analizar la respuesta inmune del conejo inmunizado y estimar los títulos de anticuerpos anti SFA8, se utilizaron placas de 96 pocillos previamente tratados con pegotina (Burzio y col., 1996), las que fueron activadas agregando 50 μ L por pocillo de una solución con 10 μ g/mL de proteína recombinante purificada en PBS. Esto se incubó por 90 min a temperatura ambiente, luego se eliminó la proteína recombinante y a cada pocillo se agregaron 350 μ L de una solución de bloqueo que contiene caseína-sacarosa al 2% y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 50 μ L de los sueros a analizar a cada pocillo en diluciones seriadas en base 2, con solución de bloqueo, partiendo por una dilución de 1:4 en el primer pocillo. La mezcla se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Luego la placa se lavó tres veces con 350 μ L de PBS-Tween 20 al 0,02% durante 5 min cada una. Se incubó con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina desarrollado en cabra (KPL), el cual se agregó diluído 1/1000 utilizando solución de bloqueo en un volumen de 50 μ L por pocillo. La placa se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 20 al 0,02% por 5 min cada uno. El revelado de color se realizó incubando a 37°C con 50 μ L/pocillo de una solución 1 mg/mL de paranitrofenilfosfato (PNPP) en tampón FAL (NaCl 100 mM, Tris 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 9,5) por 30 min. El revelado se detuvo agregando 50 μ L de NaOH 3N por

pocillo. Finalmente la placa se leyó a 405 nm en un lector de ELISA ELX 800 de Biotek Instruments Inc.

2.42 Análisis de la proteína SFA8 mediante *western blot*

Para la evaluación de la expresión de SFA8 en las líneas transgénicas y de la proteína nativa de girasol, así como la especificidad del anticuerpo desarrollado en conejo se realizó un análisis por *western blot*. Para esto, la proteína purificada (1 µg por carril) por columna de níquel-agarosa y extractos de proteínas de *A. thaliana* y girasol se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturalantes en un gel de poliacrilamida al 15% y luego se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm, durante 1 h a 100 voltios en tampón de transferencia (Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%, pH 8,0, metanol 20%). La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02% durante 1 h. Luego se incubó con el antisuero policlonal de conejo, diluido 1/100 en leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02% y se incubó durante la noche a 4°C con agitación. Luego se lavó 3 veces durante 10-15 min con TBS-Tween 20 al 0,02% y agitación.

Como segundo anticuerpo se usó anti-IgG de conejo desarrollado en cabra conjugado con peroxidasa. Se utilizó a una dilución 1/2000, en leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02%, y se incubó por 60 min a temperatura ambiente con agitación. Luego la membrana se lavó 3 veces por 10 min con TBS-Tween 20 al 0,02%.

Las membranas se revelaron con el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate de Pierce, según el protocolo recomendado por el fabricante, usando placas autoradiográficas.

3. Resultados

3.1 Aislamiento de secuencias promotoras, codificantes y terminadoras.

Con el fin de construir vectores binarios que contuvieran el gen de una proteína vegetal rica en metionina bajo la regulación de promotores fuertes para la expresión de proteínas en semillas, se buscó las secuencias promotoras, codificantes y terminadoras en la base de datos GenBank y con éstas, se diseñaron partidores específicos (Tabla 1) incluyendo sitios de corte de enzimas de restricción para su posterior clonamiento. Las secuencias seleccionadas corresponden a la secuencia codificante del gen *sfa8* de albúmina de girasol y secuencias reguladoras específicas de semilla del gen de faseolina, vicilina y arceolina. Todas las secuencias se amplificaron a partir de ADN genómico de distintas especies. El promotor de faseolina y las secuencias terminadoras 3' UTR de los genes de faseolina y arceolina se aislaron de poroto (*P. vulgaris*), el promotor de vicilina y la secuencia terminadora 3' UTR del gen de vicilina se aislaron de arveja (*P. sativum*). El gen de albúmina *sfa8* se aisló de maravilla (*H. annuus*) y para ésta se usó partidores específicos correspondientes al extremo 5' y 3' codificante y también un partidor 3' que incluye la secuencia codificadora de KDEL para destinar la proteína al retículo y ver su efecto en la acumulación. Todos los amplificados concuerdan en tamaño con las secuencias descritas en la base de datos GenBank para estos mismos genes, a excepción del gen de albúmina SFA8, el cual presenta un intrón cuya secuencia no se encontraba descrita en la base de datos sino que correspondía a su ADNc. También, la secuencia terminadora 3' UTR del gen de arceolina posee 25 pares de bases más que la secuencia descrita de 603 pares de base. Todos los amplificados fueron purificados desde geles de agarosa como se observa en la Figura 2.

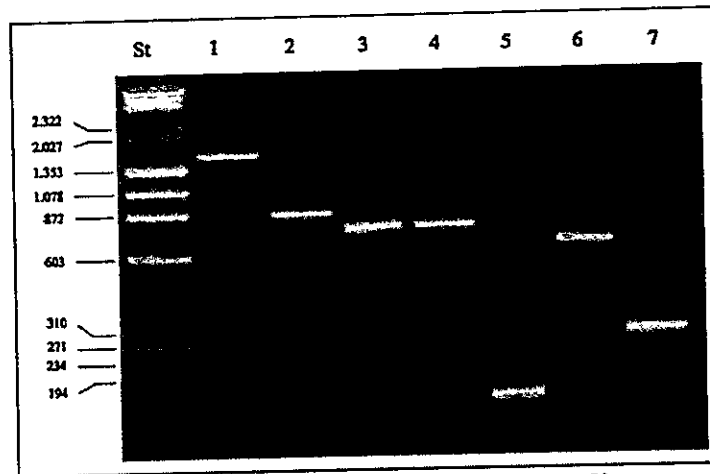


Figura 2. Productos de PCR purificados correspondientes a las secuencias promotoras, codificantes y terminadoras aisladas.
 Los productos de PCR de las diferentes secuencias aisladas, se purificaron y analizaron en un gel de agarosa. 1. Promotor de faseolina (1548 pb). 2. Promotor de vicilina (856 pb). 3. Albúmina *sfa8* (727 pb). 4. Gen estructural de albúmina *sfa8* con secuencia de retención en retículo KDEL (743 pb). 5. Secuencia terminadora 3'UTR de faseolina (131 pb). 6. Secuencia terminadora 3'UTR de arceolina (628 pb). 7. Secuencia terminadora 3'UTR de vicilina (286 pb). St corresponde a una mezcla de λ cortado con *HindIII* / ϕ cortado con *HaeIII*, usado como estándar de tamaño de ADN.

Los fragmentos genómicos amplificados por PCR fueron clonados en el vector pGEM-T. Una vez clonados se corroboró la presencia de cada amplificado en los respectivos clones por digestión mediante enzimas de restricción que cortan en forma específica los sitios de restricción incluidos en los partidores de dichos amplificados (Tabla 1). Los resultados de la Figura 3 indican dos bandas para cada caso, una que corresponde al vector de clonamiento (3000 pares de base) y otra a las secuencias liberadas, las que tienen los tamaños correspondientes para cada amplificado, antes indicado en la Figura 2.

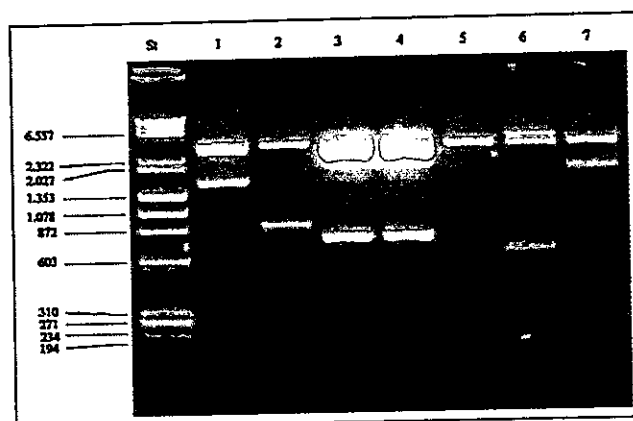


Figura 3. Digestión de secuencias clonadas en vector de clonamiento pGEM-T con enzimas de restricción.

Las diferentes secuencias clonadas en el vector pGEM-T se corroboraron mediante digestión con las enzimas de restricción específicas para cada secuencia (tabla 1). 1. Promotor de faseolina. 2. Promotor de vicilina. 3. Albúmina *sfa8*. 4. Albúmina *sfa8* con secuencia de retención en retículo KDEL. 5. Secuencia terminadora 3'UTR de faseolina. 6. Secuencia terminadora 3'UTR de arceolina. 7. Secuencia terminadora 3'UTR de vicilina. St corresponde al estándar de tamaño de ADN correspondiente a una mezcla de λ cortado con HindIII / ϕ cortado con HaeIII.

La secuenciación de cada uno de los clones permitió confirmar la identidad de las secuencias aisladas. Para el gen de la albúmina *sfa8*, se encontró que poseía un intrón de 302 pares de bases, y que la secuencia codificante corresponde a 425 pares de bases. En la secuencia codificante se encontraron 4 sustituciones en relación a lo descrito en la base de datos (ver Anexo 1), donde 2 de éstas producen un cambio en el aminoácido correspondiente, pero no modifica el marco de lectura del resto de la proteína. En el aminoácido 21 se cambia una prolina por una alanina y en el aminoácido 74 ocurre un cambio de una serina por una arginina. Las otras dos mutaciones, no producen cambio en el aminoácido para el cual codifican. Las mutaciones son en la base 48, donde una guanina cambia por una citosina y en la base 124 donde una citosina reemplaza a una adenina. Las secuencias del promotor de faseolina y de vicilina (Anexo 4 y 6

respectivamente) presentan una identidad de 99,5% y 99,2% respecto a las secuencias encontradas en las bases de datos. Mientras que las secuencias terminadoras 3'UTR de faseolina y vicilina (Anexo 5 y 3 respectivamente) presentan una identidad de 100% con respecto a las secuencias de la base de datos. La secuencia terminadora 3'UTR de arceolina tiene una identidad de 72,6% con la secuencia terminadora 3' de la base de datos de este gen (nº de acceso NCBI Z50202, ver Anexo 3), pero pese a ésta diferencia, el alineamiento muestra un valor de e de 1×10^{-29} y un score de 139, siendo identificado como secuencia terminadora. Además se encontró 2 secuencias de poli-adenilación, que van desde la base 50 a la 55 y de la 187 a la 192. Por ésta razón la secuencia seguirá siendo designada en este trabajo como 3' arceolina. También se buscaron los motivos de unión a matriz descritos para el promotor de faseolina en las secuencias promotoras clonadas. En el promotor de faseolina se encontraron los múltiples motivos descritos (van der Geest y col., 1994), característicos de regiones de unión a matriz (MAR), como lo son el motivo de desenrollamiento (AATATATTT), el sitio de unión de la topoisomerasa II ($GTN^A_{T^T}CATTNATNNG$) y la secuencia de MAR (AATATTTTT). En cambio en el promotor de vicilina no se encontraron estos sitios.

3.2 Construcción de vectores binarios con las secuencias promotoras, codificantes y terminadoras aisladas.

Las secuencias clonadas en el vector pGEM-T, se aislaron con las enzimas de restricción específicas para cada secuencia (EcoRI y BamHI en el caso de promotores, BamHI y XbaI para la albúmina SFA8 y XbaI y HindIII para las secuencias terminadoras 3'UTR). Los amplificadores liberados se purificaron desde un gel de agarosa y se clonaron en el

vector binario pCAMBIA 1305.1. Los fragmentos aislados incluyen en sus extremos los sitios de restricción apropiados para clonar en forma concertada e inmediatamente contigua, las secuencias de cada construcción. Así, se construyeron 6 diferentes vectores (Figura 4) que corresponden al gen de albúmina de girasol *sfa8* bajo diferentes secuencias reguladoras. Las construcciones pVSVA8 y pVSKVA8 corresponden al gen *sfa8* sin y con la secuencia codificadora de retención en retículo KDEL respectivamente, bajo la regulación del promotor de vicilina y su secuencia terminadora 3'UTR. Las construcciones pFSFA8 y pFSKFA8 corresponden al gen *sfa8* sin y con la región codificadora de KDEL respectivamente, bajo la regulación del promotor y secuencia terminadora 3'UTR de faseolina. Las otras 2 construcciones, pFSAA8 y pFSKAA8, corresponden al gen *sfa8* sin y con codificación para KDEL respectivamente, bajo la regulación del promotor de faseolina y secuencia terminadora 3'UTR de arceolina.

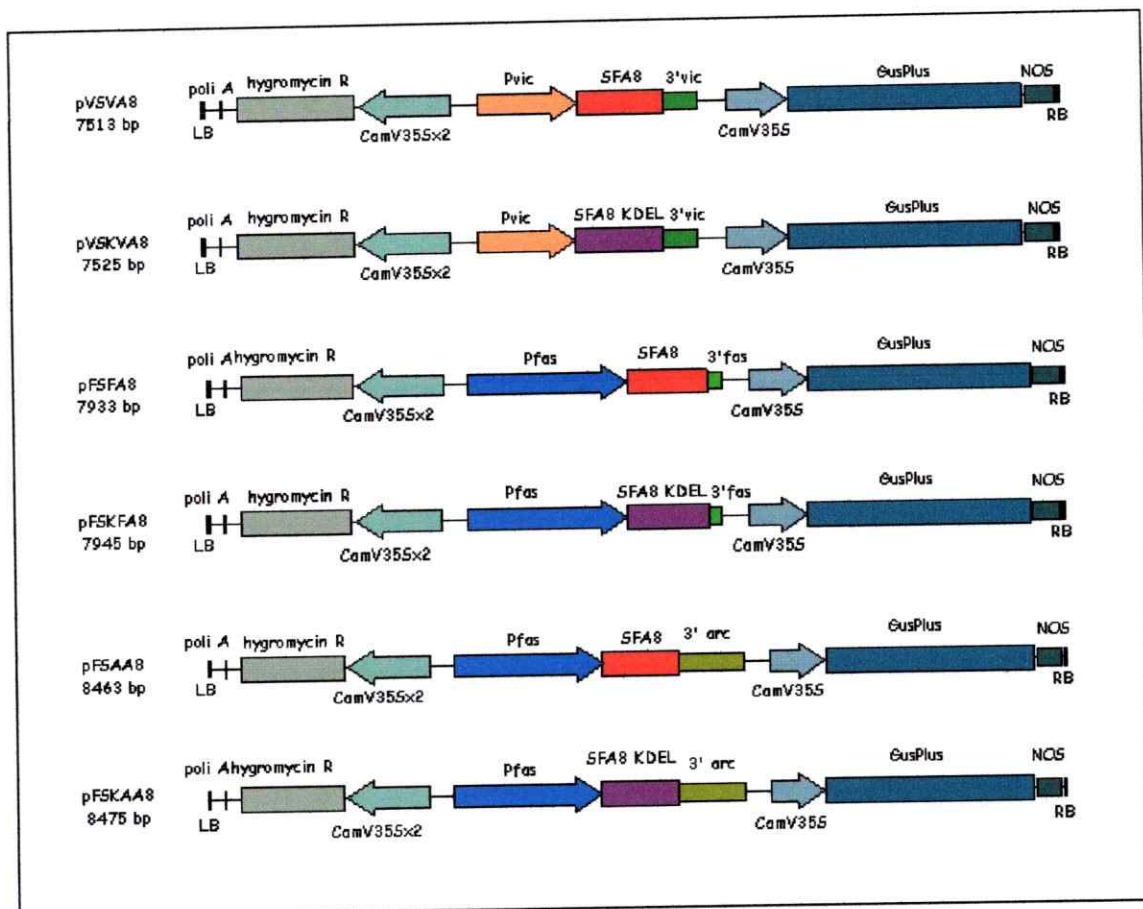


Figura 4. Diseño de los vectores pVSVA8, pVSKVA8, pFSFA8, pFSKFA8, pFSAA8 y pFSKAA8.

Todos estos vectores se construyeron en base al vector comercial pCAMBIA 1305.1, el que posee el gen de resistencia a higromicina (hygromycin R) regulado por el doble promotor del virus del mosaico de la coliflor (CamV355x2) y también posee el gen reportero GusPlus bajo el promotor CamV355 y el terminador de la nopalina sintetasa (NOS). La secuencia codificante utilizada en todos los vectores es el gen *sfa8* con y sin la región codificadora de KDEL. Se utilizaron los promotores de vicilina (Pvic) y de faseolina (Pfas) y las secuencias terminadoras 3'UTR de vicilina (3'vic), de faseolina (3'fas) y de arceolina (3'arc). Las secuencias se insertaron en forma contigua una respecto a la otra en la región de clonamiento múltiple del vector comercial.

3.3 Transformación de *A. thaliana* mediante *A. tumefaciens* con los diferentes vectores binarios construidos

Con el fin de evaluar y comparar los niveles de expresión de la albúmina inducidos por los diferentes vectores construidos, se transformó *Agrobacterium tumefaciens* con ellos

para luego poder transformar plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* mediante la técnica de inmersión floral. Una vez transformado *A. tumefaciens*, se aislaron los vectores construidos con el fin de corroborar que éstos aún poseían todas las secuencias clonadas, verificando mediante PCR la presencia de cada inserto. Como se observa en la Figura 5, todos los vectores construidos poseen las secuencias clonadas y los tamaños corresponden a los esperados.

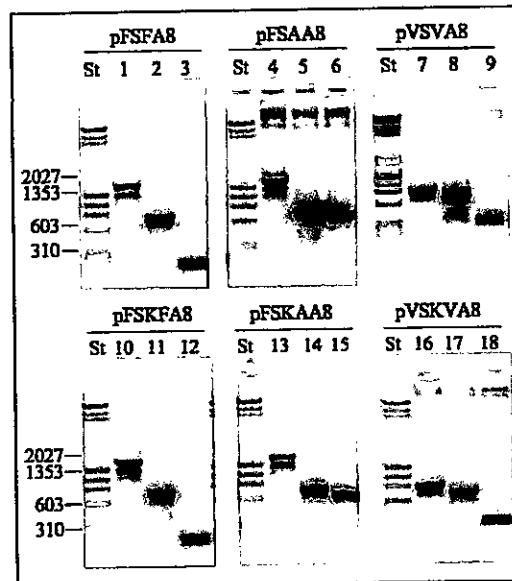


Figura 5. Análisis por electroforesis en geles y PCR de los vectores construidos.

Los carriles 1, 4, 10 y 13 corresponden a la secuencia promotora del gen de faseolina. Los carriles 7 y 16 corresponden a la secuencia promotora del gen de vicilina. Los carriles 3 y 12 a la secuencia terminadora 3'UTR del gen de faseolina. Los carriles 6 y 15 a la secuencia terminadora 3'UTR del gen de arceolina. Los carriles 9 y 18 a la secuencia terminadora 3'UTR del gen de vicilina. Los carriles 2, 5 y 8 corresponden al gen de albúmina de girasol *sfa8* y los carriles 11, 14 y 17 al gen de albúmina de girasol *sfa8* con la secuencia codificadora de KDEL. St corresponde al estándar de tamaño de ADN.

Se transformó *A. thaliana* mediante inmersión floral usando *A. tumefaciens* con los diferentes vectores construidos y se recuperaron las semillas, de las cuales se analizaron

3685 semillas en total. Como control se transformó de la misma forma *A. thaliana* con el vector comercial sin las construcciones descritas. Las semillas se germinaron y seleccionaron por 10 a 15 días en medio suplementado con higromicina (7,5 µg/ml) (Figura 6). Una vez transcurrido este tiempo las plántulas sensibles se mostraban de tamaño reducido, con su primer par de hojas enroscadas y ausentes de color, y su segundo par de hojas verdes. Por otra parte, las plántulas resistentes presentaban un mayor crecimiento con respecto a las sensibles y con todas sus hojas verdes como se observa en la Figura 6.

Para analizar que las plantas resistentes a higromicina tuvieran la construcción de interés, se extrajo ADN genómico a partir de hoja y se amplificó por PCR con los partidores específicos del gen SFA8 (Figura 7) y como control se utilizó el gen de actina.

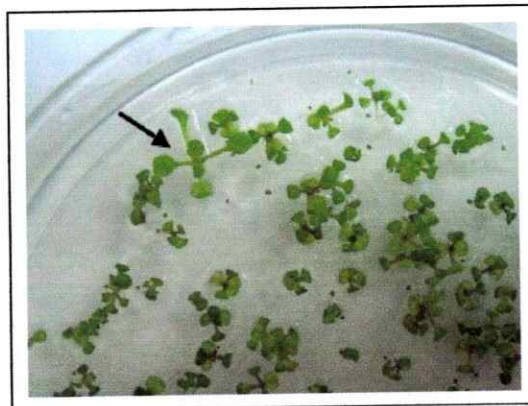


Figura 6. Selección de plantas de *A. thaliana* provenientes de semillas de plantas transformadas con el vector pFSKFA8.

Semillas germinadas correspondientes a la generación T1 de plantas de *A. thaliana* transformadas por inmersión floral con el vector pFSKFA8. Las plantas provenientes de las semillas se seleccionaron en medio MS suplementado con Higromicina 7,5 µg/ml. Las flechas indican las plántulas resistentes.

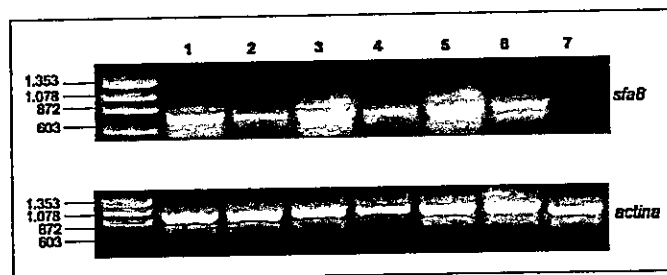


Figura 7. Análisis por PCR de la presencia del gene *sfa8* en ADN de hojas de diferentes líneas de plantas transgénicas.

El resultado del PCR se analizó mediante geles de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio. Como control se le realizó un PCR con partidores específicos para actina de *Arabidopsis* a las mismas líneas. 1. Línea v11, correspondiente al vector pVSVA8. 2. Línea vk3, correspondiente al vector pVSKVA8. 3. Línea f2, correspondiente al vector pFSFA8. 4. Línea fk2, correspondiente al vector pFSKFA8. 5. Línea a2, correspondiente al vector pFSAA8. 6. Línea ak2, correspondiente al vector pFSKAA8. 7. Planta silvestre. St corresponde al estándar de tamaño de ADN.

Con los vectores construidos se obtuvieron en total 21 plantas transgénicas. En la Tabla 2 se resume los porcentajes de transformación y el número de plantas transgénicas para cada uno de los vectores construidos. Todas las plantas resistentes a higromicina se analizaron por separado mediante la reacción de GUS y PCR con el fin de corroborar que contenían los genes de interés. Como se muestra en la tabla 2, se obtuvo una sobreestimación de las plantas transgénicas mediante la reacción de GUS, ya que solo parte de las plantas positivas por ésta reacción, fueron confirmadas por la reacción de PCR, a excepción de las plantas transformadas con el vector pVSVA8, donde no solo coinciden los resultados de la reacción de GUS y PCR, sino que también se confirmó mediante PCR la presencia del gen de interés en una planta que no fue positiva según la reacción de GUS.

Tabla 2. Eficiencia de transformación de *A. thaliana*

Resumen de la eficiencia de transformación de plantas de *A. thaliana* con los diferentes vectores, en relación a las plantas resistentes a higromicina y posteriormente analizadas mediante la reacción de GUS y PCR para corroborar que contenían el gen de interés. El porcentaje de transformación se calculó en base a los resultados de la reacción de PCR.

Vector	Nº total de semillas	semillas resistentes	GUS +	PCR SFA8 +	% de transformación
pVSVA8	1240	11	5	6	0.48
pVSKVA8	325	6	6	3	0.92
pFSFA8	545	10	8	5	0.92
pFSKFA8	500	3	2	2	0.40
pFSAA8	520	6	5	3	0.58
pFSKAA8	555	4	3	2	0.36
total	3685	40	29	21	0.57

3.4 Generación de anticuerpos policlonales contra la albúmina de girasol SFA8

Con el fin de poder evaluar las diferentes líneas transgénicas en su capacidad de acumular la proteína recombinante SFA8, se generó un anticuerpo policlonal contra esta proteína. Para esto se aisló el ADNc a partir de ARN de semillas de maravilla, y se clonó en el vector de clonamiento pGEM-T, para luego secuenciarlo y confirmar que no contenga mutaciones en su secuencia. Cuando se analizó la secuencia, se encontraron solo 2 mutaciones de sustitución a nivel de ADN que no cambian el marco de lectura, éstas ocurren en la base 48, donde se cambia una guanina por una citosina y en la base 61, donde se reemplaza una citosina por una guanina, pero solo la segunda mutación produce un cambio en la secuencia aminoacídica, en la posición 21, donde se cambia una prolina por una alanina, como también ocurrió al aislar el fragmento genómico. Por lo tanto, a nivel de proteína la secuencia solo difiere en un aminoácido de la que se

encuentra en la base de datos y solo presenta una variación en el aminoácido número 74 respecto a la proteína que será producida en *A. thaliana*.

Luego, se clonó el ADNc en el vector de expresión pET-28a, donde se corroboró por digestión que tuviera el inserto correspondiente de 423 pares de bases (Figura 8 A).

Para obtener la proteína recombinante, se transformaron células de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) con el vector de expresión recombinante pET-28a-SFA8 y se indujo la expresión de la proteína como se describe en Materiales y Métodos (Figura 8 B). Posteriormente se purificó la proteína mediante electroelución y por columna de afinidad. Luego de ser cuantificada se inyectó en un conejo la proteína recombinante electroeluída, para la generación de los anticuerpos policlonales. El título de anticuerpo específico fue cuantificado mediante ELISA, utilizando la proteína purificada por columna de afinidad para esta evaluación (datos no mostrados).

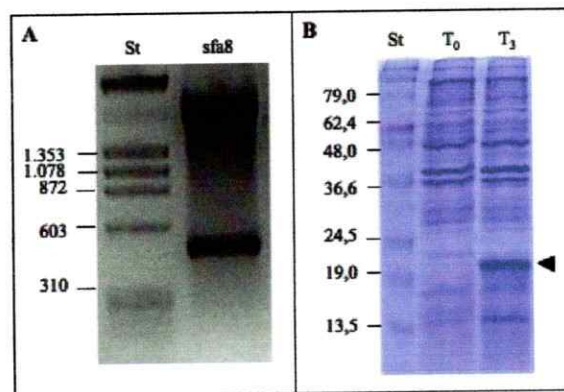


Figura 8. Confirmación de clonamiento de la albúmina de girasol *sfa8* en el vector pET-28a y expresión de la proteína recombinante.

(A) Análisis en gel de agarosa del plasmidio recombinante pET-28a-SFA8 por digestión del ADN con las enzimas BamHI y XbaI. (B) Análisis por electroforesis en geles PAGE-SDS al 15% de la inducción de la proteína recombinante de albúmina de girasol SFA8 en *E. coli* BL21(DE3). Se muestra la fracción insoluble, a los tiempos T₀ y T₃. La flecha señala la proteína inducida. En A St corresponde al estándar de tamaño de ADN. En B, St corresponde al estándar de proteína, con su peso molecular en kDa.

3.5 Análisis de las proteínas de semillas de plantas transgénicas mediante *western blot*.

Antes de evaluar la producción de SFA8 en las semillas de las plantas transgénicas generadas mediante *western blot*, se debió evaluar la especificidad del anticuerpo con un extracto de proteína total de semillas de girasol, *A. thaliana* silvestre y la proteína SFA8 purificada mediante columna de afinidad (Figura 9). Aquí se puede observar que el anticuerpo generado reconoce tanto la proteína nativa (carril 1) como la recombinante (carril 3, banda superior), obteniendo bandas de aproximadamente 12,5 kDa y 19,5 kDa respectivamente, que si bien, no coinciden con los tamaños del estándar de peso molecular usados en este gel, las mismas muestras se puede observar en la figura 11 (carril m y p) con los tamaños descritos anteriormente.

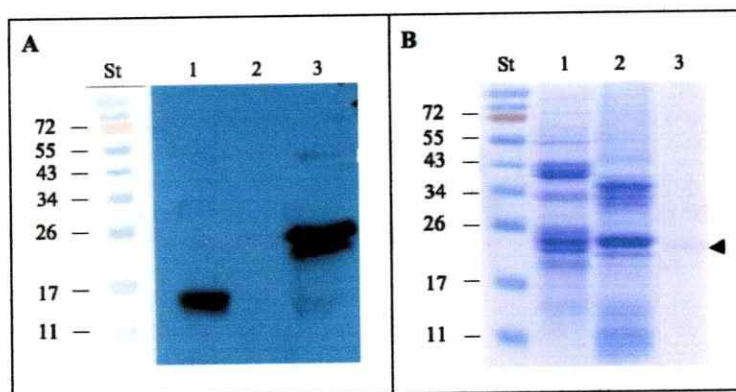


Figura 9. Análisis por *western blot* contra SFA8 de los extractos de proteína soluble de girasol y *A. thaliana*.

Se analizaron extractos de proteína de semillas silvestres de girasol y *A. thaliana* y 10 ng de SFA8 recombinante en un gel PAGE-SDS al 15% y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. (A) *western blot* contra la proteína SFA8 usando el suero policlonal de conejo. 1. Extracto total soluble de semilla de girasol. 2. Extracto total soluble de semilla de *A. thaliana*. 3. Proteína de SFA8 purificada mediante columna de afinidad (10ng). (B) Electroforesis en gel PAGE-SDS de las proteínas analizadas. Los números corresponden a los mismos que en A. Con la flecha se muestra la proteína purificada. St corresponde al estándar de proteínas en kDa.

Estos tamaños antes mencionados corresponden a lo descrito para la proteína nativa (12,133 kDa), que sufre un procesamiento en su extremo amino-terminal (Kortt y col., 1991), y a lo estimado para la proteína expresada en *E. coli* que presenta una secuencia de 32 aminoácidos fusionada en el extremo amino-terminal, y que no sufriría procesamiento post-traduccional en *E. coli*. En el extracto de *A. thaliana* silvestre no se observa reacción cruzada contra otras proteínas.

Para evaluar la acumulación de SFA8 en las semillas, se utilizó las semillas producidas por las diferentes líneas de plantas transgénicas que fueron confirmadas por PCR (a excepción de las plantas transformadas con el vector pFSKAA8, donde se utilizaron semillas de las 3 plantas confirmadas por GUS). Para esto, se hizo una extracción de proteína de semillas, sin embargo no se pudo cuantificar la concentración de proteína total debido a la presencia de interferentes con los reactivos del kit.

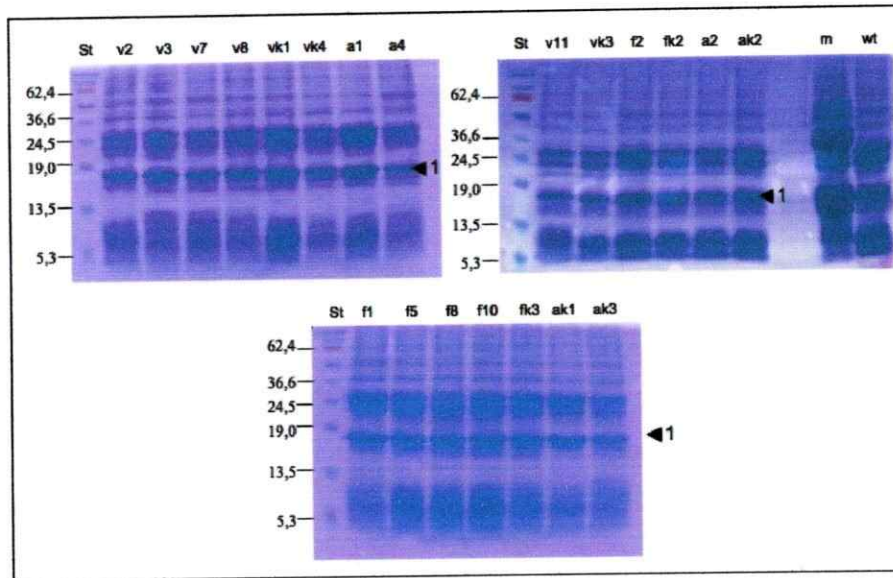


Figura 10. Análisis mediante electroforesis en gel PAGE-SDS de los extractos solubles de proteína de las líneas de plantas transgénicas generadas.

Análisis mediante electroforesis en gel PAGE-SDS teñido con azul de coomasie de extractos solubles de proteína de las semillas de plantas transgénicas generadas. Los carriles corresponden a plantas transgénicas que poseen los vectores pVSVA8 (líneas v2, v3, v7, v8 y v11), pVSKVA8 (líneas vk1, vk3 y vk4), pFSFA8 (líneas f1, f2, f5, f8 y f10), pFSKFA8 (líneas fk2 y fk3), pFSAA8 (líneas a1, a2 y a4) y pFSKAA8 (líneas ak1, ak2 y ak3). wt corresponde a *A. thaliana* silvestre y m a girasol. En la flecha 1 se indica la banda que se utilizó para la cuantificación relativa de la proteína cargada de cada muestra. St corresponde al estandar de peso molecular en kDa.

Con el fin de analizar la misma cantidad de proteína total de semillas transgénicas, primero se analizaron las muestras por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS (Figura 10), el cual se utilizó para cuantificar la intensidad de alguna de las bandas más importantes presentes, mediante el programa Image Master 2D Platinum 5.01 Trial Version. En base a la cuantificación relativa de las bandas de proteína, se cargó en un gel cantidades equivalentes de los extractos de proteínas antes mencionados y se realizó un análisis de *western blot* contra la proteína SFA8 (Figura 11).

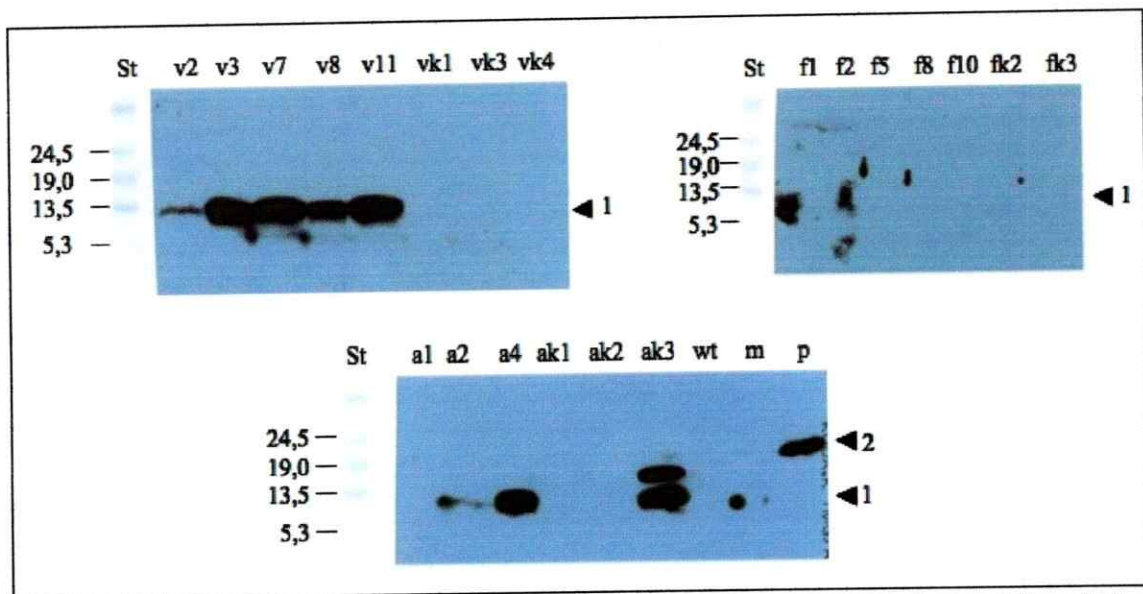


Figura 11. Análisis por *western blot* contra SFA8 de los extractos de proteína de las líneas transgénicas de *A. thaliana*.

Western blot contra SFA8 de los extractos de proteína soluble de las líneas transgénicas correspondiente a los vectores pVSVA8 (líneas v2, v3, v7, v8 y v11), pVSKVA8 (líneas vk1, vk3 y vk4), pFSFA8 (líneas f1, f2, f5, f8 y f10), pFSKFA8 (líneas fk2 y fk3), pFSAA8 (líneas a1, a2 y a4) y pFSKAA8 (líneas ak1, ak2 y ak3). wt corresponde a *A. thaliana* silvestre, m a girasol y p a la proteína recombinante purificada (0,4 ng). En la flecha 1 se indica la proteína SFA8 en extracto de *A. thaliana* y girasol, y en la flecha 2 se indica la proteína recombinante generada en *E. coli*. St corresponde al estándar de peso molecular en kDa.

En los resultados de la Figura 11 se observa que en las líneas transgénicas v2, v3, v7, v8, v11, a2, a4 y ak3 se detecta una banda del mismo peso molecular que la proteína nativa (m) de 12,7 kDa (flecha 1), la que está ausente en el carril correspondiente a la planta silvestre (wt). El mismo anticuerpo detecta la proteína recombinante producida a partir de la misma secuencia obtenida del ADNc (flecha 2), por lo que podemos concluir que en estas líneas transgénicas se está expresando la proteína SFA8. En el carril correspondiente a la línea ak3, que fue la única de las líneas transgénicas que contenían la secuencia KDEL de retención a retículo, donde se vió acumulación de la proteína SFA8, se observan 2 bandas, una correspondiente al peso molecular de la proteína nativa

de 12,7 kDa, y otra banda superior con un tamaño de 16,2 kDa, que como se discute mas adelante podría corresponder a modificaciones que sufre la proteína SFA8 debido a su retención en el retículo KDEL.

Los resultados muestran una acumulación de SFA8 en todas las líneas derivadas de la construcción pVSVA8, es decir, aquellas en que el gen *sfa8* se encuentra sin el segmento codificador de KDEL bajo la regulación del promotor y 3'UTR de vicilina (líneas v2, v3, v7, v8 y v11). Cuando el gen con la secuencia KDEL se encuentra bajo la regulación del mismo promotor de vicilina, no se detecta SFA8 (líneas vk1, vk3 y vk4). No se observa acumulación de SFA8 en ninguna de las líneas derivadas de los vectores pFSFA8 y pFSKFA8 en que el gen *sfa8* está bajo la regulación del promotor y 3'UTR de faseolina. Sin embargo en aquellas construcciones en que *sfa8* está bajo la regulación del promotor de faseolina pero con el terminador de arceolina, se observa la acumulación de SFA8 tanto en las líneas de las construcciones sin KDEL (a2 y a4 de pFSAA8) como en la línea ak3, en la cual la secuencia SFA8 posee la secuencia de retención en retículo.

Al comparar con el programa Image Master, la intensidad de las bandas detectadas en éstas líneas transgénicas, se observa que ak3 posee una intensidad 1,4; 1,5 y 1,3 veces mayor que v3, v7 y v11 respectivamente, que corresponden a las otras líneas que presentan mayor acumulación de SFA8 (Figura 12), pero cabe mencionar

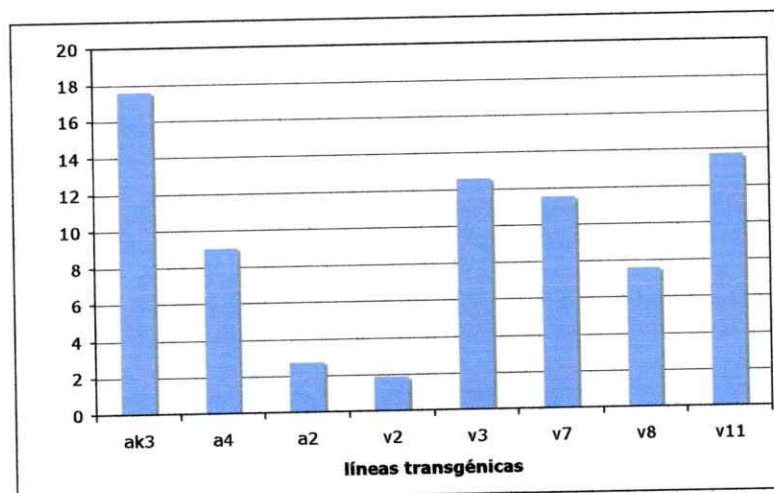


Figura 12. Intensidades relativas de las bandas correspondientes a la proteína SFA8 del *western blot* de las diferentes líneas transgénicas.

Mediante el programa Image Master se calculó las intensidades relativas de las bandas obtenidas en el *western blot* contra SFA8 de las líneas transgénicas ak3, a4, a2, v2, v3, v7, v8 y v11. Este ensayo presenta un n=1.

También se realizó un análisis por *western blot* con la fracción proteica insoluble de las semillas transgénicas y se obtuvieron los mismos resultados y las mismas tendencias que en el caso de los sobrenadantes (resultado no mostrado).

3.6 Estudios de regeneración y transformación de explantes de lupino

Como una primera etapa hacia el desarrollo de transformación en lupino, se estandarizó el protocolo de regeneración de explantes de lupino preparados a partir del eje embrionario de semillas germinadas, para lo cual se utilizó el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Como se observa en la Figura 13, se logró regenerar plántulas de lupino, pero solo el tallo y las hojas, ya que a pesar de mantenerse éstas en medio de generación de raíz, no se pudo obtener plántulas con el medio utilizado.

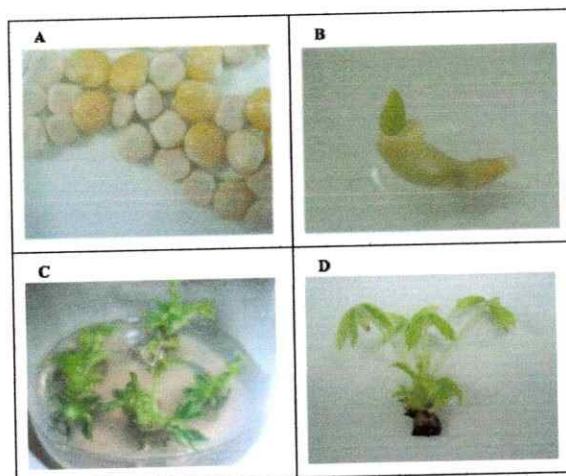


Figura 13. Etapas de la regeneración de explantes de lupino.

(A) Semillas estériles de las cuales se obtuvieron los explantes. (B) Explantes de lupino obtenido a partir de semillas germinadas en medio de co-cultivo. (C y D) Explantes de lupino luego de 5 semanas en medio de germinación.

También se intentó la transformación de estos explantes mediante la infección con *A. tumefaciens* de la cepa LBA4404, con el vector binario pCAMBIA1305.1, que posee la resistencia a higromicina, que se utilizó en una concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ para la selección de las transformantes. Como se puede observar en la Figura 14, luego de 5 semanas en el medio de germinación, se pueden observar que 2 plántulas de un total de 130 sobrevivieron en la presencia del antibiótico (Figura 14 A) de las cuales una (plántula 1) presenta un mayor crecimiento que la otra (plántula 2). Mientras que las plántulas control (no transformadas), se observan necróticas y de una coloración negra, lo que da cuenta de la sensibilidad al antibiótico. Solo una plántula presenta una coloración verde en el callo (Figura 14 B, indicada con la flecha), en una zona donde no tiene contacto con el medio con el antibiótico, y que carece de desarrollo de tallo.

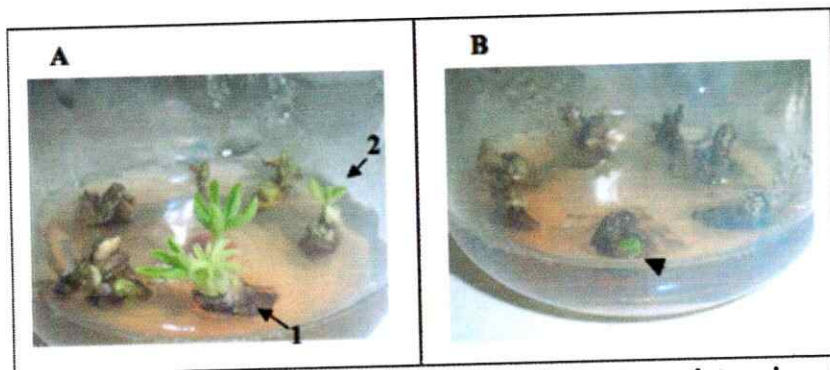


Figura 14. Plántulas de lupino transformadas con gen de resistencia a higromicina luego de 5 semanas en medio de germinación.

Plántulas de lupino transformadas. El antibiótico higromicina se utilizó a una concentración de $75\mu\text{g/ml}$. En (A) se observan las plántulas transformadas, la flecha 1 corresponde a la plántula 1 y la flecha 2 corresponde a la plántula 2. En (B) se muestran las plántulas control sin transformar, la flecha indica la región verde presente en uno de los callos.

Con la finalidad de corroborar si estas 2 plántulas resistentes al antibiótico estaban efectivamente transformadas, se cortó una región del callo para hacer una extracción de ADN genómico, y analizar la presencia del gen reportero dentro de éste. Además se realizó una reacción de PCR como control utilizando el partidor sentido de el gen reportero gus y un partidor antisentido en la región del vector que no se integra al genoma (pCAMBIA R), para descartar que la amplificación se deba a la presencia del vector circulante. Los resultados se pueden observar en la Figura 15, donde en el carril 2, correspondientes a la plántula de mayor crecimiento (plántula 1), se observa una banda del tamaño esperado (570 pares de bases), que también se observa en el control positivo, y que está ausente tanto en la otra plántula resistente (plántula 2) como en la silvestre sin transformar. Los controles con los partidores fuera de la región de integración dieron negativos(Figura 15, carril 6), confirmando que esta plántula estaba

efectivamente transformada, ya que la banda esperada corresponde a 1.300 pares de bases.

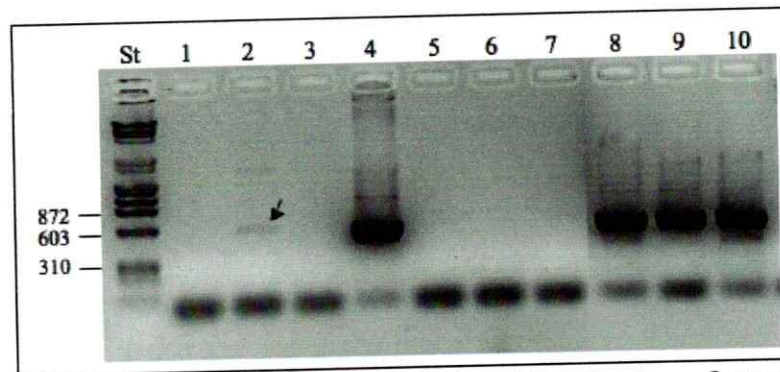


Figura 15. Análisis por PCR de los callos de las plántulas transformadas 1 y 2 y de una planta silvestre sin transformar.

Los callos de las plántulas transformadas fueron analizadas mediante PCR para la presencia del gen *gusplus* presente el plasmidio pCAMBIA 1305.1. En los carriles 1, 2, 3 y 4 se utilizaron partidores internos del gen de la β -glucuronidasa. En los carriles 5, 6, 7 se utilizó el partidore sentido del mismo gen y un partidore antisentido, complementario a la secuencia del vector, pero que queda fuera de la región de inserción en el genoma (pCAMBIA R). En los carriles 8, 9 y 10 se utilizaron partidores del gen 18S como control. Los carriles 1, 5 y 8 corresponde a la plántula n°2. Los carriles 2, 6 y 9 a la plántula 1. Los carriles 3, 7 y 10 a la plántula silvestre. El carril 4 al vector pCAMBIA1305.1. St corresponde al estándar de tamaño de ADN.

A pesar de que se confirmó de que el callo del cual se originó ésta plántula estaba transformado, no se logró regenerar una planta completa, ya que entró en un proceso de necrosis al igual que las otras luego de algunas semanas, lo que podría significar que a pesar de que el callo estaba transformado, la plántula generada no lo estaba.

4. Discusión

En la literatura hay ejemplos de transformación de varias especies de plantas con el fin de incrementar el valor nutritivo de la semilla. En todos los estudios descritos se ha intentado aumentar la cantidad de metionina presente (Tabe y col., 1995; Molvig y col., 1997; Tu y col., 1998; Tai y col., 1999; Lai & Messing, 2002; Shen y col., 2002; Lee y col., 2003), ya que éste es el principal aminoácido esencial del que carecen muchas plantas. Por esta razón, los genes que codifican para genes abundantes en este aminoácido son el blanco principal para aumentar el valor nutritivo de semillas de legumbres para reemplazar la harina de pescado, como es el caso del lupino. Pero al evaluar semillas de líneas transgénicas con un mayor contenido de metionina como alimento para peces, aún se observa una diferencia significativa en el crecimiento de los peces al ser alimentados con harina de semilla en comparación con harina de pescado, diferencia que se estrecha al añadir metionina al alimento de origen vegetal (Glencross y col., 2003), lo que sugiere que el nivel de metionina presente en estas semillas es aún insuficiente.

4.1 Construcciones binarias

En esta memoria, con el fin de lograr un mayor incremento de la cantidad de metionina presente en la semilla, a partir de ADN genómico se aisló el gen de la albúmina de girasol *sfa8*, que codifica para una proteína rica en aminoácidos sulfurados (16 metioninas y 8 cisteínas en un total de 103 aminoácidos, anexo 2). El gen fue utilizado para desarrollar construcciones que permitieran evaluar su expresión bajo el control de

diferentes promotores y terminadores. Como ha sido descrito anteriormente (Tabe y col., 1995), el gen de *sfa8* de girasol contiene un solo intrón, que en esta memoria se determinó que tenía 301 pares de bases y que poseía la secuencia consenso para su procesamiento (ver Anexo 1) según lo descrito en literatura (Lewin, 2000). Está descrito también que para la expresión de proteínas recombinantes, la presencia de intrones puede incrementar la estabilidad de los ARNm, lo que podría significar un incremento en la expresión de éstas (Kusnadi, 1997), razón por la cual se trabajó con el gen y no con el ADNc. Otro factor que se analizó fue el efecto que la secuencia de retención a retículo, KDEL, pueda tener sobre la acumulación de proteínas, ya que la proteína SFA8 en girasol, se acumula en los cuerpos proteicos como un heterodímero. Se ha descrito también, que la acumulación de proteínas en el retículo endoplásmico puede aumentar los niveles de acumulación de proteína en la semilla como en la hoja (Schouten y col., 1996). Por lo que, para analizar el efecto de esta secuencia, se incorporó el segmento codificador de la secuencia KDEL en la región 3' de la secuencia codificante del gen *sfa8* mediante PCR.

En relación a las secuencias reguladoras, se evaluaron promotores específicos de semilla y secuencias terminadoras que antes habían sido descritas como altamente eficiente. En este sentido, la secuencia promotora 5' UTR del gen de vicilina y la secuencia terminadora 3' UTR de este mismo gen, clonadas en este trabajo presentaron 99% de identidad con las secuencias encontradas en las bases de datos. La secuencia promotora del gen de faseolina se utilizó con la región terminadora 3' UTR de arceolina, ya que según lo descrito en la literatura (De Jaeger y col., 2002), el uso conjunto de éstas ha resultado en altos niveles de expresión de una proteína recombinante en semillas de *A.*

thaliana, llegando a ser sobre un 36% de la proteína total de la semilla. La secuencia aislada posee más de 99% de identidad con la secuencia promotora antes reportada. La región terminadora 3' UTR de 637 pares de bases aislada en este trabajo en cambio, posee sólo un 72,3% de identidad con la secuencia de la base de datos. Esta diferencia es lo suficientemente amplia como para decir que no corresponde a la secuencia terminadora de la región 3'UTR del gen de arceolina usada anteriormente en De Jaeger y col. (2002). Esta secuencia probablemente corresponde a la secuencia 3'UTR de otro gen de arceolina, ya que hay descritos al menos 7 secuencias correspondientes a genes de arceolina. Por lo tanto, decidimos probarla como secuencia terminadora considerando que ésta posee 2 señales de poliadenilación AATAAT. También se ha descrito que al utilizar el promotor y la secuencia terminadora del gen de faseolina se produce una elevada acumulación de proteína heteróloga (van der Geest, 1994; De Jaeger y col., 2002). A pesar de que está descrito que la secuencia 3'UTR del gen de faseolina contiene 1.227 pares de base, solo se encontró en la base de datos la primera parte de esta secuencia, correspondiente a 142 pares de bases. La secuencia clonada posee un 100% de identidad con la región correspondiente de esta secuencia, que es notablemente más pequeña que la descrita por van der Geest y col. (1994).

Los elevados niveles de sobreexpresión obtenidos con el promotor de faseolina en los estudios citados han sido adjudicados a la presencia en este promotor de múltiples motivos de unión a matriz (MAR) (van der Geest, 1994; van der Geest & Hall, 1996; van der Geest & Hall, 1997). Al hacer un análisis bioinformático de la secuencia del promotor de faseolina aislada, se encontraron todos los motivos descritos para esta región, como lo son el motivo de desenrollamiento, el sitio de unión de topoisomerasa y

la secuencia MAR. Al hacer este mismo análisis para la secuencia clonada correspondiente al promotor de vicilina, no se encontró ninguna de estas secuencias. Pero según los resultados obtenidos en este trabajo, el promotor de vicilina debe poseer otros motivos, diferentes a los descritos para el promotor de arceolina, ya que se puede obtener elevados niveles de expresión del transgen con este promotor.

4.2 Transformación de *A. thaliana*

A. thaliana es un modelo conocido y ampliamente utilizado para evaluar la transformación de plantas. Por esto resulta útil evaluar las construcciones creadas con las diferentes secuencias reguladoras en *A. thaliana* para seleccionar aquella que exprese la proteína exógena en forma más eficiente y probarla posteriormente en lupino. El proceso de transformación de *A. thaliana* con los diferentes vectores binarios construidos con el gen de albúmina de girasol *sfa8*, tuvo una eficiencia total de 0,57%, la que se encuentra dentro del rango de eficiencia establecido por Clough (Clough & Bent, 1998). A pesar de que no se lograron plantas resistentes a higromicina con el vector comercial solo, para poder ser utilizadas como control de transformación, no se aprecian alteraciones fenotípicas entre las diferentes plantas transgénicas y las silvestres. Sin embargo, será necesario a futuro seguir intentando la transformación de *A. thaliana* con el vector solo, con el fin de confirmar que no existen alteraciones debido a la presencia de los genes *gus* y de resistencia a higromicina.

En la selección de las semillas correspondientes a las plantas transformadas (Figura 6) se puede observar que todas las plántulas tiene una coloración verde, pero las plántulas resistentes poseen un mayor crecimiento que las sensibles. Esto se debe a que la

concentración del antibiótico higromicina utilizada (7,5µg/ml) es relativamente baja, ya que a concentraciones mayores las semillas no germinan. Esta baja concentración de antibiotico utilizada podría llevar a un error en la selección, aumentando el número de falsos positivos, lo que podría explicar la diferencia entre el número de plántulas seleccionadas resistentes a higromicina (40 plántulas), y el número de líneas confirmadas por PCR (21 plántulas) (Tabla 2).

Las plántulas resistentes a higromicina se corroboraron tanto por el ensayo de GUS como por PCR para el gen *sfa8*, resultados que se resumen en la Tabla 2, donde se puede observar que el ensayo de GUS muestra una sobreestimación de las plántulas transgénicas en comparación con la reacción de PCR, obteniendo en total 8 falsos positivos entre todas las líneas transgénicas. Esto se puede deber a un error al seleccionar las plántulas positivas, ya que está descrito que puede haber una expresión endógena del gen de la β -glucuronidasa en hojas y cultivos celulares de especies de plantas como se ha visto en *N. tabacum*, *O. sativa*, *B. napus*, *P. vulgaris* y *Z. mays*, que da como resultado una coloración tenue en las hojas (Kosugi y col., 1990).

4.3 Expresión de SFA8 en las líneas transgénicas

Para evaluar la acumulación de SFA8 en las líneas transgénicas se requería de anticuerpos policlonales contra la albúmina SFA8. Para producirlos se debió expresar en *E. coli* la proteína recombinante. Con este fin se clonó el ADNc del gen *sfa8* a partir de ARN, obteniendo una secuencia de 423 pares de base, donde solo se encontró 2 diferencias respecto a la secuencia de la base de datos. La primera de éstas es en la base

48 de la secuencia nucleotídica, y la segunda es en la base 61, que provoca un cambio en el aminoácido 21 de su secuencia aminoácida. Las 2 sustituciones en el ADNc encontradas coinciden con 2 de las 4 mutaciones encontradas en el clonamiento de la secuencia de *sfa8* a partir de ADNg. Considerando que las extracciones de ADN y ARN se hicieron a partir de semillas de distintas cosechas, se puede decir que éstas diferencias no corresponden a mutaciones producidas por la reacción de PCR, sino que son cambios propios de la secuencia del gen *sfa8* de la variedad de girasol utilizada, sin embargo, las otras mutaciones encontradas en la secuencia genómica podrían ser producidas por la reacción de PCR puesto que no estaban presentes en la secuencia obtenida a partir del ADNc. Pero solo una de ellas produce un cambio a nivel aminoácido de una prolina por una alanina.

Se generaron anticuerpos policlonales contra la proteína SFA8 obtenidas a partir de ADNc expresada en *E. coli*, que tiene un peso molecular de 19,5 kDa, correspondiente a los 141 aminoácidos de la secuencia codificante, más 32 aminoácidos fusionados en su extremo amino, codificados en el vector pET-28a. Al evaluar el anticuerpo generado se demostró que éste reconoce en girasol una proteína que posee el peso molecular descrito para SFA8 en la literatura (12,133 kDa). La diferencia entre el tamaño esperado para la secuencia de 141 aminoácidos (16,2 kDa) y la proteína nativa detectada en semilla de girasol así como las líneas transgénicas, se explica porque la proteína SFA8 es sintetizada como una pre-pro-proteína de 141 aminoácidos y sufre un procesamiento en el cual se remueve consecutivamente una secuencia de 25 aminoácidos y otra de 13 del extremo N-terminal, que corresponden a señales hidrofóbicas (Kortt y col., 1991). Por lo tanto, luego del procesamiento queda una proteína que consiste en una cadena de 103

aminoácidos correspondientes a un peso molecular de 12,133 kDa, que posee 16 residuos de metionina y 8 de cisteína.

El analizar la acumulación de la proteína SFA8 con el anticuerpo policlonal en los extractos de proteína soluble de las líneas transgénicas correspondientes a la T₂, se comprobó que las líneas v2, v3, v7, v8 y v11, a2, a4 y ak3 producían la proteína heteróloga. Estos corresponden a líneas con el promotor y terminador de vicilina (v2, v3, v7, v8 y v11) y a líneas con el promotor de faseolina y 3'UTR de arceolina (a2, a4 y ak3). En las líneas que contenían el promotor y la secuencias terminadora de faseolina, no se observó acumulación de SFA8. La ausencia de SFA8 en estas líneas aparentemente se debería a la secuencia terminadora 3' UTR de faseolina, ya que en las líneas que contienen el promotor de faseolina y la secuencia terminadora 3' UTR de arceolina, sí se observa acumulación de la proteína recombinante, por lo que el promotor no sería el problema. Esto puede deberse a que la región de la secuencia terminadora de faseolina utilizada no era lo suficientemente extensa o no posee los sitios necesarios de una secuencia 3' UTR como son la señal de poliadenilación o motivos similares a YGTGTTY (donde Y corresponden a bases pirimídicas), que está descrito que otorgan estabilidad al mensajero aumentando así los niveles de expresión y acumulación de la proteína de interés (Ingelbrecht y col., 1989). A pesar de que la secuencia 3' UTR de faseolina clonada contiene más de una señal de poliadenilación, la presencia de éstas podría no ser suficiente para la expresión de sfa8, lo que se ha reportado anteriormente en otros trabajos (Ingelbrecht y col., 1989; Li y col., 1997).

Dentro de las líneas que contenían el promotor de vicilina, sólo se vió la expresión de la proteína recombinante en las líneas que no expresan la secuencia KDEL. Dentro de éstas

líneas se vió variación en los niveles de expresión, siendo las líneas v3, v7 y v11 que muestran una mayor acumulación de la proteína recombinante. La variación de la expresión entre las líneas que contienen la misma construcción es esperable, ya que la región del genoma donde se inserta el gen de interés afecta directamente en los niveles de expresión, dependiendo de si se trata de una zona del genoma altamente activa o no. Por otro lado, el no haber encontrado acumulación de la proteína recombinante en ninguna de las líneas que expresan la secuencia KDEL, no es directamente atribuible a la presencia de ésta, ya que esta misma construcción fue descrita anteriormente con la misma secuencia KDEL observándose una notable acumulación de la proteína (Molvig y col., 1997). Además, en este trabajo se observó que la línea ak3 expresión del gen sfa8 con la señal KDEL bajo la regulación de otro promotor. Aún cuando se puede producir silenciamiento génico de genes exógenos (Vaucheret y col., 2001), éste no parecería ser el caso para esta secuencia con señal KDEL que es expresada bajo otros promotores. Por lo tanto, es necesario analizar más líneas transgénicas correspondientes a esta construcción (solo se obtuvieron 3 líneas) para determinar en forma más concluyente el efecto de la señal KDEL sobre la expresión bajo el promotor de vicilina.

En las líneas que contienen la secuencia promotora de faseolina y la secuencia terminadora 3' UTR de arceolina se encontró acumulación de la proteína SFA8 tanto cuando contenía la secuencia KDEL (ak3) como en las que no la contenían (a2 y a4). De las seis líneas bajo estas secuencias reguladoras solo tres presentan acumulación de la proteína recombinante, lo que nuevamente se puede explicar por la posición del genoma donde se encuentran los insertos, y también por la estructura cromosómica que ha demostrado ser muy importante para el promotor de faseolina (Li y col., 2002). La línea

ak3 es la única con la secuencia de retención en retículo KDEL en la que se observó acumulación de SFA8. En ésta, como se observa en la Figura 11, carril ak3, se obtuvieron 2 bandas, una de ellas corresponde a la proteína procesada de 12,133 kDa y otra de 16,2 kDa, que sería muy semejante al peso molecular de la secuencia sin procesar, es decir, de la proteína de 141 aminoácidos. Podría considerarse la posibilidad entonces de que al destinarse la proteína al retículo, el procesamiento de sus señales hidrofóbicas de 25 y 13 aminoácidos, no se realiza de forma eficiente. Es posible además que la proteína, al ser destinada a retículo, sufra modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones, que se ha demostrado que pueden ocurrir con proteínas que se destinan a retículo endoplasmático, siempre que éstas tengan sitios de glicosilación (Iturriaga y col., 1989; Kusnadi, 1997; Streatfield, 2007). La proteína SFA8 posee al menos 3 posibles sitios de glicosilación, lo que respalda esta hipótesis.

Al comparar la acumulación de SFA8 en las líneas en que se observa mayor expresión, el programa Image Master arroja que en la línea ak3 la acumulación es 2 veces mayor que en la línea a4. En relación a las líneas v3, v7 y v11 se encontró que la acumulación en la línea ak3 es 1,4; 1,5 y 1,3 veces mayor. Aunque esta diferencia no es tan significativa, la tendencia observada concuerda con lo descrito para el efecto de la secuencia KDEL en la literatura (Schouten y col., 1996), además, cabe mencionar que el *western blot* se realizó solo una vez debido a que se tenía muy poco tejido, por lo que el *n* del experimento fue uno. Es interesante mencionar que SFA8 es una proteína que se acumula en cuerpos proteicos en la semilla y que por lo tanto la secuencia KDEL podría afectar negativamente en esta acumulación al impedir el tránsito de ésta a la vacuola, acumulándose en el retículo. Sin embargo, como la acumulación ocurre normalmente en

forma de heterodimero, desconocemos si otra conformación de esta proteína tendría algún efecto en la acumulación en los cuerpos proteicos y en ese sentido la secuencia KDEL podría afectar en forma positiva a la acumulación. Por lo tanto, es fundamental analizar la localización de la proteína SFA8 en las diferentes líneas transgénicas, para entender mejor el efecto de las diferentes secuencias analizadas en esta tesis.

Si bien los resultados son interesantes, estos solo muestran una tendencia que será necesario evaluar con más líneas transgénicas y una vez seleccionadas las semillas de las generaciones T₂ o T₃, para asegurar que se está trabajando con líneas homocigotas, ya que estas variaciones podrían ser el reflejo de diferencias en la segregación de semillas transgénicas y silvestres de las distintas líneas obtenidas. Se ha demostrado en trabajos anteriores que la diferencia de acumulación de las proteínas se logra evaluar completamente sólo después de tener líneas homocigotas (Pigeaire & Fletcher, 1997). Sólo entonces se podría comparar las secuencias reguladoras entre sí y con los datos descritos en la literatura. Será interesante además determinar si las diferencias observadas en este trabajo se deben a una mayor estabilidad de la proteína o solo reflejan diferencias de la transcripción del gen *sfa8*.

4.4 Transformación y regeneración de explantes de lupino

Considerando que el fin último del proyecto es probar la construcción más eficiente en lupino, se intentó establecer protocolos de regeneración de explantes y transformación de esta legumbre. Respecto a la regeneración de explantes, se logró obtener plántulas de lupino (Figura 13) que regeneraron a partir del eje embrionario de semillas germinadas, pero no se logró que éstas desarrollaran raíz. Se ha descrito que en esta especie el

enraizamiento ocurre en un bajo porcentaje (Molvig y col., 1997; Pigeaire & Fletcher, 1997). En lupino, para poder regenerar una planta completa se podría realizar un injerto de tallo en una planta silvestre, del cual se forma una quimera, de la que se obtienen semillas que van a dar origen a plantas transgénicas. Pero esto no se llevó a cabo en esta memoria y se propone como trabajo futuro en el laboratorio. Otro protocolo que podría ser evaluado es el descrito recientemente (Arnao y col., 2007), donde se analiza el efecto de la melatonina y ácido 3-indol acético en la regeneración de raíz en hipocotilos de *Lupinus albus*.

Como una aproximación al método de transformación en lupino, se transformaron explantes de eje embrionario con el vector pCAMBIA1305.1 mediante la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, aún cuando no ha sido descrito la utilización de esta cepa para la transformación en lupino. En este experimento se obtuvieron 2 plántulas resistentes a higromicina, donde una de ellas presentaba un mayor crecimiento. Si bien, no se logró regenerar ninguna de estas plántulas transgénicas, si se pudo comprobar mediante PCR, que el callo del cual se obtuvo la plántula de mayor crecimiento, contenía en su ADN el gen de la β -glucuronidasa. También se pudo observar que los controles negativos (plántulas silvestres), si bien son sensibles a higromicina, se requiere de mucho tiempo para que todos muestren un fenotipo de plántulas sensibles. Esto estaría dando cuenta de que la higromicina no es un buen antibiótico de selección en esta legumbre, lo que ha sido descrito para otras legumbres (Saini & Jaiwal, 2005). Se deberá probar la sensibilidad de lupino de otros antibióticos y establecer las concentraciones óptimas de éste para experimentos futuros, así como el uso de otras cepas de *A.*

tumefaciens, en especial unas ya probadas en lupino (*A. tumefaciens* AGL0). En relación al método de transformación, el protocolo utilizado aunque arrojó resultados positivos mostró una eficiencia de transformación muy baja. A futuro será necesario probar otros protocolos como el uso de biobalística (Droste, 2000), transformación *in planta* con *A. tumefaciens* (Trieu y col., 2000; Kojima y col., 2004) o bien transformar con otras bacterias descritas como *Rhizobium sp* (Broothaerts y col., 2005) para luego seleccionar el protocolo que tenga una mayor eficiencia en lupino.

5. Conclusiones

- Se aislaron las secuencias promotoras y terminadoras 3'UTR de los genes de faseolina y vicilina, cuyas secuencias nucleotídicas poseen sobre un 99% de identidad con las secuencias descritas en las bases de datos. También se aisló la secuencia terminadora 3'UTR del gen de arceolina, cuya secuencia posee una identidad del 72,6% con lo descrito en las bases de datos.
- Se aisló el gen de albúmina de girasol *sfa8*, que posee un intrón de 302 pares de bases, y cuya secuencia nucleotídica y aminoacídica posee sobre un 99% de identidad con la secuencia descrita en la base de datos.
- Se construyeron 6 diferentes vectores binarios en la que el gen *sfa8* está bajo la regulación de las distintas secuencias promotoras y terminadoras aisladas.
- Se obtuvieron plantas transgénicas de *A. thaliana* con todos los vectores binarios construidos.
- Se generó un anticuerpo policlonal que reconoce tanto la albúmina de girasol SFA8 nativa como la recombinante, y que permitió evaluar la acumulación de SFA8 en las plantas transgénica de *A. thaliana*.
- La mayor acumulación de SFA8 corresponde a una línea en la que *sfa8* tiene la señal KDEL, y está bajo el control del promotor de faseolina y terminador 3'UTR de arceolina.
- En las líneas que carecen de la señal KDEL, la mayor acumulación de SFA8 se observa en las líneas bajo la regulación del promotor y secuencia terminadora de vicilina.

- Se regeneraron plántulas de lupino a partir de explantes de eje embrionario de semillas germinadas, sin embargo no se logró que éstas desarrollaran raíz.
- Se transformaron explantes de lupino de los cuales se obtuvieron callos transformados que dieron origen a plántulas resistentes a higromicina, pero no se logró que éstas regeneraran.

6. Proyecciones y trabajo futuro

- Selección de un mayor número de plantas transgénicas para poder tener un n mayor que permita comparar los distintos vectores construídos entre sí y con datos encontrados en la literatura.
- Seguir seleccionando semillas de las generaciones T₂ y T₃ de las líneas transgénicas que expresan SFA8 con el fin de obtener líneas homocigotas para asegurar que todas las semillas analizadas tengan una copia del gen *sfa8*.
- Aislar genes de otras proteínas vegetales que no hayan sido utilizados con anterioridad, que posean un mayor contenido de metionina que la albúmina de girasol y comparar sus niveles de acumulación ya sea bajo las secuencias reguladoras utilizadas en éste trabajo u otras equivalentes.
- Continuar la estandarización tanto del método de regeneración de plantas como de transformación en lupino.

7. Referencias

Aqua (2007). Estadísticas de acuicultura y pesca, balance del sector acuícola-pesquero. 135-140.

Arnao, M. and Hernández-Ruiz, J. (2007). Melatonin promotes adventitious- and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. *J. Pineal Res.* 42: 147-152.

Barletta, L. (2002). Importancia de la proteína en los peces. *Veternet*.

Broothaerts, W., Mitchell, H. J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L. M., Yang, W., Mayer, J. E., Roa-Rodriguez, C. and Jefferson, R. A. (2005). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433: 629-633.

Burzio, V. A., Silva, T., Pardo, J. and Burzio, L. O. (1996). Mussel adhesive enhances the immobilization of human chorionic gonadotrophin to a solid support. *Anal. Biochem.* 241: 190-194.

Chang S., P. J. a. C. J. (1993). A Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.

Chen, H., Nelson, R. S. and Sherwood, J. L. (1994). Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotechniques* 16: 664-670.

Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.

De Jaeger, G., Scheffer, S., Jacobs, A., Zambre, M., Zobell, O., Goossens, A., Depicker, A. and Angenon, G. (2002). Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat. Biotechnol.* 20: 1265-1268.

Droste, A., Pasquali, G. and Bodanese-Zanettini, M. H. (2000). Integrated bombardment and *Agrobacterium* transformation system: an alternative method for soybean transformation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 51-59.

Farhangi, M. C., G.C. (2001). Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). *Aquaculture Res.* 32: 329-340.

Glencross, B., C., J., Hawkins, W., Kissil, G. W. M. and Peterson, D. (2003). Evaluation of the feed value of a transgenic strain of the narrow-leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) in the diet of the marine fish, *Pagrus auratus*. *Aquaculture Nutr.* 9: 197-306.

- Ingelbrecht, I. L., Herman, L. M., Dekeyser, R. A., Van Montagu, M. C. and Depicker, A. G. (1989). Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell* 1: 671-680.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Iturriaga, G., Jefferson, R. A. and Bevan, M. W. (1989). Endoplasmic reticulum targeting and glycosylation of hybrid proteins in transgenic tobacco. *Plant Cell* 1: 381-390.
- Jackson, A. J., Capper, B. S. and Matty, A. J. (1982). Evaluation of some plant proteins in complete diets for the tilapia (*Sarotherodon mossambicus*). *Aquaculture* 27: 97-109.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987). Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Kojima, M., Shioiri, H., Nogawa, M., Nozue, M., Matsumoto, D., Wada, A., Saiki, Y. and Kiguchi, K. (2004). In planta transformation of kenaf plants (*Hibiscus cannabinus* var. aokawa No. 3) by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 136-139.
- Kortt, A. A., Caldwell, J. B., Lilley, G. G. and Higgins, T. J. (1991). Amino acid and cDNA sequences of a methionine-rich 2S protein from sunflower seed (*Helianthus annuus* L.). *Eur. J. Biochem.* 195: 329-334.
- Kosugi, S., Ohashi, Y., Nakajima, K. and Arai, Y. (1990). An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Science* 70: 133-140.
- Kusnadi, A. R., Nikolov, Z.L. and Howard, J.A. (1997). Production of Recombinant Proteins in Transgenic Plants: Practical Considerations. *Biotechnology and Bioengineering* 56: 473-484.
- Lacorte, C., Aragao, F., Almeida, E. R., Mansur, E. and Rech, E. L. (1997). Transient expression of GUS and the 2S albumin gene from Brazil nut in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed explants using particle bombardment. *Plant Cell Reports* 16: 619-623.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lai, J. and Messing, J. (2002). Increasing maize seed methionine by mRNA stability. *Plant J.* 30: 395-402.

Lee, T. T., Wang, M. M., Hou, R. C., Chen, L. J., Su, R. C., Wang, C. S. and Tzen, J. T. (2003). Enhanced methionine and cysteine levels in transgenic rice seeds by the accumulation of sesame 2S albumin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 1699-1705.

Lewin, B. (2000). *Genes VII*, Oxford University Press Inc.

Li, G., Chandrasekharan, M., Wolffe, A. and Hall, T. (2001) Chromatin structure and phaseolin gene regulation. *Plant Mol. Biol.* 46, 212-129.

Li, Q. and Hunt, A. G. (1997) The polyadenylation of RNA in plants. *Plant Physiol.* 115: 321-325.

Molvig, L., Tabe, L. M., Eggum, B. O., Moore, A. E., Craig, S., Spencer, D. and Higgins, T. J. (1997). Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94: 8393-8398.

Muntz, K., Christov, V., Saalbach, G., Saalbach, I., Waddell, D., Pickardt, T., Schieder, O. and Wustenhagen, T. (1998). Genetic engineering for high methionine grain legumes. *Nahrung* 42: 125-127.

Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H. and Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1024.

Ogunji, J. O. (2004). Alternative protein sources in diets for farmed tilapia. *Nutrition Abstracts and Reviews: Series B* 74: 23N-32N.

Pigeaire, A., Abernethy, D., Smith, P.M., Simpson, K., and Fletcher, N., Lu, C., Atkins, C.A. & Cornish, E. (1997). Transformation of a grain legume (*Lupinus angustifolius* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apices. *Molecular Breeding* 3: 341-349.

Prochile (2007). http://www.prochile.cl/ayesen/ver_noticia.php?IdNoticia=307

Saini, R. and Jaiwal, P. K. (2005). Transformation of a recalcitrant grain legume, *Vigna mungo* L. Hepper, using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apical meristem cultures. *Plant Cell Rep.* 24: 164-171.

Schouten, A., Roosien, J., van Engelen, F. A., de Jong, G. A., Borst-Vrens, A. W., Zilverentant, J. F., Bosch, D., Stiekema, W. J., Gommers, F. J., Schots, A. and Bakker, J. (1996). The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain

antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 30: 781-793.

Serrano, E. (2004). Reemplazo parcial de harina de pescado por harina de lupino blanco (*Lupinus albus*) en dietas extruidas para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): efectos sobre los índices productivos y la composición de ácidos grasos en el músculo, Universidad Católica de Temuco.

Shen, B., Li, C. and Tarczynski, M. C. (2002). High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *Arabidopsis* S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. *Plant J.* 29: 371-380.

Streatfield, S. J. (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol. J.* 5: 2-15.

Tabe, L. M., Wardley-Richardson, T., Ceriotti, A., Aryan, A., McNabb, W., Moore, A. and Higgins, T. J. (1995). A biotechnological approach to improving the nutritive value of alfalfa. *J. Anim. Sci.* 73: 2752-2759.

Tai, S. S., Wu, L. S., Chen, E. C. and Tzen, J. T. (1999). Molecular cloning of 11S globulin and 2S albumin, the two major seed storage proteins in sesame. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4932-4938.

Trieu, A. T., Burleigh, S. H., Kardailsky, I. V., Maldonado-Mendoza, I. E., Versaw, W. K., Blaylock, L. A., Shin, H., Chiou, T. J., Katagi, H., Dewbre, G. R., Weigel, D. and Harrison, M. J. (2000). Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J.* 22: 531-541.

Tu, H. M., Godfrey, L. W. and Sun, S. S. (1998). Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato. *Plant Mol. Biol.* 37: 829-838.

van der Geest, A. H. and Hall, T. C. (1996). A 68 bp element of the beta-phaseolin promoter functions as a seed-specific enhancer. *Plant Mol. Biol.* 32: 579-588.

van der Geest, A. H. and Hall, T. C. (1997). The beta-phaseolin 5' matrix attachment region acts as an enhancer facilitator. *Plant Mol. Biol.* 33: 553-557.

van der Geest, A. H. M., Gerald, E.H., Spiker, S. & Hall, T.C. (1994). The beta phaseolin gene is flanked by matrix attachment regions. *Plant J.* 6: 413-423.

van der Klei, H., Van Damme, J., Casteels, P. and Krebbers, E. (1993). A fifth 2S albumin isoform is present in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 101: 1415-1416.

Vaucheret, H., Beclin, C. and Fagard, M. (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 114: 3083-3091.

Anexo 1

1. Alineamiento de secuencia de albúmina de girasol *sfa8* aislada a partir de ADNg con la secuencia encontrada en la base de datos. En amarillo se muestra el alineamiento de la región codificante, en verde las mutaciones puntuales de la secuencia aislada y en rojo las regiones de procesamiento de ARN.

		1	45
SFA8 ADNg	(1)	ATGGCAAGGTTTTTCGATCGTGTTTGCAGCAGCAGGAGTACTCCTC	
SFA8 X56686	(1)	ATGGCAAGGTTTTTCGATCGTGTTTGCAGCAGCAGGAGTACTCCTC	
		46	90
SFA8 ADNg	(46)	CTCGTAGCCATGGCGGCAGTTTCTGAGGCTTCCACCACAACCATC	
SFA8 X56686	(46)	CTCGTAGCCATGGCGGCAGTTTCTGAGGCTTCCACCACAACCATC	
		91	135
SFA8 ADNg	(91)	ATCACCACCATCATAGAGGAGAACCCTATGGCAGAGGTAGAACT	
SFA8 X56686	(91)	ATCACCACCATCATAGAGGAGAACCCTATGGCCAGAGGTAGAACT	
		136	180
SFA8 ADNg	(136)	GAATCCGGATGCTATCAGCAGATGGAGGAGGCGGAGATGCTCAAC	
SFA8 X56686	(136)	GAATCCGGATGCTATCAGCAGATGGAGGAGGCGGAGATGCTCAAC	
		181	225
SFA8 ADNg	(181)	CACTGCGGGATGTACCTCATGAAAAATTTAGGTAGCCCTGATTTT	
SFA8 X56686	(181)	CACTGCGGGATGTACCTCATGAAAAATTTAG-----	
		226	270
SFA8 ADNg	(226)	TTTTTGGGGGGAGGCCAGACATACCCCTATATAGAATTAGAGTGG	
SFA8 X56686	(213)	-----	
		271	315
SFA8 ADNg	(271)	TGACGTAACAATTTTAGTAGGGGTACGTTTAGTAAAAACAATAGC	
SFA8 X56686	(213)	-----	
		316	360
SFA8 ADNg	(316)	ATCCTATTGTTTTTACTAAACAATGACGTAACGTACAATANCATC	
SFA8 X56686	(213)	-----	
		361	405
SFA8 ADNg	(361)	CTATTGTACGTTTCCAGCACAACCACCTTTAAAAAAAACAATCACAC	
SFA8 X56686	(213)	-----	
		406	450
SFA8 ADNg	(406)	ACACGCATCATTTAGTTTGTCTACATTTACTACTAACTCACTAATG	
SFA8 X56686	(213)	-----	
		451	495
SFA8 ADNg	(451)	CATGTTGGTAGTTTAAAAGTGCTCGAAGTTTATATGGCCTGTGGT	
SFA8 X56686	(213)	-----	
		496	540
SFA8 ADNg	(496)	GATTTGTTTCTGATCAGGAGAAAGGAGGCAAGTTAGTCCCAGAAT	
SFA8 X56686	(213)	-----GAGAAAGGAGGCAAGTTAGTCCCAGAAT	
		541	585
SFA8 ADNg	(541)	GAGAGAAGAGGATCACAAGCAACTTTGCTGCATGCAACTGAAGAA	
SFA8 X56686	(240)	GAGAGAAGAGGATCACAAGCAACTTTGCTGCATGCAACTGAAGAA	
		586	630
SFA8 ADNg	(586)	CCTAGATGAGAAGTGCATGTGTCCGGCAATCATGATGATGTTGAA	
SFA8 X56686	(285)	CCTAGATGAGAAGTGCATGTGTCCGGCAATCATGATGATGTTGAA	

		631		675
SFA8 ADNc	(631)		CGAACCAATGTGGATAAGGATGCGAGATCAAGTGATGAGCATGGC	
SFA8 X56686	(330)		CGAACCAATGTGGATAAGGATGCGAGATCAAGTGATGAGCATGGC	
		676		720
SFA8 ADNc	(676)		TCATAACCTGCCCATAGAATGCAATCTCATGTCCCAACCATGCCA	
SFA8 X56686	(375)		TCATAACCTGCCCATAGAATGCAATCTCATGTCCCAACCATGCCA	
		721		
SFA8 ADNc	(721)		AATGTA	
SFA8 X56686	(420)		AATGTA	

Anexo 2

2. Alineamiento de secuencia aminoacídica de la albúmina de girasol SFA8 a partir de ADNc con la secuencia encontrada en la base de datos. En verde se muestran las metioninas, en azul las cisternas y en rojo se muestran los aminoácidos cambiados producto de las mutaciones puntuales.

1				40
SFA8 ADNc	(1)		ARFSIVFAAAGVLLVA	AVSEASTTTIITTTIEENPY
SFA8 x56686	(1)		ARFSIVFAAAGVLLVA	AVSEASTTTIITTTIEENPY
		41		80
SFA8 ADNc	(41)		GRGRTEG	CYQMEEAEMLNHCGMYLMKNLGER
SFA8 x56686	(41)		GRGRTEG	CYQMEEAEMLNHCGMYLMKNLGER
		81		120
SFA8 ADNc	(81)		REEDHKQL	CCQLKNLDEKCPAIMEMLNEP
SFA8 x56686	(81)		REEDHKQL	CCQLKNLDEKCPAIMEMLNEP
		121		142
SFA8 ADNc	(121)		VMSAHNLP	IECNLMSQPCOM-
SFA8 x56686	(121)		VMSAHNLP	IECNLMSQPCOM-

Anexo 3

3. Alineamiento de secuencia de región 3' UTR terminadora del gen de *arceolina* con la secuencia encontrada en la base de datos. Presenta un 72,6% de identidad respecto esta.

		1	40
3' arceolina	(1)	-----CTCCCAAACCACTTCACTGTGACAG	
3' arceolina M68913	(1)	AAGATCCTCTAGACTCCCAAAGCCAGCTTCACTGTGACAG	
		41	80
3' arceolina	(28)	TCTCATTCTTCTTTTCTGCTAATAATGTTTCATCTGTCA	
3' arceolina M68913	(41)	TAAACCTTCCTTAAACGCTAATAATGTTTCATCTGTCA	
		81	120
3' arceolina	(68)	CACAAACTAAATAAATAAAATGCAAGC-----	
3' arceolina M68913	(79)	CACAAACTCAATAAATAAAATGGAGCAATAAATAAAAT	
		121	160
3' arceolina	(96)	-----TCATATATTTACACAATCTACACTGCTTATTATT	
3' arceolina M68913	(119)	GGGAGCTCATATATTTACACAATTTACACTGCTTATTATT	
		161	200
3' arceolina	(130)	CACCATGCGTCTTATTAGTGCATAATTTGAAAATATGTA	
3' arceolina M68913	(159)	CACCATGCGCAATTATTCTGCATAATTTCAAAATTTGTC	
		201	240
3' arceolina	(170)	ATTTTTAAAAAGTTTATAATAATGGAAGGATTTATATA	
3' arceolina M68913	(197)	ATTTTTTAAAAGTTTATAATAATTAGAAATATTAATATA	
		241	280
3' arceolina	(209)	AGTTAAAGTATAACATAGAAAAAAAAAGGTAACATTGGTGG	
3' arceolina M68913	(237)	AGTTAAAGTATAACATAGAAAAAAAA-----	
		281	320
3' arceolina	(249)	TAATTACATTAACCTTAGGAAATATAAAC-TAACCTTACT	
3' arceolina M68913	(264)	-----ACATTAATCTTAGGAAATATTACTATAATTTAC	
		321	360
3' arceolina	(288)	CTCACATCTAATTTTTATTAAATTTCTTTCACTTCTCT	
3' arceolina M68913	(299)	CT-----T-----TTTTATCTGAAGAG-TCTA-----	
		361	400
3' arceolina	(328)	TGACATTATTTAACATTTTCATGTATTTTTTTTTCTTGC	
3' arceolina M68913	(320)	-----ATAATTGAGAGATTGACACAAAATATTTATACCAGC	
		401	440
3' arceolina	(368)	TTTCTAACTCTATTAATTTCAAATCGATATATGTTATCA	
3' arceolina M68913	(356)	TCCCT--CTTACCA-----AGAGCTACATTCAGTCTTCG	
		441	480
3' arceolina	(408)	CCACCACTCTAAAAAACCTTTATAATTACTGATACAAA	
3' arceolina M68913	(389)	ACCCCACT--AAGAAATTC-----	
		481	520
3' arceolina	(448)	AAGTTAAATCACGACGGTCATTTTAGTATTAATAACGG	
3' arceolina M68913	(405)	-----	
		521	560
3' arceolina	(488)	TTCTTCTATCGTTGTCTTTCAACATGTAGTCTATTATCTT	
3' arceolina M68913	(405)	-----	
		561	600
3' arceolina	(528)	TAACGGTTCCTTCTATCGTTGTCTTTCAACATGTAGTCTAT	
3' arceolina M68913	(405)	-----	

		601		640
3' arceolina	(568)	TATCTTTAAGCAAAGACAACGGCTATATAACGTTGTGTTA		
3' arceolina M68913	(405)	-----		
		641	661	
3' arceolina	(608)	TATTCAGTCTAAAACAATTGT		
3' arceolina M68913	(405)	-----		

Anexo 4

4. Secuencia aislada correspondiente al promotor del gen de *faseolina*. Presenta un 99,5% de identidad respecto a la base de datos.

1	GAATTCATTG	TACTCCCAGT	ATCATTATAG	FGAAAGTTTT	GGCTCTCTCG
51	CCGGTGGTTT	TTTACCTCTA	TTTAAAGGGG	TTTTCCACCT	AAAAATTCTG
101	GTATCATTCT	CACTTFACTT	GTTACTTTAA	TTTCTCATAA	TCTTGGGTG
151	AAATTATCAC	GCTTCCGCAC	ACGATATCCC	TACAAATTTA	TTATTTGTTA
201	AACATTTTCA	AACCGCATAA	AATTTTATGA	AGTCCCGTCT	ATCTTAATG
251	TAGTCTAACA	TTTTCATATT	GAAATATATA	ATTTACTTAA	TTTAGCGTT
301	GGTAGAAAGC	ATAATGATTT	ATTCTTATTC	TTCTTCATAT	AAATGTTTAA
351	TATACAATAT	AAACAAATTC	TTTACCTTAA	GAAGGATFTC	CCATTTTATA
401	TTTTAAAAAT	ATATTTATCA	AATATTTTTC	AACCACGTAA	ATCTCATAAT
451	AATAAGTTGT	FTCAAAAAGTA	ATAAAAATTTA	ACTCCATAAT	TTTTTTATTC
501	GACTGATCTT	AAAGCAACAC	CCAGTGACAC	AACTAGCCAT	TTTTTCTFTT
551	GAATAAAAAA	ATCCAATTAT	CATTGTATTT	TTTTTATACA	ATGAAAAATTT
601	CACCAAACAA	FGATTTGTGG	TATTTCTGAA	GCAAGTCATG	TTATGCAAAA
651	TTCTATAACT	CCCATTGAC	ACTACGGAAG	TAAGTGAAGA	TCTGCTTTTA
701	CATGCGAGAC	ACATCTTCTA	AAGTAATTTT	AATAATAGTT	ACTATATTCA
751	AGATTCATA	TATCAAATAC	TCAAATTTAC	TTCTAAAAAA	TTAATTAGAT
801	ATAATTAAAA	TATTACTTTT	TTAATTTTAA	GTTTAATTGT	TGAATTTGTG
851	ACTATTGATT	TATTATTCTA	CTATGTTTAA	ATTGTTTTAT	AGATAGTTTA
901	AAGTAAATAT	AAGTAATGTA	GTAGAGTGTT	AGAGTGTTAC	CCTAAACCAT
951	AAACTATAAG	ATTTATGGTG	GACTAATTTT	CATATAFTTC	TTATTGCTTT
1001	TACCTTTTCT	TGGTATGTAA	GTCCGTAACT	AGAATTACTG	TGGGTTGCCA
1051	TGGCACTCTG	TGGTCTTTTG	GTTCATGCAT	GGATGCTTGC	GCAAGAAAAA
1101	GACAAAGAAC	AAAGAAAAAA	GACAAAACAG	AGAGACAAAA	CGCAATCACA
1151	CAACCAACTC	AAATTAGTCA	CTGGCTGATC	AAGATCGCCG	CGTCCATGTA
1201	TGTCTAAATG	CCATGCAAAG	CAACACGTGC	TTAACATGCA	CTTTAATGG
1251	CTCACCATC	TCAACCCACA	CACAAACACA	TTGCCTTTTT	CTTCATCATC
1301	ACCACAACCA	CCTGTATATA	TTCATTCTCT	TCCGCCACCT	CAATTTCTTC
1351	ACTTCAACAC	ACGTCAACCT	GCATATGCGT	GTCATCCCAT	GCCCAAATCT
1401	CCATGCATGT	TCCAACCACC	TTCTCTCTTA	TATAATACCT	ATAAATACCT
1451	CTAATATCAC	TCACTTCTTT	CATCATCCAT	CCATCCAGAG	TACTACTACT
1501	CTACTACTAT	AATACCCCAA	CCCAACTCAT	ATTCAATACT	ACTCTACT

Anexo 5

5. Secuencia aislada correspondiente a la región 3' UTR terminadora del gen de *faseolina*. Presenta un 100% de identidad respecto a la base de datos.

```
1 TAAGTATGAA CTAAAATGCA TGTAGGTGTA AGAGCTCATG GAGAGCATGG
51 AATATTGTAT CCGACCATGT AACAGTATAA TAACTGAGCT CCATCTCACT
101 TCTTCTATGA ATAAACAAAG GATGTTATGA T
```

Anexo 6

6. Secuencia aislada correspondiente al promotor del gen de *vicilina*. Presenta un 99,2% de identidad respecto a la base de datos.

```
1 GATCTTGGTG TGATAAAACA TAATAATTAC TAATATTAAA TTAATATTAG
51 TTTTAAATGT TTTTATTAAA AAATAATTGT ATGTTTATCC TTATTACTCC
101 ATCTTCTCTT TACTAATAAT GCCCTGAGAA TATTGAAATA TTTGGACATG
151 ACAAATATAA CCGTTTAAAT AATTTATCAT CTTTGTGATG GAGAATTATG
201 TAACTATATT TTTTTTAATT GAGGATTGTA ATAAAAGTAG ATTATAATAT
251 ATATTATATT TTTTCTTTTT TAATATATTA AATAAAGTAT AGTATATGTA
301 AAGTAAACGG ATAAATAATA GATAAATAAT TAAATGACAT ATATCTACAA
351 TTACATTTTT ATATATTAAG TATAGTATAG TATATATAAA GTAGACGGAT
401 AAATAATAGA TAGATAATTA AATGACGTAT ATGTACAATT ACATTTTTCA
451 CATGACAAGT ACAAACATAT GCACTTCTAA GTGCAAGTTT ATGGAGTTAT
501 TTGCATGTCT TAGAGCTGGA GCTTGTGTTG TAGGATACAA CACTTGTAA
551 AATTCTCTAG TCAATTCATT AATTCATATA CACATGGCCG AAGACAATAA
601 TAAAGCATCC TCCTTTTCCA TAAGAATGTC CAAATTCATC AAATTCAAAC
651 AAAACTCCAC CACCCAAGTA ATGTTCTTTT CATTTTGCCA CTTCAATTTT
701 GTACATTTTA ACACACGTCC ATATGCATGG CACAACATGG CCAACTGTTG
751 GTGCATGTTA ATTATATAGT TTTATTTTTT ATATCTATAA ATACACTCAT
801 CTCACTGTAC TTTATTCATC CAGAGCGACC AAAGTGAGAT ATTAGTTTCA
851 ATCAAC
```

Anexo 7

7. Secuencia aislada correspondiente a la región 3' UTR terminadora del gen de *vicilina*.
Presenta un 100% de identidad respecto a la base de datos.

```
1   AATGTTTCTT AATGAGTGGG CAAAATACTA TGTATGFATG CTATCAAGAG
51  ATATATCTCA CGGGGAGCAA TGAATAAAAC AATGTTTCTT TATAACTATA
101 ATTATATATC CACTTTTCTA CTATGAATAA ATAAATCAAG AGTATTTTGG
151 TGTTCCTCTT AGATATTATA TTATTTTAAG AAAGTCAATA ACTAAAAGTA
201 CAAAACACTC ATTAAATTTA AACTAATGTA AAGACTTAAT ATCTCATATC
251 CATGATTCAT GATATACAAF CATCAATCAA TTAATA
```