

UCH-FC  
MAG-B  
P222  
C.I



Universidad de Chile  
Escuela de Posgrado  
Departamento de Biología



# “Estudio del metabolismo del sorbitol en *Arabidopsis thaliana.*”

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas.

Facultad de Ciencias

Por  
Roberto Parada Salazar

Director de Tesis: Michael Handford, Ph. D

Diciembre, 2014  
Santiago – Chile

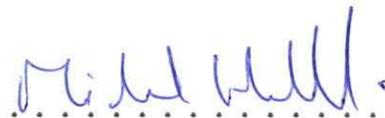
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Roberto Andrés Parada Salazar

Ha sido aprobado por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 21 de Noviembre de 2014.

Director de Tesis:  
Dr. Michael Handford

  
.....

Co-Director de Tesis  
Dr.

.....  


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Lorena Norambuena

  
.....

Dr. Ricardo Cabrera

  
.....

Dr.

.....

Dr.

.....



## Biografía



Nací un 3 de junio del año 1986 en la comuna de Providencia, pero he vivido toda mi vida en Puente Alto. Mi niñez yo diría que fue la típica de un niño de ese tiempo, pasando gran parte del día en la calle jugando con mis amigos. La verdad es que no sé bien en qué momento me empezó a interesar la biología, recuerdo que cuando era niño quise ser cura (jajajaj), y luego durante gran parte de mi adolescencia quise estudiar algo relacionado con las matemáticas... Supongo que fue como en tercero medio que me empezó a interesar la biología y la ciencia, cuando ingresé al preuniversitario, a pesar de que ese año me fue bastante mal y por estrés tuve que dejar de ir antes de que terminase el año escolar. Recuerdo con mucho cariño a mi profesor de biología del preu en los ambos años que estuve, Sergio Hanus, creo que gracias a él empecé a encontrarle el gusto a la ciencia y en particular la biología, ya que en mi colegio era poco lo que nos motivaban.

Hoy está a punto de finalizar la etapa más importante de mi vida hasta el momento. Han sido 9 años llenos de experiencias, muchas personas conocidas, muchas cosas vividas. Me quedo con lo bueno que me dejó el paso por la Universidad de Chile. Espero seguir creciendo como persona en lo que me deparan los años por venir, estoy conforme con las decisiones que he ido tomando con el pasar de los años y ojalá que eso no cambie nunca.

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer a todas las personas que me han dado su apoyo y su amistad en estos años, mi familia que siempre han estado preocupados por mí, a la gente del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, en especial a mi tutor Michael Handford por todo el apoyo y ayuda entregados en este magíster que no fue fácil terminar, al Seba y a la Ange por la siempre buena disposición a ayudar en el laboratorio, a mis amigos y compañeros de laboratorio que supieron aconsejar o hacer reír en los momentos adecuados, Lorena Pizarro, Analía Espinoza, Ariel Cerda, Gonzalo Díaz, Uri Aceituno, Romina Almasia, Camila Stuardo, Carla Aravena, a Matías Freire que se ha transformado en un gran amigo, y en general a mis amigos de colegio y de carrera con los que he mantenido un fuerte lazo a través de todos estos años de formación académica.

## Índice de contenidos

Biografía.....	i
Agradecimientos .....	ii
Índice de contenidos.....	iii
Índice de Tablas. ....	4
Lista de abreviaturas .....	5
Resumen.....	7
Abstract.....	9
1 Introducción .....	11
1.1 Polioles en plantas superiores.....	11
1.2 Funciones de los polioles en plantas. ....	12
1.3 Aldosas 6-P Reductasas.....	15
1.4 Sorbitol Deshidrogenasas. ....	17
1.5 Metabolismo de polioles en <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	19
1.6 Plantas transgénicas acumuladoras de polioles. ....	21
1.7 Trabajo propuesto.....	25
2 Hipótesis.....	27
3 Objetivos generales y específicos. ....	27
3.1 Objetivo general. ....	27

3.2	Objetivos específicos.....	27
4	Materiales y métodos .....	28
4.1	Reactivos.....	28
4.2	Trabajo en bacterias.....	29
4.2.1	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	29
4.2.2	Extracción de ADN plasmidial de <i>Escherichia coli</i> .....	29
4.2.3	Preparación de células de <i>E. coli</i> quimiocompetentes .....	30
4.2.4	Generación del vector pCR8-MdA6PR .....	30
4.2.5	Transformación de <i>E. coli</i> por medio de golpe térmico.....	32
4.2.6	Secuenciación de genes clonados.....	32
4.2.7	Generación de los vectores pEarlyGate 202-AtA6PR y pEarlyGate 202-MdA6PR.....	33
4.2.8	Preparación de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa GV3101 quimiocompetentes.....	35
4.2.9	Transformación de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa GV3101 quimiocompetentes por golpe térmico.....	36
4.2.10	Preparación de un antisuero policlonal $\alpha$ -AtSDH.....	37
4.2.10.1	Expresión y extracción de His-AtSDH recombinante desde <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLys transformados con el vector pET-28a-AtSDH.....	37

4.2.10.2	Purificación de His-AtSDH mediante cromatografía de afinidad de ión inmovilizado.....	38
4.2.10.3	Diálisis de His-AtSDH.....	39
4.2.10.4	Concentración de His-AtSDH mediante el uso de centricones. ....	40
4.2.10.5	Obtención de un anticuerpo policlonal $\alpha$ -His-AtSDH.....	40
4.2.10.6	Evaluación de los sueros policlonales $\alpha$ -His-AtSDH. ....	41
4.3	Trabajo en plantas .....	43
4.3.1	Esterilización y estratificación de semillas. ....	43
4.3.2	Condiciones de cultivo de las plantas. ....	43
4.3.3	Transformación estable y análisis de <i>Arabidopsis</i> .....	44
4.3.4	Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i> .....	45
4.3.5	Comprobación de la calidad de ADN genómico extraído de <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> . ....	46
4.3.6	Verificación molecular de las líneas transformantes por PCR.....	46
4.3.7	Obtención de líneas transformantes homocigotas en <i>Arabidopsis thaliana</i> . 47	
4.3.8	Análisis fenotípico de líneas transformantes.....	48
4.3.9	Extracción de proteínas. ....	48
4.3.10	Extracción de azúcares solubles.....	49
4.3.11	Cuantificación de azúcares.....	50

4.4	Visualización y cuantificación de ácidos nucleicos en geles de agarosa. ....	51
4.5	Programas de PCR y partidores utilizados. ....	51
4.6	Cuantificación de proteínas. ....	53
4.7	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). ....	54
4.7.1	Tinción de Coomassie. ....	55
4.7.2	Inmunodetección mediante western-blot. ....	55
4.8	Análisis estadístico. ....	56
5	Resultados. ....	57
5.1	Generar plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que sobre-expresen la proteína A6PR. ....	57
5.1.1	Evaluación de las proteínas involucradas en el metabolismo del sorbitol en <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	70
5.1.2	Generación de un anticuerpo policlonal $\alpha$ -AtSDH. ....	71
5.2	Estudiar el efecto de la acumulación anormal de A6PR en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en el desarrollo. ....	83
5.3	Estudiar el efecto de la acumulación anormal A6PR en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en la concentración sacarosa, glucosa, fructosa y sorbitol. ....	89
6	Discusión. ....	94

6.1	Generación de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que sobre-expresen la proteína A6PR .....	96
6.2	Obtención de un antisuero policlonal $\alpha$ -His-AtSDH.....	100
6.3	Detección de las proteínas involucradas en el metabolismo del sorbitol en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	102
6.4	Estudiar el efecto de la acumulación anormal de A6PR en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en el desarrollo. ....	107
6.5	Evaluación de la concentración de sorbitol y sacáridos en las líneas transformantes obtenidas, sobre-expresoras del gen <i>AtA6PR</i> .....	108
6.6	Consideraciones Finales.....	112
7	Conclusiones.....	120
8	Proyecciones.....	122
9	Presentaciones.....	123
10	Referencias.....	124

## Índice de Figuras.

Figura 1. Metabolismo del sorbitol en Rosáceas y Plantagináceas.....	12
Figura 2. Esquema que representa la recombinación de vectores mediante la tecnología Gateway.....	34
Figura 3. Amplificación por PCR de <i>MdA6PR</i> desde pET-19b-MdA6PR.....	57
Figura 4. PCR de colonia amplificando <i>MdA6PR</i> . .....	58
Figura 5. Digestión de pCR8-MdA6PR con la enzima de restricción <i>AvaI</i> . .....	59
Figura 6. Esquema que muestra las regiones de interés de las distintas construcciones que usan como base el vector pEarleyGate 202.....	60
Figura 7. PCR de colonia de <i>E. coli</i> transformadas con vector pEarleyGate 202-AtA6PR y pEarleyGate 202-MdA6PR.....	60
Figura 8. Digestión enzimática de los vectores pEarleyGate 202-AtA6PR y pEarleyGate 202-MdA6PR, con la enzima de restricción <i>EcoRI</i> . .....	61
Figura 9. PCR de colonia de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformado con pEarleyGate 202-AtA6PR y pEarleyGate 202-MdA6PR.....	62
Figura 10. PCR amplificando el gen <i>GAPA</i> de <i>Arabidopsis</i> , utilizado para comprobar la calidad de las muestras de ADNg extraído. ....	64
Figura 11. PCRs realizados en las posibles líneas wsn. ....	66
Figura 12. PCRs realizados en las posibles líneas wat.....	66
Figura 13. PCRs realizados en las posibles líneas 1sn.....	67
Figura 14. PCRs realizados en las posibles líneas 1at. ....	68
Figura 15. PCRs realizados en las posibles líneas 1md. ....	68

Figura 16. Producción de His-AtSDH mediante sistema heterólogo en <i>E. coli</i> .	71
Figura 17. Purificación de His-AtSDH por cromatografía de afinidad en columnas HisTrap™ HP.	72
Figura 18. Concentración de His-AtSDH por medio de centricones.	73
Figura 19. <i>Dot blot</i> de suero S1 tras 3 semanas de inmunizaciones.	74
Figura 20. <i>Dot blot</i> de suero S2 tras 3 semanas de inmunizaciones.	75
Figura 21. <i>Dot blot</i> de suero S3 tras 3 semanas de inmunizaciones.	75
Figura 22. Western-blot $\alpha$ -His-AtSDH utilizando suero final S1.	76
Figura 23. Western-blot $\alpha$ -His-AtSDH utilizando suero final S2.	77
Figura 24. Western-blot $\alpha$ -His-AtSDH utilizando suero final S3.	77
Figura 25. Western-blot $\alpha$ -His-AtSDH a partir de extractos proteicos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	78
Figura 26. SDS-PAGE y western-blots de las plantas transformantes genotipo silvestre.	80
Figura 27. SDS-PAGE y western-blots de las plantas transformantes genotipo mutante <i>sdh1-1</i> .	81
Figura 28. Parámetros morfológicos de plantas de transformantes de <i>Arabidopsis</i> genotipo silvestre.	84
Figura 29. Parámetros morfológicos de plantas de transformantes de <i>Arabidopsis</i> genotipo mutante <i>sdh1-1</i> .	87
Figura 30. Composición de azúcares solubles en plantas transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> , genotipo silvestre.	91

Figura 31. Composición de azúcares solubles en plantas transformantes de *Arabidopsis thaliana*, genotipo mutante *sdh1-1*.....92

## Índice de Tablas.

Tabla I. Lista de partidores utilizados en esta tesis de magíster. ....	51
Tabla II. Lista y descripción de los programas de PCR realizados en esta tesis.....	52
Tabla III. Nomenclatura de las líneas obtenidas tras la transformación con pEarleyGate 202, pEarleyGate 202-AtA6PR y pEarleyGate 202-MdA6PR.....	64

## Lista de abreviaturas

~:	aproximadamente.
-OH:	grupo hidroxilo.
% p/v:	porcentaje peso/volumen.
°C:	grados Celsius.
% v/v:	porcentaje volumen/volumen.
3'UTR:	región 3' no traducida.
5'UTR:	región 5' no traducida.
35S:	promotor del virus del mosaico de la coliflor.
A6PR:	aldosa-6-fosfato reductasa.
ADN:	ácido desoxirribonucleico.
ADNg:	ácido desoxirribonucleico genómico.
ADNc:	ácido desoxirribonucleico complementario.
ADN-T:	ácido desoxirribonucleico de transferencia.
ARN:	ácido ribonucleico.
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero.
AtA6PR:	aldosa-6-fosfato reductasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
ata6pr-:	<i>Arabidopsis</i> mutantes en el gen de la aldosa-6-fosfato reductasa.
ATP:	adenosin trifosfato.
AtSDH:	sorbitol deshidrogenasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
B:	boro.
BSA:	albúmina de suero bovino.
Col-0:	Columbia-0.
Da:	Dalton.
DMSO:	dimetilsulfóxido.
DTT:	ditiotreitól.
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA:	ácido etilendiaminotetra acético.
G6P:	glucosa-6-fosfato.
g:	gravedad.
g PF:	gramos de peso fresco.
g PS:	gramos de peso seco.
GAPA:	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
GUS:	$\beta$ -glucuronidasa.
hr:	hora.
IPTG:	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.
k:	kilo
L:	litro.
LeSDH:	sorbitol deshidrogenasa de tomate.
m:	metro.
M:	molar.
M6PR:	manosa-6-fosfato reductasa.
MdA6PR:	aldosa-6-fosfato reductasa de manzano.
MdSDH:	sorbitol deshidrogenasa de manzano.
min:	minutos.
MS:	medio de Murashige y Skoog.
MTD:	manitol deshidrogenasa.

<b>NAD<sup>+</sup>/NADH:</b>	nicotinamida adenina dinucleótido oxidada/reducida.
<b>NADP<sup>+</sup>/NADPH:</b>	nicotidamida adenina dinucleótido fosfato oxidada/reducida.
<b>nm:</b>	nanometros.
<b>OD<sub>340</sub>:</b>	densidad óptica medida a 340 nm.
<b>OD<sub>492</sub>:</b>	densidad óptica medida a 492 nm.
<b>OD<sub>595</sub>:</b>	densidad óptica medida a 595 nm.
<b>OD<sub>600</sub>:</b>	densidad óptica medida a 600 nm.
<b>pb:</b>	pares de bases.
<b>PCR:</b>	reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PMSF:</b>	fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
<b>PmSDH:</b>	sorbitol deshidrogenasa de llantén.
<b>PpySDH:</b>	sorbitol deshidrogenasa de pera.
<b>promAtSDH:</b>	promotor putativo de la sorbitol deshidrogenasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
<b>qPCR:</b>	PCR cuantitativo en tiempo real.
<b>qRT-PCR:</b>	reacción de la transcriptasa reversa acoplada a PCR cuantitativo en tiempo real.
<b>ROS:</b>	especies reactivas de oxígeno.
<b>RT:</b>	reacción de la transcriptasa reversa.
<b>S6P:</b>	sorbitol-6-fosfato.
<b>s:</b>	segundos
<b>SDH:</b>	sorbitol deshidrogenasa.
<b><i>sdh</i>-:</b>	plantas mutantes en el gen de la sorbitol deshidrogenasa.
<b>SDS:</b>	dodecil sulfato de sodio.
<b>SGPT:</b>	silenciamiento génico post-transcripcional
<b>SorPP:</b>	sorbitol-6-fosfato fosfatasa.
<b>Tris:</b>	tris (hidroximetil) aminometano.
<b>U:</b>	unidad enzimática.
<b>UV:</b>	radiación ultra violeta.
<b>V:</b>	voltios.

## Resumen

En la mayoría de las especies del Reino Vegetal, el principal fotosintato es la sacarosa, la cual se transloca a través del floema desde órganos fuentes a sumideros. Sin embargo, en la familia de las Rosáceas, es el poliol sorbitol el azúcar de mayor abundancia. La presencia de polioles en éstas y otras familias se ha relacionado con diversas ventajas, relacionadas mayoritariamente a la tolerancia de estas plantas a soportar estrés de tipo abiótico, como frío, sequía, salinidad, etc. Por este motivo diversos grupos de investigación han manipulado plantas que no acumulan polioles a que los sintetizen por medio de ingeniería genética, como en tabaco, caqui y trigo. En estas 3 especies vegetales, la acumulación de polioles como sorbitol o manitol ha proporcionado una mayor protección frente a estrés salino, en comparación a sus contrapartes no acumuladoras. Sin embargo, en todos estos casos se produjo una alteración de los niveles de azúcares solubles (sacarosa, glucosa y fructosa), y además un efecto dañino en el crecimiento de algunas líneas transformantes, como enanismo y diversos tipos de lesiones, lo que se relaciona a una alta acumulación del poliol y la incapacidad de degradarlo.

*Arabidopsis thaliana* cuenta con las enzimas necesarias para la síntesis (aldosa-6-fosfato reductasa, A6PR) y degradación del sorbitol (sorbitol deshidrogenasa, SDH) de forma natural. No se han reportado altas concentraciones de este poliol en la planta, y su principal fotosintato es la sacarosa, lo que hace interesante estudiar el efecto de una

acumulación de sorbitol en este organismo por medio de la sobre-acumulación de una A6PR.

Con este propósito, se transformaron *Arabidopsis* silvestres y mutantes en el gen *AtSDH* (*sdh-*), con las secuencias codificantes de A6PR provenientes de manzano (Rosácea) y *Arabidopsis*, de manera de asegurar una acumulación de A6PR en las líneas obtenidas y evaluar los cambios en las concentraciones de azúcares y su impacto en el desarrollo de las plantas. Se obtuvieron diversos comportamientos entre las líneas; en algunos casos se detectó la presencia de A6PR exógena y endógena y en otros no, y se detectó diferencias en la acumulación de la proteína SDH endógeno, utilizando un antisuero policlonal desarrollado en esta tesis. Sin embargo, en las líneas donde se detectó una alta presencia de la proteína, se evidenció un retraso del crecimiento respecto a las plantas transformadas con el vector sin inserto. Estos resultados se correlacionan, pero no explican completamente, con una disminución significativa de los niveles de sacarosa. Estudios posteriores evaluando las concentraciones de sorbitol, almidón, myo-inositol y otros metabolitos permitirán dilucidar más profundamente el efecto de la sobre-acumulación de la enzima A6PR en *Arabidopsis*.

## Abstract

In most species of the Plant Kingdom, the primary photosynthate is sucrose, which is translocated through the phloem from source to sink organs. However, in the *Rosaceae* family, which includes many varieties of fruits of economic importance, the polyol sorbitol is the most abundant sugar. The presence of polyols in these and other related families has various advantages, mainly related to the tolerance of the plants to abiotic stress, such as cold, drought, salinity, etc. For this reason, different research groups have engineered plants to synthesise and accumulate polyols using genetic engineering, such as tobacco, persimmon and wheat. In these three species, accumulation of polyols such as sorbitol or mannitol provided greater protection against salt stress, compared to their non accumulating counterparts. However, in all these cases there was also a change in the levels of soluble sugars (sucrose, glucose and fructose), and also a harmful effect on the growth of some of the transformant lines, such as dwarfism and various types of lesions, which is related to a high accumulation of the polyol and the inability to degrade it.

*Arabidopsis thaliana* has the enzymes necessary for the synthesis (aldose-6-phosphate reductase, A6PR) and degradation of sorbitol (sorbitol dehydrogenase, SDH) naturally. High concentrations of this polyol in this species have not been reported, and its main photosynthate is sucrose, which makes it interesting to study the effect of an accumulation of sorbitol in the plant through the over-expression of an A6PR enzyme. For this purpose, wild-type and *Arabidopsis* mutants in the *AtSDH* gene (*sdh-*) were transformed with the coding sequences of *A6PR* from apple (*Rosaceae*) and

*Arabidopsis*, in order to ensure an accumulation of A6PR and to evaluate the changes in the concentrations of sugars and their impact on plant development. Different behaviors between the lines were obtained; exogenous and endogenous A6PR accumulation was detected in some, but not all plants, and differences were detected in the accumulation of endogenous SDH, using a polyclonal antisera generated in this thesis. However, in lines where high presence of the protein was detected, a delay in growth relative to control plants transformed with the empty vector, was evident. These results are correlated, but do not completely explain, a significant decrease in the levels of sucrose. Subsequent studies evaluating concentrations of sorbitol, starch, myo-inositol and other metabolites will enable us to fully elucidate the effect of the over-accumulation of the A6PR enzyme in *Arabidopsis*.

# 1 Introducción

## 1.1 Polioles en plantas superiores

En la gran mayoría de las plantas superiores, el carbono fijado en la fotosíntesis es transportado a través del floema en forma de sacarosa, con pequeñas cantidades de otros azúcares, como rafinosa (Zhou y cols., 2006). Sin embargo, en algunas familias vegetales este azúcar se encuentra en mucho menor proporción que otras formas de carbohidratos, tales como los polioles, también conocidos como alcoholes de azúcar (Dinant y Lemoine, 2010), en los cuales el grupo aldehído o ceto del azúcar se encuentra reducido a un grupo hidroxilo (Loescher, 1987; Noiraud y cols., 2001; Stoop y cols., 1996). Entre los principales polioles translocados se encuentran el manitol (en las familias *Apiaceae*, *Oleaceae*, *Rubiaceae*), galactitol (*Celastraceae*) y sorbitol (*Rosaceae*, *Plantaginaceae*; Pommerrenig y cols., 2007; Reidel y cols., 2009). En estas últimas familias, donde más se ha estudiado el metabolismo de los polioles dado que comprenden muchas especies frutales de importancia económica (manzano (*Malus x domestica*), durazno (*Prunus persica*), pera (*Pyrus pyrifolia*), frutilla (*Fragaria x ananassa*), ciruela (*Prunus salicina*), etc), el sorbitol es sintetizado en órganos fuentes (órganos fotosintéticamente maduros, capaces de exportar carbono fijado a otros órganos, como las hojas maduras) a partir de glucosa-6-P (G6P), la cual es reducida por la enzima aldosa-6-fosfato reductasa dependiente de NADPH (A6PR, EC 1.1.1.200; Negm y Loescher, 1981) a sorbitol-6-P (S6P), el cual es desfosforilado a sorbitol por la sorbitol-6-P fosfatasa (SorPP, EC 3.1.3.50; Zhou y cols., 2003). Posteriormente, el

sorbitol es translocado a través del floema (llegando a constituir hasta el 90% del carbono exportado) hasta los órganos sumideros (órganos necesitan de un flujo de carbono para poder completar su desarrollo, como raíces, frutos y hojas inmaduras), donde mediante la sorbitol deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  (SDH; EC 1.1.1.14; (Negm y Loescher 1979) es oxidado a fructosa para su uso o almacenamiento (Figura 1; (Gao y cols., 2001; Kanamaru y cols., 2004; Loescher, 1987).

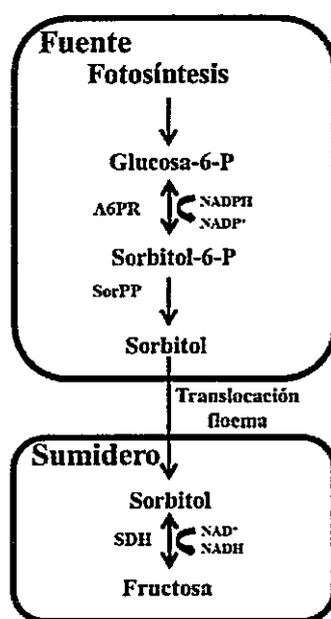


Figura 1. Metabolismo del sorbitol en Rosáceas y Plantagináceas. La G6P obtenida del proceso fotosintético es transformada en sorbitol por las enzimas aldosa-6-fosfato reductasa (A6PR) y sorbitol fosfato fosfatasa (SorPP), el cual es translocado a los órganos sumideros donde la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) lo convierte a fructosa. Modificado de Gao y cols., 2001

## 1.2 Funciones de los polioles en plantas.

Además del rol de producto primario fotosintético descrito anteriormente, el transporte de polioles en la planta presenta numerosas ventajas en comparación a la movilización de azúcares no-reducidos. Primero, representan un reservorio de poder reductor, dado que en su metabolización se producen más moléculas de NADH (Figura 1), lo que

además implica una mayor producción de ATP en comparación a la sacarosa (Stoop y cols., 1996).

Segundo, actúan como solutos compatibles acumulándose a altas concentraciones dentro de la célula, sin causar daños a nivel celular ni interferir de los procesos metabólicos (Stoop y cols., 1996). Más aún, se ha propuesto que la presencia de estas moléculas al interior de la célula permite el reemplazo de moléculas de agua, dado que los grupos hidroxilo de los polioles pueden formar interacciones que permiten la solvatación de las estructuras macromoleculares en estrés osmótico o en situaciones de potencial hídrico reducido (Noiraud y cols., 2001). También se ha visto que la presencia de polioles en medio acuoso (como el citosol) aumenta la fuerza de las interacciones hidrofóbicas dentro de la estructura de las proteínas, estabilizándolas, ya que la interacción del poliol con la estructura primaria del péptido es altamente desfavorable (Taravati y cols., 2007).

Relacionado con su capacidad de ser solutos compatibles, se ha detectado un aumento de sorbitol y manitol, en guinda y apio (*Apium graveolens*), respectivamente, al ser sometidas a estrés de sequía (Noiraud y cols., 2000; Ranney, 1991). En el último caso se detectó además un aumento de la actividad M6PR (manosa-6-P reductasa, EC 1.1.1.224, enzima sintetizadora de manitol), y una disminución en los niveles de transcrito de MTD (EC 1.1.1.255, manitol deshidrogenasa, enzima degradadora de manitol), explicando así el aumento del poliol en los tejidos (Everard y cols., 1994). Además, se ha descrito que las plantas productoras de manitol poseen una mayor tolerancia a estrés salino, donde se ha visto una relación directa entre la cantidad del poliol en las hojas de las plantas, con la cantidad de sal en el medio (Stoop y cols., 1996). En llantén (*Plantago major*,



*Plantaginaceae*), tras la aplicación de un tratamiento con sal, hay un aumento en la expresión de los genes que codifican para transportadores de sorbitol y una disminución de la expresión génica de *PmSDHI*, lo que trae como resultado un aumento de la concentración de sorbitol en las hojas de la planta (Pommerrenig y cols., 2007). Adicionalmente, en caqui (*Diospyros kaki*) transgénico sintetizador de sorbitol se logró una mayor tolerancia a estrés salino en comparación a las plantas control, que no poseen la capacidad de sintetizar el poliol (Gao y cols., 2001). Por último, los polioles actúan otorgando tolerancia a estrés por frío (Loescher y cols., 2000), en manzano existe una correlación inversa entre los niveles de sorbitol y la temperatura (Williams y Raese, 1974) y en olivo (*Olea europae*), se ha visto un aumento del doble de manitol durante el invierno (Loescher y cols., 2000).

Tercero, el efecto protector de los polioles puede ser atribuido en parte a su capacidad de protección de la célula frente a las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales si bien se producen normalmente en la célula, en situaciones de estrés aumentan sus concentraciones considerablemente, produciendo en última instancia daño en la integridad de la membrana plasmática por medio de la lipoperoxidación de ésta (Cuin y Shabala, 2008). De entre los solutos compatibles, se ha visto que el sorbitol es de los que presenta una mayor capacidad de protección frente a ROS, en estudios *in vitro* (Smirnoff y Cumbes, 1989).

Cuarto, permiten la translocación de micronutrientes como el Boro (B), el cual se ha descrito inmóvil en la mayoría de las especies vegetales, lo que implica que no puede desplazarse entre los órganos de las plantas según sus necesidades, por lo cual debe estar

siempre presente en el suelo o medio de cultivo (Brown y Hu, 1996). Sin embargo, en especies translocadoras de polioles, se han identificado compuestos poliol-borato-poliol en el floema, de manera que el B incorporado en la planta puede ser movilizado a través de ésta (Brown y Hu, 1996). En tabaco (*Nicotiana tabacum*), especie que no sintetiza sorbitol ni posee movilidad de B en el floema, al ser transformado con la secuencia codificante de A6PR de manzana, adquiere por un lado la habilidad de sintetizar el poliol, y además la facultad de translocar B por sus floema y ser tolerante a la deficiencia de éste en el medio (Bellaloui y cols., 1999; Brown y cols., 1999).

Por último, los polioles (y azúcares en general) sirven como moléculas señalizadoras en cascadas de expresión génica, regulando varios tipos de respuestas en las plantas (Archbold, 1999; Ciereszko y Kleczkowski, 2002; de Sousa y cols., 2008; Klotke y cols., 2004; Koch, 2004). Aumentos en las concentraciones de los azúcares en la planta pueden gatillar la expresión de genes de almacenamiento y uso de azúcares, y crecimiento, en tanto que la ausencia de los mismos pueden encender genes relacionados a fotosíntesis, movilización y exportación de azúcares (Koch, 1996).

### **1.3 Aldosas 6-P Reductasas.**

La enzima A6PR pertenece a la familia de las aldo/cetoreductasas, su forma activa es un homodímero de ~65 kDa (~36 kDa por subunidad), y se ha descrito como la enzima clave y suficiente para que ocurra la síntesis de sorbitol principalmente en órganos fuente, catalizando la conversión de G6P a S6P, utilizando NADPH como cosustrato (Figura 1)(Deguchi y cols., 2004; Figueroa e Iglesias, 2010; Kanayama y cols.,1992; Kim y cols., 2007; Negm y Loescher, 1981). Su localización subcelular se ha descrito en

manzano como citoplasmática y en cloroplastos (Yamaki, 1981; Liang y cols., 2012, Zamudio, 2010). Se ha identificado y caracterizado el gen en diversos organismos de la familia *Rosaceae* principalmente, como manzana (Negm y Loescher, 1981), pera (Kim y cols., 2007), níspero (*Eriobotrya japonica*; Hirai, 1981), entre otros.

En manzana, a medida que las hojas realizan la transición de órgano sumidero a fuente, además de un aumento en la tasa fotosintética de la hoja, hay una disminución de la actividad SDH, un aumento de la actividad A6PR y un aumento en la cantidad de sorbitol presente en las hojas (Loescher y cols., 1982). En plantas de manzana transformadas con el gen *MdA6PR*, se obtuvieron líneas en las que el gen se sobre-expresó, y líneas en donde ocurrió silenciamiento. En las primeras, se observó un aumento tanto del sorbitol como de la sacarosa en las hojas, en tanto que en las últimas se observó una disminución drástica del contenido de sorbitol, y un aumento de ~7 veces la cantidad de sacarosa, en algunas líneas, sugiriendo que la actividad A6PR en este organismo juega un papel importante en la destinación del flujo metabólico de carbono (Kanamaru y cols., 2004). Además, en este trabajo se relacionó la cantidad de transcrito con la actividad enzimática y la posterior acumulación del polioliol, sugiriéndose que la regulación principal de la actividad A6PR viene dada por el control transcripcional. Resultados similares se obtuvieron al silenciar el gen *MdA6PR* en manzano, con la consiguiente disminución de la concentración de sorbitol y la sobre-acumulación de sacarosa foliar, resultados que se correlacionan positiva y directamente con los cambios en la expresión génica y actividad de las enzimas respectivas (Zhou y cols., 2006; Cheng

y cols., 2005). Cabe destacar que en estos estudios, las plantas transgénicas no mostraron diferencias fenotípicas con las plantas silvestres, por al menos 2 años, edad de las plantas informada en las publicaciones (Kanamaru y cols., 2004; Zhou y cols., 2006).

También se estudió la A6PR de pera, donde se observó que la expresión aumenta en hojas hasta alcanzar un máximo a los 30 días después de brotar (cuando las hojas se encuentran completamente expandidas), y luego decae mientras la hoja envejece, y se determinó que la regulación de la actividad enzimática es principalmente al nivel transcripcional (Kim y cols., 2007).

Tal como se mencionó en sección 1.2, caqui y tabaco, al ser transformados con la secuencia codificante de A6PR de manzana, adquieren la capacidad de sintetizar y acumular sorbitol en sus tejidos, habilidades que no tienen naturalmente, indicando que una enzima endógena es capaz de actuar como una SorPP (Deguchi y cols., 2006; Gao y cols., 2001; Sheveleva y cols., 1998; Tao y cols., 1995).

#### **1.4 Sorbitol Deshidrogenasas.**

Como se describió anteriormente, la SDH dependiente de  $\text{NAD}^+$  es la enzima clave en la metabolización del sorbitol, convirtiéndolo a fructosa (Figura 1) de tal forma que pueda ser almacenado en la vacuola o ingresado a diversas rutas metabólicas. Se ha encontrado que la forma activa de la proteína es un homotetrámero, donde cada subunidad tiene un tamaño  $\sim 40$  kDa (Guo y cols., 2012; Johansson y cols., 2001). El estudio de la enzima SDH de plantas se ha llevado a cabo principalmente en *Rosaceae*, dada su importancia económica. El genoma del manzano fue secuenciado y se encontraron 17 genes *SDH* putativos, de los cuales al menos 9 han sido descritos en la literatura (Velasco y cols.,

2010). En el fruto, un órgano sumidero, la expresión de la mayoría de sus isoformas aumenta en las etapas tempranas del desarrollo, permitiendo que exista un gradiente de concentración de sorbitol que facilita el flujo desde órganos fuente al fruto (Nosarszewski y cols., 2004; Nosarszewski y Archbold, 2007). Sin embargo, a pesar de que la mayoría de las isoformas en manzano poseen una expresión génica exclusiva en órganos sumideros, se encontró que uno de los genes se expresa también en tejido fuente (Park y cols., 2002). En este organismo se determinó una localización celular citoplasmática, cloroplástica y vacuolar, dependiendo de la isoforma (Wang y cols., 2009).

Otras Rosáceas donde se han identificado y, al menos, parcialmente caracterizado genes *SDH* son pera, durazno y níspero, donde las secuencias encontradas comparten una alta identidad aminoacídica con las descritas en manzano (Bantog y cols., 2000; Guo y cols., 2012; Kim y cols., 2007).

También se ha detectado la presencia de sorbitol y/o actividad SDH en plantas no Rosáceas. En maíz (*Zea mays*), se detectó actividad SDH exclusivamente en el endospermo y embrión del grano, en donde la SDH sintetiza sorbitol a partir de fructosa, el cual aumenta su concentración conforme la semilla va madurando. Su función probablemente está relacionada a la respiración celular y a la formación de almidón, y/o pared celular en la semilla (Carey y cols., 1982; de Sousa y cols., 2008; Shaw y Dickinson, 1984). También se determinó que el sorbitol sirve como fuente primaria de carbono en la embriogénesis de callos de maíz (Swedlund y Locy, 1993). En tomate (*Solanum lycopersicum*), se detectó y caracterizó el gen *LeSDH*, el cual mostró

expresión tanto en tejido fuente como sumidero. Al analizar la actividad de la enzima se encontró que favorece la formación de fructosa a partir de sorbitol, y que además tiene preferencia por sorbitol (100%), iditol (79%), ribitol (60%) y xilitol (29%; Ohta y cols., 2005). En soya se detectó la acumulación de sorbitol vía SDH en los hipocotilos de las plántulas en desarrollo y se postula que en este organismo la vía de síntesis de sorbitol tendría como objetivo disminuir la concentración local de fructosa, la cual puede inhibir enzimas del metabolismo de las hexosas (Kuo y cols., 1990).

### **1.5 Metabolismo de polioles en *Arabidopsis thaliana*.**

Al igual que en los ejemplos de plantas no Rosáceas mencionados en la sección anterior, *Arabidopsis thaliana* (perteneciente a la familia *Brassicaceae*) transporta sacarosa y pequeñas cantidades de rafinosa por su floema (Haritatos y cols., 2000) pero hay registros de la presencia de sorbitol y de la actividad SDH, los que se describirán a continuación.

Existen dos loci en este organismo que se ha postulado codifican para enzimas A6PR (AtA6PR, At2g21250, Zamudio, 2010) y SDH (AtSDH, At5g51970, Mandujano, 2010). AtA6PR comparte sobre 65% de identidad aminoacídica con enzimas A6PRs descritas en la literatura, además de poseer los 3 motivos característicos de las aldo/cetoreductasas. Se vio por medio de qRT-PCR que se expresa de forma ubicua en la planta, y por ensayos con proteína de fusión a GFP (AtA6PR-GFP) se determinó una localización subcelular citoplasmática. Ensayos *in vitro* mostraron la síntesis de G6P a partir de S6P y NADP<sup>+</sup> en las condiciones experimentales empleadas. Se identificaron 2 líneas homocigotas de mutantes insercionales provenientes de la colección SALK

(*ata6pr-1* y *ata6pr-2*, SALK\_084572, SALK\_021705), las cuales poseen niveles de transcrito de *AtA6PR* menores al 1% en comparación a plantas silvestres, y por medio de ensayos de western-blot utilizando un anticuerpo policlonal  $\alpha$ -*AtA6PR*, se comprobó la ausencia de la proteína (Wurman, 2013). Al comparar los niveles de sacáridos presentes en plántulas de 15 días, en condiciones normales de crecimiento, se encontró que los niveles de glucosa, fructosa y sacarosa cayeron hasta un 50%, 48% y 33%, respectivamente, en las líneas mutantes, sin que se observaran diferencias a nivel fenotípico entre los distintos genotipos (Zamudio, 2013).

Por otro lado, *AtSDH* comparte sobre el 75% de identidad con SDHs caracterizadas, además de poseer los dominios característicos de la familia de las alcoholes deshidrogenasas. Se demostró por microscopía de epifluorescencia y fraccionamiento subcelular la localización citoplasmática de la proteína (Mandujano, 2010). Por medio de la fusión de su promotor al gen reportero GUS (Parada, 2011), qRT-PCR y western-blot (utilizando un suero policlonal  $\alpha$ -*AtSDH*), se demostró su expresión a través de todo el organismo. Por medio de la producción de una proteína de fusión *in vitro*, His-*AtSDH*, se determinó que el sustrato preferente de la enzima es sorbitol (100% de actividad específica), seguido por ribitol (98%), xilitol (80%), arabitol (59%), siempre con  $\text{NAD}^+$  como co-sustrato (Aguayo y cols., 2013). Se han identificado varias líneas insercionales SALK mutantes para *AtSDH*, *sdh-*, las cuales en condiciones normales de crecimiento no muestran diferencias fenotípicas con las plantas silvestres. Sin embargo, al ser sometidas a estrés por sequía durante 14 días, se encontró que cuando se emplea fotoperiodo de día largo, las mutantes son más sensibles a la privación del agua en

comparación a las plantas silvestres, además de no sobrevivir tras ser nuevamente hidratadas (Nosarzewskiy cols., 2012). Por otro lado, en condiciones de día corto se observó que transcurridos los 14 días de sequía, las mutantes mostraron menor daño asociado al estrés en comparación a las plantas silvestres, y tras la rehidratación del medio, un mayor porcentaje de mutantes se recuperó (Aguayo y cols., 2013). Este último resultado se asoció a un mayor contenido relativo de agua en las hojas de las mutantes, debido probablemente a la acumulación de polioles.

Además se ha reportado la existencia de una familia de 6 transportadores de polioles (AtPMT) que comparten una alta identidad con transportadores de polioles de Rosáceas (AgMAT1 de apio, PcSOT1 y PcSOT2 de guinda y PmPLT1 y PmPLT2 de llantén (Büttner, 2007). Algunos de los transportadores de Arabidopsis son capaces de translocar polioles a través de la membrana plasmática (AtPMT5; Klepek y cols., 2005; Reinders y cols., 2005), AtPMT1 y 2 (Klepek y cols., 2010).

Se ha reportado un aumento en la concentración de sorbitol en esta especie tras la aplicación de estrés por frío, no así con estrés por calor, y de xilitol en ambos tipos de tratamientos (Kaplan y cols., 2004). Por último, otro estudio evidencia un aumento significativo en la concentración de lactitol tras aplicar un estrés por calor, y de xilitol en sequía (aumento de ~4 veces para ambos polioles; Rizhsky y cols., 2004).

### **1.6 Plantas transgénicas acumuladoras de polioles.**

Debido a las propiedades de los polioles como compuestos capaces de conferir resistencia a diversos tipos de estrés abiótico, existen en la literatura varios intentos de

incorporar la acumulación de polioles en plantas que naturalmente no los acumulan, de manera de aumentar sus tolerancias a estrés abiótico.

La mayoría de los trabajos se han llevado a cabo en tabaco, donde por ingeniería genética se ha logrado la acumulación en esta planta de manitol o sorbitol. Tabaco ha sido transformado con la secuencia codificante, o modificaciones de ésta, del gen de la A6PR de manzano, obteniéndose distintos resultados, en distintos laboratorios. Tao y cols. (1995) fueron los primeros en transformar tabaco para lograr una acumulación de sorbitol en éste, y demostraron que la enzima A6PR es suficiente para lograr la síntesis de este poliol en organismos donde no ocurre naturalmente. En este trabajo se lograron concentraciones foliares de sorbitol de entre 0,186 a 0,446  $\mu\text{mol/g}$  PF, sin observarse diferencias fenotípicas entre las líneas con las plantas silvestres. El trabajo de Bellaloui y cols. (1999) demostró que en tabaco, una especie donde el B se considera inmóvil, al transformarlos con A6PR, se produce la síntesis de sorbitol y ahora la planta adquiere la habilidad de movilizar el B aplicado exógenamente, además de que aumenta la capacidad de las plantas de incorporar el B disponible, de manera proporcional a la concentración de sorbitol foliar, la que tuvo un máximo de 0,1  $\mu\text{mol/g}$  PF. En Sheveleva y cols. (1998), se obtuvieron transformantes de tabaco que acumularon sorbitol en el rango 0,2 – 130  $\mu\text{mol/g}$  PF, y encontraron que las plantas que acumularon sobre 3  $\mu\text{mol/g}$  PF en las hojas, presentaban diversos tipos de lesiones, como clorosis y manchas necróticas en las hojas, retraso del crecimiento, infertilidad e incapacidad de formar raíces (la severidad de las alteraciones aumentaba conforme la concentración de sorbitol crecía). Las cantidades de sacarosa disminuyeron y almidón aumentaron en las líneas

acumuladoras de sorbitol. En este caso se atribuyó la aparición de las lesiones a que la síntesis de sorbitol alteró el reservorio de G6P en la planta, disminuyendo drásticamente la síntesis de myo-inositol (precursor de azúcares que son parte de la membrana plasmática, y de señalizadores moleculares), lo que fue corroborado al crecer las líneas en medio suplementado con myo-inositol y se logró un crecimiento normal. Estos datos fueron corroborados por Deguchi y cols. (2001), quienes transformaron tabaco con A6PR, SDH y A6PR + SDH de manzano. Ellos encontraron que al transformar solo con A6PR se obtenían plantas que presentaban lesiones y que morían durante el proceso de aclimatación en la regeneración de los explantes. Sin embargo, al transformar con A6PR y SDH juntas, se obtuvieron plantas sin lesiones ni diferencias fenotípicas con los tabacos silvestres, y con concentraciones normales de myo-inositol, pero que tenían la sacarosa aumentada de manera significativa. Cabe destacar que en estos tabacos, la concentración de sorbitol tuvo un máximo de 4,5  $\mu\text{mol/g}$  PF.

En caqui, como se mencionó anteriormente, también se realizó ingeniería genética obteniéndose plantas que acumularon sorbitol entre 14,5 – 61,5  $\mu\text{mol/g}$  PF al transformarlo con el ADNc de *Mda6PR*. La planta que acumuló la concentración máxima de sorbitol mostró enanismo y un aumento de la ramificación lateral aérea, además de que al medir su valor de Fv/Fm (este valor indica la eficiencia del fotosistema II, es una medida de la capacidad fotosintética de la hoja, mientras menor sea, mayor estrés tiene el tejido analizado) se determinó que esta planta en condiciones normales estaba estresada. Aun así, mostró una mayor tolerancia a estrés salino en comparación a plantas control. Se midieron las concentraciones de myo-inositol y de las hexosas en la

línea enana y se encontró solo una disminución en el myo-inositol, pero no lo suficiente como para explicar el fenotipo (como lo sucedido en tabaco). Los autores sugieren por lo tanto que la concentración de sorbitol intracelular puede ser tal que cause un desbalance osmótico entre la vacuola y el citosol, lo que sumado entonces a la baja en myo-inositol, puede que sea al causante del fenotipo observado (Deguchi y cols., 2004; Gao y cols., 2001).

Se ha transformado también *Arabidopsis*, trigo (*Triticuma estivum*) y tabaco produciendo acumulación de manitol, otro poliol que tiene propiedades de soluto compatible. En *Arabidopsis* se encontró que las plantas acumuladoras de manitol poseían una mayor tolerancia a estrés salino que las plantas control, sin presentarse diferencias fenotípicas entre ellas en condiciones normales de crecimiento, solamente se observó una disminución considerable en la concentración de glucosa. Sin embargo, los autores plantean que puede deberse a que no se alcanzaron concentraciones osmóticamente relevantes (0,5 – 6  $\mu\text{mol/g}$  PF) de manitol en las transformantes, de manera que se lograra ver algún perjuicio debido a la acumulación del poliol (Zhifang y Loescher, 2003). En trigo se encontró que los transformantes poseían una mayor tolerancia a estrés salino y deshidratación en comparación a las plantas silvestres. Sin embargo cuando la concentración foliar de manitol superaba los 0,7  $\mu\text{mol/g}$  PF, empezaban a aparecer lesiones necróticas, menor crecimiento, menor número de hojas y esterilidad, además de una reducción de los niveles de sacarosa (Abebe y cols., 2003). Por último en tabaco, se demostró que la acumulación de manitol en los transformantes confiere resistencia a estrés salino, en comparación a las plantas control (Karakas y

cols., 1997; Tarczynski y cols.,1993). Sin embargo, en el trabajo realizado por Tarczynski y cols. (1993) no se evidencian diferencias fenotípicas con los tabacos silvestres, en cambio en el trabajo de Karakas y cols. (1997), los tabacos acumuladores de manitol son enanos.

### **1.7 Trabajo propuesto.**

En base a lo detallado en la sección anterior, se sabe que plantas Rosáceas y Plantagináceas son organismos que de forma natural acumulan polioles en sus tejidos, sin que esto cause algún tipo de merma en el crecimiento de las plantas. Por otro lado, plantas no acumuladoras de polioles como tabaco, trigo y caqui donde se ha logrado acumulación de polioles mediante ingeniería genética, manifiestan en algunos casos deterioro del crecimiento, y modulación de la concentración de sacáridos. Teniendo en cuenta que de las especies no acumuladoras de polioles que se han mencionado, *Arabidopsis* posee en su genoma genes de la síntesis y degradación de sorbitol (*AtA6PR* y *AtSDH*, respectivamente), pero que no se conoce el rol que juega en este organismo, el estudio del efecto fenotípico y metabólico de modular la acumulación de este poliol entregará pistas informativas sobre su papel en esta especie.

Para ello, se generarán plantas de *Arabidopsis* sobre-acumuladoras de A6PR, utilizando tanto el ADNc del gen endógeno (*AtA6PR*), como con la secuencia proveniente del genoma de manzano (*MdA6PR*), que ha mostrado ser suficiente para producir acumulación de sorbitol en plantas que de forma natural no lo sintetizan, como tabaco y caquis japonés (Brown y cols., 1999; Gao y cols., 2001; Tao y cols., 1995).

Además se utilizarán plantas silvestres y mutantes en *AtSDH*, *sdh1-1* y *sdh1-4* (Aguayo y cols., 2013). La elección de los mutantes, el genotipo silvestre y ambos ADNc con los que se trabajará es debido a que una sobre-acumulación de A6PR podría ser compensada mediante un cambio en la expresión de *AtSDH* endógena, de tal manera de mantener constantes los niveles de sorbitol en la planta transformada. Por otro lado en las mutantes *sdh*, no habría oxidación del sorbitol y así se debería obtener mayores perturbaciones en los niveles de azúcares en las líneas obtenidas. Segundo, la baja concentración de sorbitol en condiciones normales de crecimiento reportada en otro trabajo (Nosarzewski y cols., 2012), sugiere que la actividad SDH es alta en *Arabidopsis*, y/o la actividad A6PR es baja, no permitiendo la acumulación de este polirol. Por lo tanto, al trabajar con el ADNc de *A6PR* de manzano, la cual se ha reportado que aumenta a altos niveles el sorbitol en tabaco y caquis japonés (Gao y cols., 2001; Tao y cols., 1995), aumentamos las posibilidades de obtener altas concentraciones de sorbitol en la líneas obtenidas. Tercero, si se considera el tamaño pequeño de *Arabidopsis* en comparación a las especies recién mencionadas, y la baja acumulación endógena de sorbitol en este organismo (Nosarzewski y cols., 2012), podría resultar más notorio, incluso perjudicial el efecto de la transformación de *MdA6PR*, tanto en el genotipo silvestre como en ambas mutantes.

## **2 Hipótesis.**

La sobre-acumulación de una enzima A6PR en *Arabidopsis thaliana*, producirá un aumento en el contenido de los azúcares sacarosa, glucosa, fructosa y sorbitol, y gatillará efectos negativos a nivel del crecimiento y desarrollo de la planta.

## **3 Objetivos generales y específicos.**

### **3.1 Objetivo general.**

Estudiar los efectos de la sobre-acumulación de A6PR en el contenido de azúcares y en el desarrollo morfológico en *Arabidopsis thaliana*.

### **3.2 Objetivos específicos.**

1. Generar plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobre-acumulen la proteína A6PR.
2. Estudiar el efecto de la sobre-acumulación de A6PR en plantas de *Arabidopsis thaliana* en el desarrollo morfológico.
3. Estudiar el efecto de la sobre-acumulación de A6PR en plantas de *Arabidopsis thaliana* en el contenido de sacarosa, glucosa, fructosa y sorbitol.

## 4 Materiales y métodos

### 4.1 Reactivos.

Merck: sacarosa, agar – agar, hidrógeno fosfato de disodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), etanol absoluto, acetona, cloroformo, Triton X-100, nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ), nitrato de calcio tetrahidrato ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ), fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ), sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ).

Sigma: DNA Taq Polimerasa, brilliant blue G, i-inositol, dimetilsulfóxido (DMSO), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), albúmina de suero bovino (BSA), glicerol.

Winkler: EDTA sal sódica, Tris, dodecil sulfato de sodio (SDS), ditioneitol (DTT).

Thermo Scientific: *Pfu* DNA Polimerasa, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, dATP 100 mM, dCTP 100 mM, dGTP 100 mM, dTTP 100 mM. Unstained Protein Ladder, Prestained Protein Ladder.

Phytotechnologies Laboratories: Murashige y Skoog Basal Salt Mixture (MS).

Otros: extracto de levadura grado biológico y triptona grado biológico (MO BIO Laboratories, Inc).

## **4.2 Trabajo en bacterias**

### **4.2.1 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).**

Salvo en caso que se mencione lo contrario, se realizaron los PCRs en esta tesis de magister con la siguiente mezcla de reacción de 20  $\mu\text{L}$ : 0,5 U de DNA Taq Polimerasa (Sigma-Aldrich); 1X tampón de PCR con  $\text{MgCl}_2$  incluido; mezcla de dNTPs (Thermo Scientific) 0,2 mM; partidior sentido y antisentido 0,25  $\mu\text{M}$  de cada uno; 0,5  $\mu\text{L}$  de templado.

### **4.2.2 Extracción de ADN plasmidial de *Escherichia coli***

Para todos los casos en los que fue necesario extraer un plásmido desde una cepa de *E. coli*, se utilizó el mismo protocolo, usando una minipreparación de kit (Axygen Biosciences, Axyprep Plasmid Miniprep). A partir de un tubo de un clon almacenado a  $-80^\circ\text{C}$ , se hizo un rayado en placa de medio LB sólido (NaCl 1% p/v, triptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, 1,6% p/v en agua destilada) el cual se dejó incubando a  $37^\circ\text{C}$  por una noche. De esta placa, se tomaron 2 clones y se incubaron durante una noche a  $37^\circ\text{C}$  en 5 mL de LB líquido (LB sólido pero sin el agar-agar), con el antibiótico correspondiente al plasmidio que contenía la bacteria. Al día siguiente se realizó la minipreparación de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Tres  $\mu\text{L}$  de cada minipreparación fueron cargados en geles de agarosa al 1% para su cuantificación (sección 4.4).

### 4.2.3 Preparación de células de *E. coli* quimiocompetentes

En esta tesis de magíster se transformaron 2 cepas de *E. coli*, la cepa DH5 $\alpha$  y la cepa DB3.1, debido a que el vector pEarleyGate 202 (Earley y cols., 2006) contiene el gen *ccdb*, el cual es letal para la cepa DH5 $\alpha$  y no es así para la cepa DB3.1, de tal manera que el vector sin inserto se puede propagar en esta cepa.

Se hizo un pre-inóculo de células en 5 mL de medio LB líquido, y se dejó incubando con agitación a 37°C durante la noche. Al día siguiente se traspasó el pre-inóculo a 100 mL de medio LB líquido y se incubó a 37°C con agitación hasta que alcanzó una OD<sub>600</sub> (medido en un espectrofotómetro JENWAY 6300) de 0,4 – 0,5. A continuación se centrifugó el caldo de cultivo a 805 g, durante 10 min a 4°C. Se resuspendieron suavemente las células en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M (previamente autoclavado y filtrado con filtros de 22  $\mu$ m) y se centrifugaron 5 min a 1100 g y 4°C. Se resuspendieron las células en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M y se incubaron 30 min en hielo. A continuación se centrifugaron por 5 min a 1100 g y 4°C. Luego se resuspendieron en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, se les agregó 600  $\mu$ L de glicerol, se repartieron en alícuotas de 200  $\mu$ L c/u, congelándolas inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido para finalmente ser almacenadas a -80°C.

### 4.2.4 Generación del vector pCR8-MdA6PR

A partir del vector pET-19b-MdA6PR (Figuroa e Iglesias, 2010) se amplificó por PCR el marco de lectura completo de *MdA6PR* (934 pb) inserto en éste, utilizando una mezcla de reacción que contenía solución tampón Pfu 1X + MgSO<sub>4</sub> 2 mM; 0,2 mM de mezcla de dNTPs; 0,5  $\mu$ M de los partidores MdA6PR-F y MdA6PR-R (Tabla I); 1  $\mu$ L de templado y 0,5U de la enzima de alta fidelidad *Pfu* DNA Polimerasa. Se utilizó el

programa de PCR Mda6PR Pfu (Tabla II). Se cargaron 3 reacciones del PCR resultante, de 20  $\mu$ L cada una, en un gel de agarosa al 1,5% (sección 4.4). Tras revelar la presencia de la banda de interés de 934 kb, ésta fue escindida y purificada mediante el uso del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), según las instrucciones del fabricante. A continuación, se cargaron 2  $\mu$ L de la purificación en geles de agarosa al 1,5% (sección 4.4) para su posterior cuantificación utilizando el programa ImageJ versión 1,47. Luego, 500 ng de producto de purificación fueron incubados por 30 min a 72°C con 1U de Taq DNA Polimerasa, y la reacción obtenida se incubó con el vector pCR®8/GW/TOPO® (pCR8 de ahora en adelante, Life Technologies), según las instrucciones del fabricante. La mezcla resultante se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  por medio de golpe térmico (4.2.5) y se incubaron en placas de medio LB suplementadas con el antibiótico ampicilina a 100  $\mu$ g/mL, por una noche a 37°C. Al día siguiente se seleccionaron algunas colonias para realizar un PCR (4.2.1) de colonia con el programa PCR Mda6PR-Taq (Tabla II), y así identificar la presencia del inserto *Mda6PR* en las bacterias transformantes. A las bacterias que dieron positivo para el inserto, se les realizó una minipreparación (sección 4.2.2), y a 10  $\mu$ L de éstas se les aplicó una digestión enzimática con la enzima AvaI durante 2 hrs a 37°C, deteniendo la reacción incubando las muestras a 65°C por 20 min. El resultado de la digestión fue cargada en geles de agarosa al 2% (sección 4.4) para comprobar el sentido del inserto en las colonias seleccionadas con respecto a los sitios de recombinación *attL1* y *attL2* (los tamaños esperados para las orientaciones sentido y antisentido se detallan en la sección 5.1). Se eligieron finalmente 3 colonias en la dirección sentido del inserto para ser enviadas a secuenciar (sección 4.2.6). Los clones que tuvieron menor cantidad de

diferencias con la secuencia del gen *Mda6PR* disponible en las bases de datos, fueron seleccionados para su posterior recombinación con el vector de destinación pEarleyGate 202.

#### **4.2.5 Transformación de *E. coli* por medio de golpe térmico**

Se agregaron 6  $\mu\text{L}$  de vector en un vial de *E. coli* quimiocompetente (sección 4.2.3) (DH5 $\alpha$  o DB3.1, según necesidad) y se incubaron 10 min en hielo. A continuación se incubaron las células 30 s a 42°C y se transfirieron inmediatamente a hielo. Se les agregaron 250  $\mu\text{L}$  de medio LB líquido y se incubaron 1 hr a 37°C en agitación para luego ser centrifugado a 8000 g durante 4 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante guardando aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  de éste, con lo que se resuspendieron las células y se sembraron en placas de medio LB sólido, con los antibióticos correspondientes según el caso. Finalmente las placas se incubaron a 37°C por una noche, o hasta que el crecimiento de colonias fuese evidente, para su posterior análisis.

#### **4.2.6 Secuenciación de genes clonados**

Para los clones de pCR8-Mda6PR que se usaron para secuenciación (sección 5.1), cada muestra obtenida de minipreparación (sección 4.2.2) fue posteriormente diluida con H<sub>2</sub>O nanopura de manera que la concentración del ADN fuese de 50 ng/ $\mu\text{L}$ . Las muestras fueron posteriormente enviadas a la empresa MacroGen Co. (USA), y la secuenciación fue realizada con los partidores universales M13 forward y M13 reverse (Tabla I). Una vez obtenidos los resultados, éstos fueron comparados con la disponible en la base de datos de NCBI.

#### 4.2.7 Generación de los vectores pEarlyGate 202-AtA6PR y pEarlyGate 202-MdA6PR.

El vector de destinación elegido para realizar esta tesis de magister es el pEarleyGate 202, el cual entre sus características de interés es que posee resistencia a kanamicina en bacteria, posee un promotor de expresión constitutiva fuerte 35S (que proviene del virus del mosaico de la coliflor) comandando la expresión del gen clonado, al cual además se le añade un epítipo FLAG (secuencia aminoacídica DYKDDDDK; 1,012 kDa) en el extremo amino terminal de la secuencia clonada. Por último su marcador de selección en plantas es el herbicida BASTA (Earley y cols., 2006).

Los vectores pEarlyGate 202-AtA6PR y pEarlyGate 202-MdA6PR fueron obtenidos mediante la tecnología Gateway<sup>®</sup> (Invitrogen, Figura 2), que se basa en la capacidad del bacteriófago lamda de realizar recombinación sitio-específica. Mediante esta técnica es posible realizar la recombinación de secuencias que se encuentran flanqueadas por sitios específicos, denominados *attL* en un “vector de entrada”, pCR8 en este caso, y los sitios *attR* en un “vector de destinación”, en este caso pEarleyGate 202, mediante la mezcla de enzimas llamada LR Clonase<sup>®</sup> II. En el vector de destinación, se encuentra entre los sitios *attR* el gen letal (para la cepa DH5 $\alpha$ ) *ccdB*, lo que permite una rápida identificación de las colonias que portan el vector de destinación donde la recombinación tuvo efecto (Liang y cols., 2013). De esta manera, la secuencia de interés (*MdA6PR* o *AtA6PR*, en este trabajo) clonada en el vector de entrada es transferido al vector de destinación, el que contiene las secuencias necesarias para su correcto

funcionamiento en el organismo de interés (*Arabidopsis thaliana*, en este trabajo), en un paso rápido, sin la necesidad de realizar PCRs, digestiones y ligaciones.

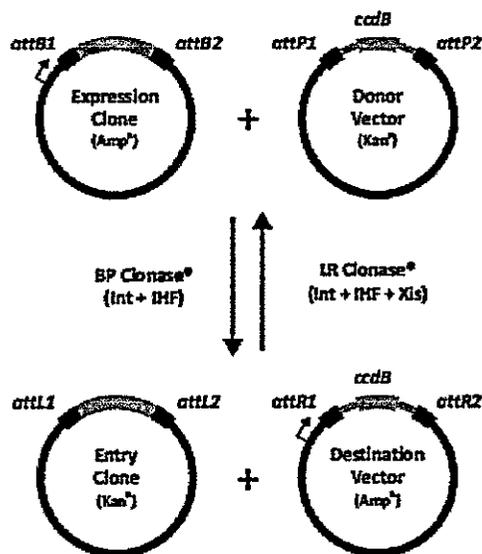


Figura 2. Esquema que representa la recombinación de vectores mediante la tecnología Gateway. Los vectores de entrada (Entry clone) y de destino (Destination vector), se recombinan mediante el uso del mix LR Clonase, que intercambia las regiones contenidas entre los sitios *attL* y *attR*, obteniéndose un vector de destino con las secuencias de interés (Expression Clone). Imagen extraída y modificada desde Liang y cols., 2013.

Se realizó minipreparación (sección 4.2.2) a partir de células de *E. coli* que tuviesen el plasmidio pCR8-MdA6PR (sección 4.2.4), pCR8-AtA6PR (facilitado por Sofia Zamudio (2010)) y el vector pEarleyGate 202 (donado por la Universidad Andrés Bello), por separado. Una vez obtenidas las minipreparaciones, éstas fueron cuantificadas en geles de agarosa (sección 4.4), y a continuación se realizó la recombinación de los vectores pCR8-MdA6PR con pEarleyGate 202, y de pCR8-AtA6PR con pEarleyGate 202, a 25°C durante 2 hrs, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez recombinados los vectores se procedió a transformar células de *E. coli* quimiocompetentes por medio de golpe térmico (sección 4.2.3). Al día siguiente, se seleccionaron 8 colonias para las bacterias transformadas con pEarleyGate 202-AtA6PR y pEarleyGate 202-MdA6PR, y 4

colonias para las transformadas con pEarleyGate 202, para realizar PCR (sección 4.2.1) de colonia identificando cada región de interés para cada uno de los vectores utilizados (programas de PCR AtA6PR-Taq, MdA6PR-Taq, Cmr-Ccdb, respectivamente, Tabla II). Identificados clones positivos para cada construcción, se procedió a realizar minipreparación (sección 4.2.2) de 4 colonias para cada evento de transformación, y posteriormente se realizó un ensayo de digestión a 10  $\mu$ L de cada minipreparación con la enzima EcoRI (Thermo Scientific) durante 2,5 hrs a 37°C. Luego se inactivó la enzima incubando la mezcla de reacción a 65°C durante 20 min y los resultados de la digestión se visualizaron en geles de agarosa (sección 4.4). Con los resultados de los ensayos de restricción para cada construcción, se eligió finalmente una colonia para continuar con la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes (sección 4.2.8) por golpe térmico (sección 4.2.9).

#### **4.2.8 Preparación de células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 quimiocompetentes.**

Se preparó un pre-inóculo de células en 5 mL de medio LB líquido con los antibióticos rifampicina y gentamicina a concentraciones finales de 10  $\mu$ g/mL y 50  $\mu$ g/mL, respectivamente, y se incubó a 28°C por una noche en agitación. Al día siguiente se traspasó el pre-inóculo a 100 mL de medio LB con rifampicina y gentamicina a las mismas concentraciones que anteriormente, y se incubó a 28°C en agitación hasta que alcanzó una OD<sub>600</sub> de 0,5. A continuación se incubó el cultivo en hielo durante 10 min y se centrifugó a 3000 g por 20 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM estéril. Se repartieron las células en alícuotas de

100  $\mu$ L, se congelaron de inmediato en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

#### **4.2.9 Transformación de células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 quimiocompetentes por golpe térmico**

Se agregaron 500 ng de vector de destinación (pEarleyGate 202-AtA6PR, pEarleyGate 202-MdA6PR y pEarleyGate 202, sección 4.2.7) en un vial de *Agrobacterium* quimiocompetente (sección 4.2.8) y se congelaron en N<sub>2</sub> líquido por 5 min, el que posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se agregaron al vial 1 mL de medio LB líquido y se incubó a 28°C con agitación durante una noche. Finalmente se sembró en placas de medio LB sólido suplementadas con los antibióticos rifampicina (12,5  $\mu$ g/mL), gentamicina (50  $\mu$ g/mL) y kanamicina (100  $\mu$ g/mL). Se incubaron las placas a 28°C por 2 días hasta que las colonias se hicieron visibles. Se seleccionaron 5 colonias para cada construcción, para realizar PCR de colonias. En esta ocasión se amplificó por PCR (sección 4.2.1) una región que comprende desde el promotor presente en pEarleyGate 202, hasta el fin del marco de lectura de *MdA6PR* (para pEarleyGate 202-MdA6PR, de 1470 pb), o hasta una región intermedia de *AtA6PR* (para pEarleyGate 202-AtA6PR, de 1421 pb), con los programas de PCR 35S-MdA6PR y 35S-AtA6PR, respectivamente (Tabla II). Se eligió un clon positivo para cada caso, y con ellos se procedió a transformar plantas silvestres y mutantes *sdh-* de *Arabidopsis thaliana*, mediante el método de inmersión floral (sección 4.3.3).

#### 4.2.10 Preparación de un antisuero policlonal $\alpha$ -AtSDH

##### 4.2.10.1 Expresión y extracción de His-AtSDH recombinante desde *E. coli*

###### *BL21(DE3)pLys* transformados con el vector pET-28a-AtSDH.

Se incubó un pre-inóculo de 5 mL en medio LB líquido de células de *E. coli* que portan una construcción que expresa la proteína His-AtSDH (*E. coli BL21(DE3)pLys* transformados con el vector pET-28a-AtSDH, Mandujano, 2010) a 37°C con agitación durante una noche. Al día siguiente se diluyó el pre-inóculo en 100 mL de medio LB líquido y se incubó a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una  $DO_{600} \sim 0,6$ ; y se agregó IPTG de manera que su concentración final fuese 0,5 mM, y se incubó el cultivo durante 4 hrs a 37°C con agitación. A continuación se centrifugaron las células a 3000 g durante 15 min a 4°C, se resuspendió suavemente el sedimento en tampón TEN (Tris-HCl 100 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; NaCl 50 mM) y se repitió la centrifugación anterior 3 veces. Se resuspendió el sedimento en 10 mL de tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; NaCl 50 mM; Triton X-100 0,1% (v/v); DTT 1 mM; PMSF 0,1 mM). Se lisaron las células por medio de sonicación (Misonix® Microson xl2000 Ultrasonic Cell Disruptor), aplicando 15 pulsos de 30 s a potencia máxima, a intervalos de 1 min en donde las células se mantuvieron en hielo, hasta que la suspensión celular se hubiese clarificado. A continuación se centrifugó a 20000 g por 35 min a 4°C. Se separaron las fracciones de sedimento y sobrenadante. El sedimento fue disuelto en tampón de recuperación (Tris-HCl 100 mM pH 7,4; urea 6 M; NaCl 500 mM; imidazol 1 mM; DTT 1 mM, inhibidor de proteasas 1X (cOmplete Mini, EDTA-free, Roche®)), en agitación a 4°C por una noche. Una vez disuelto el sedimento, se

almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  junto con el sobrenadante, para realizar ensayos de SDS-PAGE (sección 4.7), y posteriormente tinción de Coomassie (sección 4.7.1) y ensayos de western-blot (sección 4.7.2) para determinar en qué fracción se encuentra His-AtSDH. Se utilizó TBT-S (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 140 mM y Tween-20 0,1% (v/v)) con leche descremada al 5% (p/v) en todas las incubaciones, el anticuerpo primario  $\alpha$ -6xHis se utilizó en dilución 1:3000 y el anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG se utilizó en dilución 1:10000.

#### **4.2.10.2 Purificación de His-AtSDH mediante cromatografía de afinidad de ión inmovilizado.**

Una vez determinada la fracción en donde se encontraba la mayor proporción de la proteína recombinante (sección 5.2.1, Figura 16), se procedió a su purificación desde el extracto bacteriano, por medio de ensayos de cromatografía de afinidad, empleando columnas HisTrap™ HP de 1 mL de volumen (GE Healthcare Life Sciences), las cuales contienen una resina en la que está inmovilizado el ión níquel (Ni), al cual se unen los residuos de histidina de la marca 6xHis que posee la proteína recombinante His-AtSDH. Se diluyó la muestra en 20 mL de tampón de unión (tampón sodio fosfato 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 50 mM), y se pasó por un filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$  previo al cargado en la columna (todas las soluciones descritas para este protocolo fueron filtradas con filtros de  $0,22\ \mu\text{m}$  previo al ingreso en la columna). A todas las soluciones a continuación se les aplicó un flujo de 1 mL/min, utilizando una bomba peristáltica VWR® Pumps, Variable Flow. Se lavó la columna con 10 volúmenes de agua Milli-Q® (Millipore Corporation), luego se ambientó la columna con 10 volúmenes de tampón de

unión, se cargó la muestra en la columna y luego se lavó nuevamente con 10 volúmenes de tampón de unión. A continuación se empleó un gradiente discontinuo de imidazol de concentraciones crecientes en tampón de unión (100; 250; 300 mM), recolectando las fracciones eluidas (~20 mL por fracción). Luego se lavó la columna con 10 volúmenes de tampón de elusión (tampón de unión pero con 600 mM de imidazol), se lavó con 10 volúmenes de agua Milli-Q® y se almacenó la columna en etanol 20% a 4°C. Todas las fracciones fueron almacenadas a 4°C para la posterior detección de His-AtSDH mediante western-blot, utilizando 100 µL de cada fracción por carril (sección 4.7). Se utilizaron las mismas condiciones de bloqueo y anticuerpos que en sección 4.2.10.1.

#### **4.2.10.3 Diálisis de His-AtSDH.**

Se dializó la fracción donde se encontraba His-AtSDH (sección 5.1.2, Figura 17) contra un tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,0; urea 2 M; EDTA 1 mM; ZnSO<sub>4</sub> 1 mM y DTT 1 mM durante 2 hrs a 4°C. Luego, se dializó contra el tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 50 mM; EDTA 1 mM; ZnSO<sub>4</sub> 1mM y DTT 1 mM durante 12 hrs a 4°C, y posteriormente se dializó contra un tampón PBS (NaCl 134 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM pH 7,4) durante 2 hrs a 4°C. Finalmente se centrifugó la solución a 8000 g por 10 min a 4°C y se almacenó el sobrenadante a 4°C.

Al preparar las soluciones de diálisis, el ZnSO<sub>4</sub> se agregaba una vez solubilizado el EDTA dado que el ZnSO<sub>4</sub> es insoluble a pH básicos y solo es soluble en presencia de EDTA.

#### **4.2.10.4 Concentración de His-AtSDH mediante el uso de centricones.**

Una vez dializada la proteína de interés es necesario llevarla a una concentración de 0,2 mg/mL para poder continuar con la elaboración del antisuero policlonal  $\alpha$ -His-AtSDH, por lo que se emplearon centricones Amicon® Ultra-2 (Millipore Corporation) 30K y 50K, que tienen tamaños de corte de 30000 y 50000 NMWL (siglas en inglés para peso molecular nominal límite), respectivamente. Este paso adicional permitió la concentración de la proteína sin alterar las concentraciones del tampón PBS en que se encuentra, además por los centricones utilizados se eliminaron impurezas que hayan eluido junto a His-AtSDH durante la cromatografía de afinidad (sección 5.1.2, Figura 17). Se cargaron en el centricon 50K 2 mL del extracto dializado contra PBS (sección 4.2.10.3), y se centrifugó a 7500 g durante 7 min a temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente se eliminó el filtrado y se guardó el concentrado, centrifugando a 1000 g por 2 min a temperatura ambiente, según las indicaciones del fabricante. Este paso se repitió hasta que todo el dializado proteico ( $\sim 20$  mL) fue filtrado por el centricon 50K. Luego el concentrado proteico se diluyó en tampón PBS hasta alcanzar un volumen  $\sim 2$  mL, y se filtró con el centricon 30K, centrifugando a 7500 g durante 5 min a temperatura ambiente, y luego recuperando el concentrado centrifugando por 2 min a temperatura ambiente a 1000 g, según las indicaciones del fabricante. El concentrado de His-AtSDH final se cuantificó mediante el ensayo proteico Bio-Rad (sección 4.6).

#### **4.2.10.5 Obtención de un anticuerpo policlonal $\alpha$ -His-AtSDH.**

Una vez purificados y concentrados los extractos proteicos enriquecidos en His-AtSDH, éstos fueron entregados a Leonardo Vargas Hernández (Laboratorio de Inmunología,

Facultad de Ciencias, Universidad de Chile), quien realizó una inmunización cada 7 días durante 3 semanas a 3 ratones cepa BALB/c. Cada inmunización (por ratón) consistió de 50 µg de proteína recombinante en un volumen de 100 µL, que fue mezclado con 100 µL de Adyuvante Completo de Freund (ACF; 1:1), de tal manera que el volumen máximo de inyección por ratón nunca superase los 200 µL. Transcurrida la tercera inmunización de los ratones, se extrajeron ~ 100 µL de sangre periférica, con lo cual se evaluó la detección de His-AtSDH mediante ensayos de *dot blot* (sección 4.2.10.6). Una vez corroborada la detección del antígeno por los 3 sueros sanguíneos (sección 5.1.2, Figuras 19, 20, 21), se procedió a realizar una última inmunización a los ratones, y 3 días posteriores a dicho proceso, se extrajeron 200 µL por punción cardíaca, obteniéndose los 3 sueros finales con los que se realizaron ensayos de western blot (sección 4.7.2) para determinar la dilución y especificidad de la detección del antígeno para el cual fueron creados.

#### **4.2.10.6 Evaluación de los sueros policlonales $\alpha$ -His-AtSDH.**

La primera evaluación a la que se sometieron los sueros (de aquí en adelante denominados S1, S2 y S3) de los ratones inmunizados fue a un ensayo de *dot blot*, con el fin de determinar si eran capaces de detectar al antígeno, y cuál era la cantidad mínima de proteína a la cual podían detectar. Para ello, se colocaron distintas cantidades de antígeno (His-AtSDH) y de una proteína cuya única homología al antígeno es su epítipo His (His-AtA6PR; Wurman, 2013), entre los 800 y los 25 µg de cada una, diluidas en 2 µL de tampón PBS, en membranas de nitrocelulosa. Se realizó un bloqueo con tampón TBS-T con leche descremada 5% (p/v) durante 2 hrs a temperatura ambiente con

agitación suave, y se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min. Posteriormente se incubaron las membranas con cada suero como anticuerpo primario (S1, S2, S3), además se incubó (como control positivo) con el anticuerpo primario  $\alpha$ -6xHis (Sigma-Aldrich), a diluciones de 1:200; 1:500; 1:1000 y 1:2000 para cada suero, y 1:4000 para  $\alpha$ -6xHis, todos diluidos en TBS-T con leche descremada 5% (p/v) durante 2 hrs a temperatura ambiente con agitación suave, y luego se lavaron 3 veces por 10 min con TBS-T. A continuación se incubaron las membranas con TBS-T con leche descremada al 5% (p/v) con una dilución 1:10000 del anticuerpo secundario  $\alpha$ -Mouse IgG fusionado a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich). Cabe destacar que para cada membrana de nitrocelulosa se incluyó un control de anticuerpo (o suero en alguno de estos casos) primario, y de anticuerpo secundario, cargando directamente en las membranas 1  $\mu$ L de cada anticuerpo (datos no mostrados).

La detección colorimétrica se realizó utilizando la enzima fosfatasa alcalina, fusionada al anticuerpo secundario. Se lavó la membrana 2 veces con tampón alcalino (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl y 5 mM MgCl<sub>2</sub>) durante 5 min y se reveló la membrana con 20 mL de tampón alcalino más 66  $\mu$ L de NBT 50% (p/v) en DMSO y 33  $\mu$ L de BCIP 50% (p/v) en DMSO a temperatura ambiente, hasta que las bandas se hicieran visibles (~1-10 min). Finalmente la reacción se detuvo con 20 mL de EDTA 20 mM en tampón alcalino.

Los sueros finales (sección 4.2.10.5) fueron sometidos a ensayos de western-blot (sección 4.7.2) con el fin de determinar la especificidad de la detección del antígeno, dependiente de cantidad de sustrato. En esta oportunidad se cargó 1000; 500; 250; 125 y

62,5 ng de His-ASDH y de His-AtA6PR por carril, los sueros (S1, S2, S3) se utilizaron a diluciones de 1:1000; 1:2000 y 1:4000 ( $\alpha$ -6xHis solo a 1:4000), con la salvedad de que esta vez las incubaciones se realizaron en TBS-T con leche descremada al 7%. Los tiempos de incubación se mantuvieron constantes en cuanto a los ensayos de *dot blot*, y el revelado de las membranas se realizó acorde a lo descrito anteriormente.

### **4.3 Trabajo en plantas**

Para la realización del presente trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0), silvestres e insercionales (SALK, de línea parental N60000), *sdh1-1* (SALK\_023456) y *sdh1-4* (SALK\_077335), estas últimas adquiridas de Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).

#### **4.3.1 Esterilización y estratificación de semillas.**

A las semillas se les agregó 1 mL de etanol 95% filtrado (22  $\mu$ m), y se agitaron durante 5 min. Luego se removió el etanol 95% y se les agregó 1 mL de Triton X-100 0,1% en etanol 70% y se agitaron durante 15 min. A continuación se lavaron las semillas con H<sub>2</sub>O autoclavada estéril y se almacenaron a 4°C en oscuridad durante 48 hrs, previo al sembrado, para estratificarlas.

#### **4.3.2 Condiciones de cultivo de las plantas.**

Semillas estratificadas fueron sembradas en placas de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (medio MS basal 0,5x; sacarosa 1%; agar - agar 0,6%; 72 mM i-inositol; pH 5.8 ajustado con KOH), con o sin el herbicida BASTA (15  $\mu$ g/mL) y colocadas en una incubadora a 22°C, 2830 lux y con un fotoperiodo de 16/8 hrs luz/oscuridad. Luego de

una semana, se trasplantaron las plántulas a medio hidropónico (para solución 100x:  $\text{KNO}_3$  125 mM,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  75 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{KCl}$  5 mM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  5 mM,  $\text{MnSO}_4$  1 mM,  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  150  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe/DTPA}$  10 mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  150 mM,  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$  10 mM, pH 5) en lana de roca, por periodos de tiempo variables según el uso que posteriormente tendrían tales plantas, a 22°C, 3810 lux y con un fotoperiodo de 16/8 hrs luz/oscuridad. Tanto para la obtención inicial de líneas transformantes, como para la obtención de semillas homocigotas, las plantas fueron mantenidas en lana de roca durante todo el ciclo de vida. En el caso de las plantas homocigotas utilizadas para comparar los efectos de la sobre-acumulación de A6PR en *Arabidopsis* (secciones 5.1, 5.2, 5.3) las plantas fueron mantenidas durante 5 semanas en medio hidropónico, período tras el cual sus tejidos fueron cosechados para realizar las mediciones adecuadas para cada caso.

#### **4.3.3 Transformación estable y análisis de *Arabidopsis***

Plantas de *Arabidopsis*, de alrededor de 5 – 6 semanas, que poseían una gran cantidad de botones cerrados y sin silicuas (si tenían algunas, fueron removidas), fueron transformadas genéticamente por inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Una colonia de *Agrobacterium* que contenía el vector pEarlyGate 202-AtA6PR, otra con el vector pEarlyGate 202-MdA6PR, y otra con el vector pEarlyGate 202 (sección 4.2.9), se dejaron crecer durante una noche a 28°C en 5 mL de medio LB con el antibiótico kanamicina (100 mg/mL). Al día siguiente, cada *Agrobacterium* por separado, fueron diluidas en 100 mL del mismo medio con antibiótico y se dejaron crecer hasta una  $\text{OD}_{600}$  de 2. Se centrifugaron las células a 5000 g por 20 min, se eliminó el sobrenadante y se

agregaron 50 mL de medio de infiltración (sacarosa al 5% p/v y Silwett L-77 al 0.05% v/v) a cada tubo. Se resuspendieron, juntaron (las distintas alícuotas del mismo *Agrobacterium*) y diluyeron con medio de infiltración hasta que la OD<sub>600</sub> fuese 0.8. En esta suspensión, se sumergieron varias veces las plantas de *Arabidopsis* (3 plantas por cada vector), y a continuación se dejaron las plantas durante una noche en oscuridad. Al día siguiente, fueron devueltas al medio hidropónico para que terminaran su ciclo de vida y se colectaron las semillas al terminar éste.

#### **4.3.4 Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis*.**

Plantas de *Arabidopsis* correspondientes a la generación T<sub>1</sub> transformadas con los vectores anteriormente mencionados (sección 4.3.3), fueron seleccionadas por su resistencia al herbicida BASTA y traspasadas tras una semana de cultivo *in vitro* en medio MS a medio hidropónico (sección 4.3.2). Tras 3 – 4 semanas de crecimiento, se colectó tejido foliar de cada una de las plantas y se les aplicó una extracción de ADN genómico con el protocolo de CTAB (Doyle y Doyle, 1987) con modificaciones. 50-100 mg de tejido fueron molidos con pistilo en presencia de nitrógeno líquido en un tubo de 1,5 mL sin permitir que el material se descongelara, y se le agregó 700 µL de solución de extracción 2X CTAB (CTAB 2% p/v; NaCl 1,4 M; Tris-HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; β-mercaptoetanol 0,2% v/v) a cada tubo. Se incubaron durante una hora a 65°C, invirtiendo un par de veces los tubos cada 5 min. Luego se centrifugó a 15115 g por 5 min y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 mL. Se agregaron 700 µL de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitaron durante 5 min, se centrifugaron a 5724 g por 5 min y se traspasó la fase acuosa superior a un nuevo tubo;

este paso se repitió 2 veces en total. A la fase acuosa obtenida se le agregaron 750 µL de isopropanol, se agitaron brevemente con vortex y se incubaron a -20°C durante 20 min. Luego se centrifugó a 15115 g por 15 min y el pellet obtenido fue lavado dos veces con 700 µL de etanol 70% (v/v), centrifugando 1 min a 15115 g después de cada lavado. A continuación se eliminó el etanol y se dejaron los pellets a temperatura ambiente por 30 min, o hasta que el etanol restante se evaporara. Finalmente se agregaron 50 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM) y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso en reacciones de PCR (sección 4.2.1).

#### **4.3.5 Comprobación de la calidad de ADN genómico extraído de *Arabidopsis thaliana*.**

Para verificar la calidad del material genético, a cada muestra se le aplicó el PCR (sección 4.2.1) GAPA (Tabla II) amplificando un fragmento del gen *GAPA* (At3g26650, tamaño del amplicón ~400 pb, codifica para la subunidad 1 de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa).

#### **4.3.6 Verificación molecular de las líneas transformantes por PCR.**

Una vez verificada la calidad de las muestras de ADNg de *Arabidopsis*, a cada muestra se le aplicaron 3 PCRs (sección 4.2.1), uno para verificar la presencia del fragmento que abarca desde el promotor 35S hasta una región anterior al término del marco de lectura abierto de *AtA6PR* (35S-AtA6PR, Tabla II), otro que amplifica desde el promotor 35S hasta el final del marco de lectura de *MdA6PR* (35S-MdA6PR, Tabla II), y un último que amplifica la región original del vector pEarlyGate 202 previo a la recombinación (Cam-Ccdb, genes *cam* y *ccdb*, Tabla II), cuyos tamaños de amplicón son de 1421, 1470

y 1039 pb, respectivamente. De esta manera, se aseguró que cada línea posee sólo uno de los fragmentos de interés. Las plantas que dieron positivo para solamente uno de los PCRs aplicados se mantuvieron en medio hidropónico (sección 4.3.2) hasta completar su desarrollo y posteriormente se colectaron sus semillas.

#### **4.3.7 Obtención de líneas transformantes homocigotas en *Arabidopsis thaliana*.**

Para identificar individuos homocigotos en las líneas transformantes es necesario tener semillas de la segunda generación filial de transformantes ( $T_2$ ), e identificarlos mediante segregación mendeliana respecto a la adquisición de la resistencia al herbicida BASTA. Una vez obtenidas las líneas transformadas para cada construcción (confirmadas por PCR, sección 5.1, Figuras 11, 12, 13, 14, 15), éstas se dejaron crecer hasta que completaron su ciclo de vida, se colectaron las semillas, se esterilizaron (sección 4.3.1) y sembraron en medio MS con agente de selección (sección 4.3.2). Tras una semana de incubación, se traspasaron 8 plantas resistentes a BASTA de cada una de las líneas, a medio hidropónico hasta que completaron su ciclo de vida, y nuevamente se colectaron las semillas correspondientes ( $T_3$ ). Estas semillas fueron esterilizadas y sembradas en medio de selección (al igual que anteriormente), y tras 7 días de incubación se contó el número de resistentes a BASTA. Se sembraron al menos 200 semillas para cada una de las 8 plantas por línea sembradas. Se consideraron homocigotas las plantas cuyas semillas mostraron un 100% de resistencia a BASTA, y se mezclaron dichas semillas (para cada línea) para los experimentos posteriores.

#### **4.3.8 Análisis fenotípico de líneas transformantes.**

Tras identificar plantas homocigotas para cada línea obtenida, éstas se sembraron en medio MS (sección 4.3.2), y tras 7 días de desarrollo 11 plantas de cada línea se traspararon a medio hidropónico (sección 4.3.2). A las 4 semanas de crecimiento se fotografiaron (cámara Fujifilm FinePix HS25EXR) las plantas para medir la longitud de sus tallos principales mediante ImageJ (versión 1.44), además se cuantificó el número de hojas en la roseta, hojas caulinares, tallos secundarios, flores y silicuas, con los que se realizó test de ANOVA de una vía con un post-test de Tukey (sección 4.8), para evidenciar diferencias significativas entre las líneas analizadas respecto a la línea control (transformadas con el vector pEarleyGate 202). A la semana 5 de desarrollo, se registró el peso fresco de las plantas, y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido, y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , las hojas rosetas de al menos 3 plantas por línea para realizar extracción de azúcares (sección 4.3.10) y proteínas totales (sección 4.3.9). Tres plantas por cada línea fueron envueltas en papel de aluminio y secadas a  $\sim 60^{\circ}\text{C}$  durante 3 días, tras lo cual se registró el peso seco de las plantas y se calculó el porcentaje de agua en cada una de ellas.

#### **4.3.9 Extracción de proteínas.**

Para la extracción de proteínas desde *Arabidopsis thaliana* se utilizó un protocolo modificado de Tao y cols., (1995). Plantas de 5 semanas de desarrollo, fueron cosechadas y congeladas en  $\text{N}_2$  líquido. Se molió con pistilo y se homogeneizó 100 mg de cada tejido en 400  $\mu\text{L}$  de Buffer Fosfato-Sodio ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  100 mM pH 6,8; NaCl 150 mM; EDTA 10 mM; Tiourea 10 mM; Tween-20 0,3% v/v; Triton X-100 0,05% v/v;

DTT 10 mM) manteniendo la cadena de frío en hielo. Se centrifugó por 20 min a 15000 g a 4°C, tras lo cual se rescató el sobrenadante. Para la comparación entre las líneas transformantes obtenidas se mezclaron 300 µL de 3 plantas de la misma línea, obteniéndose una muestra compuesta para cada línea analizada. Las proteínas fueron cuantificadas por medio del ensayo proteico Bio-Rad (sección 4.6). Una vez cuantificadas las proteínas se realizaron ensayos de SDS-PAGE (sección 4.7) y western-blot (sección 4.7.2), utilizando 30 µg de proteína por muestra de cada línea transformante. El bloque inicial se realizó con TBS-T con leche descremada al 4% (p/v). Los antisueros  $\alpha$ -His-AtSDH y  $\alpha$ -His-AtA6PR se utilizaron en dilución 1:2000 y el anticuerpo  $\alpha$ -FLAG (Sigma-Aldrich) en dilución 1:3000, en TBS-T con leche descremada al 2%. El anticuerpo secundario  $\alpha$ -Mouse IgG se utilizó en dilución 1:10000 en TBS-T con leche descremada al 4% (p/v).

#### **4.3.10 Extracción de azúcares solubles.**

Se extrajeron los azúcares solubles totales de al menos 3 plantas por cada línea analizada, con lo que se determinó la cantidad de glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol en cada una de ellas. Para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa se utilizaron 100 mg PF de hojas rosetas, que fueron liofilizados durante 2 días, tras lo cual se pesaron nuevamente para determinar el peso seco de la muestra, y se almacenaron a -20°C hasta que se realizó la extracción de azúcares. En el caso de la cuantificación de sorbitol el material de partida consistió en 200-400 mg de tejido fresco en lugar de 100 mg (dependiendo de la disponibilidad del mismo). En ambos casos, los azúcares se extrajeron de la misma forma. Se molió el tejido en presencia de nitrógeno líquido,

cuidando de que en ningún momento la muestra se descongelara, y se agregó 1 mL de etanol 80%, tras lo cual se agitó a 80°C y 700 rpm durante 1 hr en una placa termostregulada (Mixing Block MB – 102, BIOER). Se centrifugó a 12000 g durante 10 min y se rescató el sobrenadante. Este paso de extracción se realizó 3 veces. Posteriormente se realizó una extracción con cloroformo para eliminar los pigmentos que pudiesen interferir en la cuantificación de azúcares posterior, para lo cual se separó cada sobrenadante en fracciones de ~450  $\mu$ L, y se agregó 350  $\mu$ L de cloroformo y 150  $\mu$ L de agua Milli-Q, se agitaron brevemente en vortex y se centrifugaron a 2700 g durante 10 min. Se rescataron 300  $\mu$ L de la fase acuosa resultante para cada tubo y se juntaron todas las fases acuosas para cada muestra inicial. Se concentraron durante 1 día por vacío a temperatura ambiente, y luego el líquido restante se eliminó por liofilización durante ~15 hrs. Finalmente se resuspendieron los azúcares en 200  $\mu$ L de agua Milli-Q, y se almacenaron a -20°C hasta que se realizó la cuantificación de azúcares.

#### **4.3.11 Cuantificación de azúcares.**

Una vez extraídos los azúcares solubles (sección 4.3.10), se utilizaron 2 kits para su cuantificación, uno para la cuantificación de sacarosa, fructosa y glucosa (Sucrose/Fructose/D-Glucose Assay Kit, Megazyme International), y uno para la cuantificación de sorbitol y/o xilitol (D-Sorbitol/Xylitol Assay Kit, Megazyme International). Ambos kits se escalaron, reduciendo 10 veces los volúmenes ocupados, y las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos. Para el kit de cuantificación de sacarosa, fructosa y glucosa se ocupó un volumen de muestra de 30  $\mu$ L, y en cada cuantificación se construyó además una curva de calibración con concentraciones de

0,025; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,3 g/L de cada uno de los azúcares. El resto del procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de sorbitol y/o xilitol, se ocuparon 60 µL de muestra, y se hizo en cada estimación una curva de calibración con concentraciones de 0,00325; 0,00625; 0,0083; 0,01; 0,02; y 0,05 g/L de sorbitol.

#### 4.4 Visualización y cuantificación de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Para la separación de fragmentos de ADN se realizó electroforesis en geles de agarosa (1-2,5%, dependiendo del tamaño de la banda) disuelta en tampón TAE (0,49 % p/v Tris; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM pH 8). Una vez realizada la electroforesis los geles fueron incubados en una solución de bromuro de etidio de 2 µg/mL durante 20 min y luego fueron visualizados en un trans-iluminador UV Gene Genius Classic (SynGene). Las imágenes fueron obtenidas con el programa GeneSnap versión 7.12.10. Las cuantificaciones de los fragmentos de interés se realizaron con el programa ImageJ versión 1.44.

#### 4.5 Programas de PCR y partidores utilizados.

La lista completa de programas de PCR y partidores empleados en el transcurso de esta tesis de magíster se muestran en las siguientes Tablas.

**Tabla I. Lista de partidores utilizados en esta tesis de magíster. Se añade una descripción con las combinaciones de partidores utilizados para cada uno de los fragmentos amplificados.**

Partidor	Secuencia (5' → 3')	Descripción
35S.pcambia.F	AAGATACAGTCTCAGAAGACC	Junto con MdS6PDH-R amplifican un fragmento de 1470 pb. Junto con AtA6PR.int amplifican un fragmento de 1421 pb.
MdS6PDH-F	ATGTCCACCGTCACCCTGAGC	Amplifican un fragmento de 934 pb.
MdS6PDH-R	GTCGACTTATGCATACACGTCTAAGCC	
S6F	ATGGAGATAAACTGAAC	Amplifican un fragmento de 930 pb.
S6R	TCAAGCGTAGAGATCAAT	

AtA6PR.intR	TGGTTGGTTCGTGCGGTAT	
CmrForward	AGACGGTGAGCTGGTGATATGGGAT	Amplifican un fragmento de 1039 pb.
Ccdb Reverse	TGATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGA	
M13-F (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT	Utilizado para secuenciación por Macrogen.
M13-R (-20)	AACAGCTATGACCATG	Utilizado para secuenciación por Macrogen.
Gapa-F	GGTAGGATCGGGAGGAAC	Amplifican un fragmento de ~450 pb.
Gapa-R	CTGGTGCCAAGAAGGTTATC	

Tabla II. Lista y descripción de los programas de PCR realizados en esta tesis.

Nombre programa	Estado	Paso	Temperatura [°C]	Tiempo [min:seg]	n° de ciclos
MdA6PR-Pfu	1	1	94	4:00	1
	2	1	94	0:45	30
		2	60	0:30	
		3	72	1:20	
	3	1	72	10:00	1
4	1	10	∞		
AtA6PR-Taq	1	1	94	4:00	1
	2	1	94	0:45	35
		2	58	0:40	
		3	72	1:30	
	3	1	72	10:00	1
4	1	10	∞		
MdA6PR-Taq	1	1	94	4:00	1
	2	1	94	0:45	35
		2	60	0:40	
		3	72	1:20	
	3	1	72	10:00	1
4	1	10	∞		
Cmr-Ccdb	1	1	94	4:00	1
	2	1	94	0:45	30
		2	70	0:20	
		3	72	1:30	
3	1	72	10:00	1	

	4	1	10	$\infty$	
PCR GAPA	1	1	94	4:00	1
	2	1	94	0:30	30
		2	55	0:40	
		3	72	0:40	
	3	1	72	10:00	1
4	1	10	$\infty$		
35S-MdA6PR	1	1	94	4:00	1
	2	1	94	0:45	30
		2	62	0:25	
		3	72	1:30	
	3	1	72	10:00	1
4	1	10	$\infty$		
35S-AtA6PR	1	1	94	4:00	1
	2	1	94	0:45	30
		2	70	0:20	
		3	72	1:30	
	3	1	72	10:00	1
4	1	10	$\infty$		

#### 4.6 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de todos los extractos proteicos utilizados en esta tesis se realizaron con el ensayo proteico Bio-Rad, el cual está basado en el método de Bradford (Bradford, 1976). En triplicados, se cargaron 2  $\mu$ L de la muestra a cuantificar en tubos de 1,5 mL y se completó con agua hasta los 800  $\mu$ L. El mismo procedimiento se hizo con la proteína BSA, utilizada como estándar, agregando desde 0 a 10  $\mu$ g de proteína, tomando al menos 5 cantidades distintas. Luego se agregó a cada tubo 200  $\mu$ L del reactivo tinte, se mezclaron vigorosamente y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, luego de lo cual se registró la  $A_{595}$ . Con los datos para la proteína estándar, se confeccionó una

curva de calibración con lo cual fue posible determinar la concentración de las proteínas problema. Para cada estimación de concentración se realizó una curva de calibración, para asegurar que no hubiese variación en el estado del tinte con el paso del tiempo.

#### **4.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE).**

Para las identificaciones de His-AtSDH (~43 kDa), AtSDH (~40 kDa), His-AtA6PR (~38,6 kDa), FLAG-AtA6PR (~36,7 kDa) y AtA6PR (~35 kDa), se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), con gel concentrador al 4% (p/v), y gel separador al 12% (p/v), lo que permite una buena resolución de proteínas de tamaños 30 – 75 kDa. Los geles fueron montados utilizando el sistema Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). El gel separador fue preparado usando 1,7 mL de agua desionizada, 2 mL de una solución de acrilamida 30% (p/v) y bis-acrilamida 0,8% (p/v); 1,3 mL de un tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 50 µL de SDS 10% (p/v); 30 µL de APS 10% (p/v) y 5 µL de TEMED. El gel concentrador fue preparado usando 1,54 mL de agua desionizada, 0,335 mL de una solución de acrilamida 30% (p/v) y bis-acrilamida 0,8% (p/v); 0,625 mL de un tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 25 µL de SDS 10% (p/v), 25 µL de APS 10% (p/v) y 3 µL de TEMED. El tampón de corrida fue preparado con Tris-HCl 25 mM pH 8,8; glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v). La cantidad de proteína cargada en cada gel varía según el experimento (especificada en la sección correspondiente al experimento), pero todas se precipitaron previamente agregando 4 volúmenes de acetona y centrifugándolas a 10000 g por 5 min. Se eliminó la acetona y se resuspendieron en tampón de carga denaturante 1X (Tris-HCl 125 mM

pH 6,8, glicerol 20% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (v/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v) y SDS 4% (p/v) y se incubaron por 10 min a 75°C, o hasta que las proteínas se hubiesen solubilizado. Una vez cargadas las muestras en el gel, éste se corrió 1 hr a 80 V y luego 2 hrs a 100 V. A continuación los geles fueron revelados por medio de tinción de Coomassie (sección 4.7.1), o transferidos a membranas de nitrocelulosa para identificar proteínas específicas mediante western-blot (sección 4.7.2). El tamaño de las proteínas fue estimado en base al marcador de peso molecular Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific).

#### **4.7.1 Tinción de Coomassie.**

Los geles SDS-PAGE fueron revelados con azul brillante Coomassie R-250 0,3% (p/v) disuelto en una mezcla de metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v). Los geles fueron incubados en esta mezcla durante 1 hr con agitación suave constante y luego incubados en una solución de destañido (metanol 20% (v/v), ácido acético 10% (v/v)) hasta obtener un contraste claro de las bandas.

#### **4.7.2 Inmunodetección mediante western-blot.**

Una vez terminada la electroforesis, se transfirieron las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific) usando la cámara de transferencia Trans-Blot<sup>®</sup> SD "Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell" (Bio-Rad). Seis papeles filtro Whatman n°1, el gel y la membrana fueron embebidos en tampón de transferencia (glicina 192 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,3; SDS 0,1% (p/v) y metanol 15% (v/v)), y se dispusieron en la cámara de transferencia en el orden (con respecto al cátodo): 3 papeles filtros, membrana de nitrocelulosa, gel de poliacrilamida y 3 papeles

filtro. La transferencia se efectuó a 15 V por 20 min. A continuación, se lavó la membrana en agua destilada y se determinó la presencia de proteínas en la membrana incubándola en una solución de Rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau 0,1% (p/v), ácido acético 5% (v/v)).

Se lavó la membrana con agua destilada hasta que la tinción desapareciera, luego se bloqueó en TBS-T con leche descremada por 1 hora (cuyo % (p/v) depende del experimento en cuestión. A continuación se lavó la membrana con TBS-T 3 veces durante 10 min, para luego incubarla en agitación durante 2 hrs con TBS-T con leche descremada y anticuerpo primario (el % (p/v) de la leche y la dilución del anticuerpo primario se detalla en cada experimento en particular). Posteriormente se repiten los lavados con TBS-T 3 veces por 10 minutos, y se incuba la membrana en agitación durante 2 hrs con TBS-T con leche descremada (% (p/v) detallado en cada experimento) con el anticuerpo secundario  $\alpha$ -Mouse IgG (sección) en dilución 1:10000. Finalmente se lava la membrana 3 veces durante 10 min con TBS-T y se procede al revelado de acuerdo a sección 4.2.10.6.

#### **4.8 Análisis estadístico.**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism® versión 5.00.

## 5 Resultados

### 5.1 Generar plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobre-acumulen la proteína A6PR.

El primer paso en la generación de plantas sobre-acumuladoras de A6PR fue la construcción de los vectores de entrada pCR8-AtA6PR y pCR8-MdA6PR, el primero de los cuales fue obtenido por Sofia Zamudio previamente (Zamudio, 2010). El fragmento correspondiente a la secuencia codificante de *MdA6PR* se amplificó a partir del vector pET-19b-MdA6PR (Figueroa e Iglesias, 2010), con la enzima de alta fidelidad *pfu*, para su posterior purificación desde geles de agarosa (Figura 3).

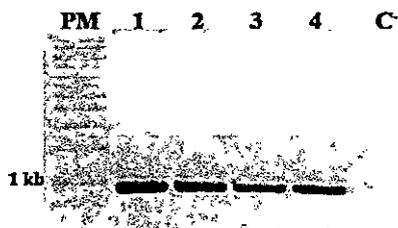


Figura 3. Amplificación por PCR de *MdA6PR* desde pET-19b-MdA6PR. PM, estándar de peso molecular; carriles 1-4, réplicas de amplificación; C, control negativo usando agua como templado.

Con estas reacciones se procedió a purificar la banda del tamaño esperado (~1 kb), se cuantificó la cantidad de ADN presente en la muestra y se procedió a agregar una adenina terminal en los extremos del amplicón (sección 4.2.4). Esto último debe realizarse debido a que la enzima *pfu* posee actividad 3'-5' exonucleasa, y para poder clonar el fragmento de interés en el vector de entrada pCR8 se necesita que el inserto posea extremos cohesivos con adenina terminal, para lo cual se utiliza la enzima Taq polimerasa, y así clonar el amplicón en pCR8 (sección 4.2.4). Una vez realizada la reacción de unión entre el fragmento de interés y el vector de entrada se procedió a

transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes por golpe térmico (sección 4.2.5). Posteriormente se seleccionaron 8 colonias y se realizó un PCR para amplificar el marco de lectura de *Mda6PR* (sección 4.2.1, Tabla II, Figura 4).



**Figura 4.** PCR de colonia amplificando *Mda6PR*. Colonias de *E. coli* transformadas con los productos de una reacción de ligación entre el marco de lectura de *Mda6PR* y pCR8 fueron sometidas a una reacción de PCR para amplificar *Mda6PR*. PM, estándar de peso molecular; carriles 1-8, colonias seleccionadas; C<sup>-</sup>, control negativo (agua); C<sup>+</sup>, control positivo (minipreparación de pET-19b-*Mda6PR*).

Como puede verse en la Figura 4; 7 de las 8 colonias seleccionadas poseen el fragmento correspondiente a la región codificante de *Mda6PR*. Con este resultado se procedió a realizar una digestión de cada uno de los clones positivos (sección 4.2.2), con la enzima *Ava*I (Figura 5). De esta manera, si el inserto se encuentra en orientación sentido con respecto a los sitios de recombinación *att*L1 y *att*L2 (Figura 2) se obtendrán fragmentos de 1300, 1150, 904 y 402 pb, en tanto que si se encuentra en antisentido, los fragmentos observados serán de 1300, 904, 777 y 775 pb (los dos últimos no se resolverán en el gel).

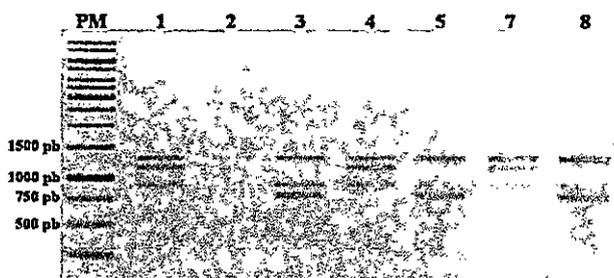


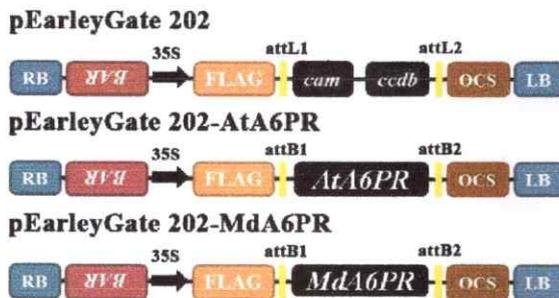
Figura 5. Digestión de pCR8-MdA6PR con la enzima de restricción *Ava*I. PM, estándar de peso molecular, carriles 1-8, colonias ensayadas.

De la Figura 5 se desprende que los clones 1, 2, 4 y 7 poseen el inserto en sentido, y el resto en orientación antisentido, por lo tanto se continuó trabajando con los clones en sentido, mandando a secuenciar alícuotas de sus minipreparaciones (sección 4.2.6). Se constató que todos los clones poseían una mutación silenciosa en la posición 87 de la secuencia, produciéndose un cambio de una adenina por una guanina, sin provocar cambio aminoacídico, por lo que se continuó trabajando con el clon 1. El vector pCR8-AtA6PR fue previamente secuenciado por Sofía Zamudio, (Zamudio, 2010).

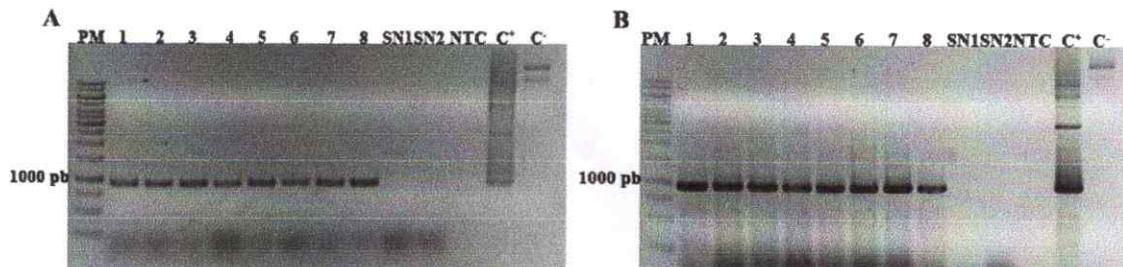
Una vez que se obtuvieron ambos vectores de entrada, se procedió a realizar la recombinación con el vector de destinación pEarleyGate 202 (Figura 6), que tiene entre sus propiedades (en la planta) un promotor de expresión constitutiva 35S (derivado del virus del mosaico de la coliflor), comandando la expresión del gen de interés, el cual se encuentra fusionado en su extremo N-terminal a un epítipo FLAG (DYKDDDDK; 1,012 kDa), para la detección de la proteína de fusión mediante western-blot utilizando anticuerpos comerciales. Además confiere resistencia al herbicida BASTA, permitiendo una rápida selección de las plantas transformantes (Earley y cols., 2006). Con la mezcla de recombinación se procedió a transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes por golpe térmico. En esta ocasión también se transformaron células de *E. coli* DB3.1

con el vector pEarleyGate 202, para las cuales el gen *ccdb* no es letal, de manera que el vector sin recombinar puede ser propagado en estas células, y ser posteriormente utilizado para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante *Agrobacterium*.

Tras la transformación de las bacterias, se seleccionaron 8 colonias por transformación y se les realizó un PCR (sección 4.2.1, Tabla II) para verificar la presencia del inserto de interés, amplificando el total de la longitud de los ADNc de cada gen (*AtA6PR* o *MdA6PR*), de alrededor de 1 kb (Figura 7).



**Figura 6.** Esquema que muestra las regiones de interés de las distintas construcciones que usan como base el vector pEarleyGate 202. RB y LB, “right border” y “left border” respectivamente, corresponden a las secuencias que son reconocidas por la maquinaria de *Agrobacterium tumefaciens* y que delimitan la región que será insertada en el genoma de la planta; *BAR*, gen de resistencia al herbicida BASTA; 35S, promotor del virus del mosaico de la coliflor; FLAG, epítipo inmunogénico para detección de trasgenes; attL y attB, secuencias de reconocimiento para recombinación entre vector de entrada (pCR8) y de destinación (pEarleyGate 202); *cam*, gen de resistencia a cloranfenicol; *ccdb*, gen letal cuyo producto génico ataca la ADN girasa en *E. coli DH5α*; *AtA6PR*, ADNc de la aldosa 6-fosfato reductasa de *Arabidopsis thaliana*, *MdA6PR*, ADNc de la aldosa 6-fosfato reductasa de *Malus domestica*; OCS, secuencias 3’ del gen de la octopina sintasa, que incluyen señales de poli-adenilación y de término de la transcripción.



**Figura 7.** PCR de colonia de *E. coli* transformadas con vector pEarleyGate 202-AtA6PR y pEarleyGate 202-MdA6PR. Se realizó un PCR amplificando el marco de lectura completo del ADNc del gen que contiene cada vector, *AtA6PR* (A) o *MdA6PR* (B). PM, estándar de peso molecular; Carriles 1-8, colonias seleccionadas; SN1 y SN2, colonias transformadas con pEarleyGate 202 (sin inserto); NTC, agua; C<sup>+</sup>, control positivo utilizando como templado la construcción correspondiente en pCR8; C<sup>-</sup>, control negativo utilizando minipreparación de pEarleyGate 202.

Como puede observarse en la Figura 7, para ambas construcciones se obtuvieron colonias positivas, por lo tanto se procedió a realizar minipreparación de las primeras 4 colonias en cada caso (sección 4.2.2), para posteriormente realizar un ensayo de digestión con la enzima de restricción EcoRI. Este ensayo de restricción es realizado con el fin de reforzar el resultado del PCR y tener absoluta certeza de que la recombinación fue exitosa (sección 4.2.7). Luego de la digestión, los tamaños esperados para pEarleyGate 202-AtA6PR son 8652, 1470, 703 y 245 pb, y para pEarleyGate 202-MdA6PR son 8652, 1477, 518, 248, 117 y 74 pb. Para el vector sin inserto, los tamaños esperados son 9879 y 1894 pb. Por último, ambos vectores con inserto sin digerir pesan alrededor de 11 kb (Figura 8).

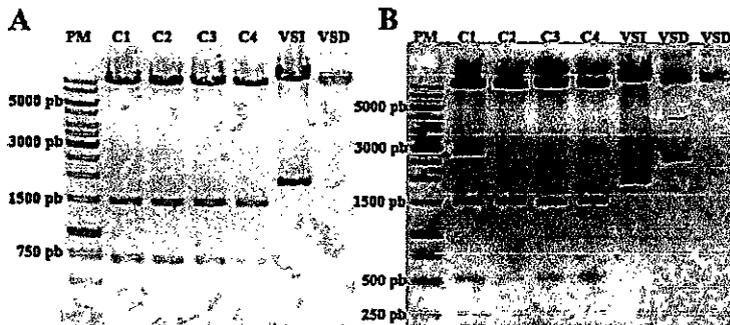


Figura 8. Digestión enzimática de los vectores pEarleyGate 202-AtA6PR (A) y pEarleyGate 202-MdA6PR (B), con la enzima de restricción EcoRI. PM, estándar de peso molecular; C1-C4, colonias seleccionadas en cada ensayo; VSI, vector sin inserto; VSD, vector sin digerir de clon 1 (A), clones 1 y 2 (B).

Como puede verse en la Figura 8, los 4 clones seleccionados para cada vector presentan las bandas del tamaño esperado. No es posible detectar las bandas de tamaño 117 y 74 pb, sin embargo con las bandas que sí se pueden visualizar es suficiente para confirmar la correcta recombinación de los vectores de entrada y de destinación. En este paso se eligió un clon por constructo para seguir el trabajo, de manera arbitraria entre los que se obtuvo el resultado esperado en el ensayo de restricción; para pEarleyGate 202-AtA6PR

se seleccionó el clon 1 (Figura 8A), y para pEarleyGate 202-MdA6PR el clon 2 (Figura 8B). Se procedió a transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones y el vector sin inserto, por medio de golpe térmico (sección 4.2.9). Una vez transformadas las bacterias, se hizo un PCR de colonia, esta vez amplificando una región de alrededor de 1,5 kb (para ambos insertos) que comprende el promotor 35S más el marco de lectura completo de ambos genes clonados (Tabla II, Figura 9)

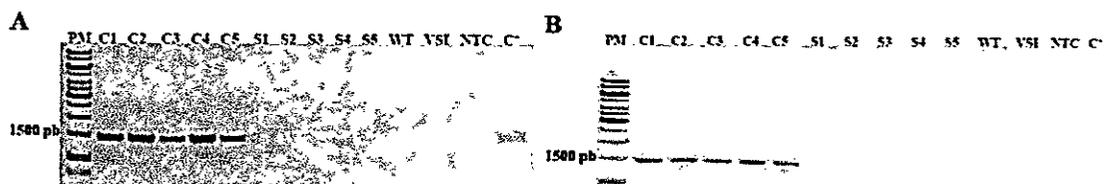


Figura 9. PCR de colonia de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con pEarleyGate 202-AtA6PR (A) y pEarleyGate 202-MdA6PR (B). PM, estándar de peso molecular; C1-C5, colonias seleccionadas; S1-S5, colonias transformadas con vector sin inserto; WT, ADN de *Arabidopsis thaliana*; VSI, minipreparación de vector sin inserto; NTC, agua; C<sup>+</sup>, control positivo usando como templado la construcción de pEarleyGate 202 correspondiente.

Como puede observarse en la Figura 9, se transformó eficazmente *A. tumefaciens*, con lo cual se procedió a transformar establemente *Arabidopsis thaliana* (sección 4.3.3).

Para la transformación de *Arabidopsis*, se utilizaron plantas silvestres del ecotipo Columbia 0, además de dos líneas mutantes insercionales de la colección SALK, previamente caracterizadas en nuestro laboratorio, denominadas *sdh1-1* y *sdh1-4*. Estas líneas poseen una inserción de un ADN-T de 4,5 kb que interrumpe la secuencia génica de *AtSDH*, en el exón 3 y exón 5, respectivamente, de tal forma que los niveles de transcrito en estas líneas son <1 % de los niveles observadas en plantas silvestres (Aguayo y cols., 2013).

Una vez que se tuvieron plantas en las condiciones adecuadas, se procedió a realizar la transformación de éstas con los constructos diseñados y con el vector sin inserto

mediante el método de inmersión floral (sección 4.3.3). Posteriormente se colectaron las semillas de las plantas transformadas y se las sembraron en medio de selección para la identificación de posibles transformantes (sección 4.3.6). El vector pEarleyGate 202 confiere a las plantas que lo portan, la resistencia al herbicida BASTA, de tal forma que al ser sembradas en medio de selección (medio MS suplementado con BASTA, sección 4.3.2) presentan un fenotipo distinto a las plantas silvestres, las cuales ven afectado su desarrollo drásticamente (datos no mostrados), siendo por lo tanto una manera efectiva para identificar los organismos donde la transformación se llevó a cabo. Una vez identificados éstos, se traspasaron a medio hidropónico (sección 4.3.2) para que completen su ciclo de vida, y tras aproximadamente un mes de desarrollo, se colectó tejido de hoja roseta de cada una de las plantas para realizar una extracción de ADN<sub>g</sub> (sección 4.3.4) y corroborar mediante PCR la presencia de los insertos de interés (sección 4.3.6). Previamente a la realización del PCR para identificar a los transformantes, se realizó un PCR para determinar la calidad del ADN<sub>g</sub> extraído, para así tener la certeza de que el templado esté en las condiciones adecuadas para reacciones posteriores. Para evaluar la calidad del ADN<sub>g</sub>, se realizó un PCR (Tabla II) amplificando el gen *GAP*A (gen que codifica para la subunidad 1 de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Se realizó el PCR para todas las plantas T<sub>1</sub> resistentes a BASTA, y se muestra una imagen representativa de estos resultados (sección 4.3.5, Figura 10). En caso de que el PCR resultase negativo para alguna muestra, se colectó nuevamente tejido (cuando fue posible), se repitió la extracción y el PCR *GAP*A (datos no mostrados).

A continuación se introduce la nomenclatura de los distintos genotipos transformados con las distintas construcciones:

Tabla III. Nomenclatura de las líneas obtenidas tras la transformación con pEarleyGate 202, pEarleyGate 202-AtA6PR y pEarleyGate 202-MdA6PR.

Genotipo	Inserto	Nombre
Silvestre	Sin inserto	wsn
Silvestre	ADNc de <i>AtA6PR</i>	wat
Silvestre	ADNc de <i>MdA6PR</i>	wmd
<i>sdh1-1</i>	Sin inserto	1sn
<i>sdh1-1</i>	ADNc de <i>AtA6PR</i>	1at
<i>sdh1-1</i>	ADNc de <i>MdA6PR</i>	1md
<i>sdh1-4</i>	Sin inserto	4sn
<i>sdh1-4</i>	ADNc de <i>AtA6PR</i>	4at
<i>sdh1-4</i>	ADNc de <i>MdA6PR</i>	4md

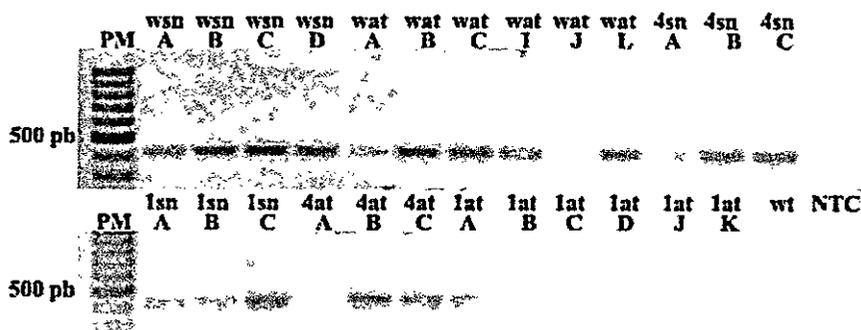
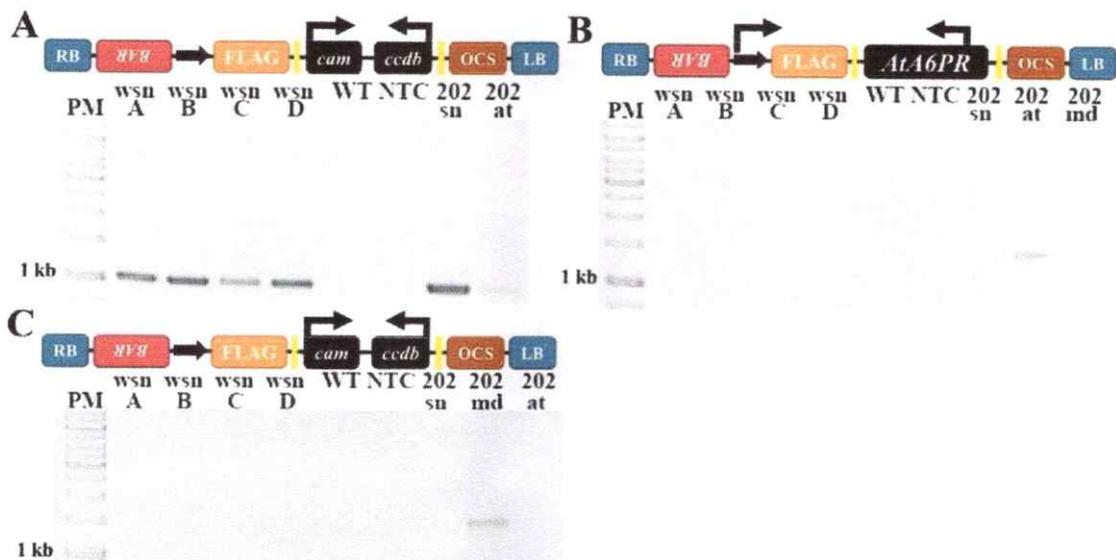


Figura 10. PCR amplificando el gen *GAPA* de *Arabidopsis*, utilizado para comprobar la calidad de las muestras de ADNg extraído. Para las definiciones de wsn, wat, 4sn, 1sn, 4at y 1at, ver Tabla III. wt, planta silvestre; NTC, control negativo usando agua como templado; PM, estándar de peso molecular.

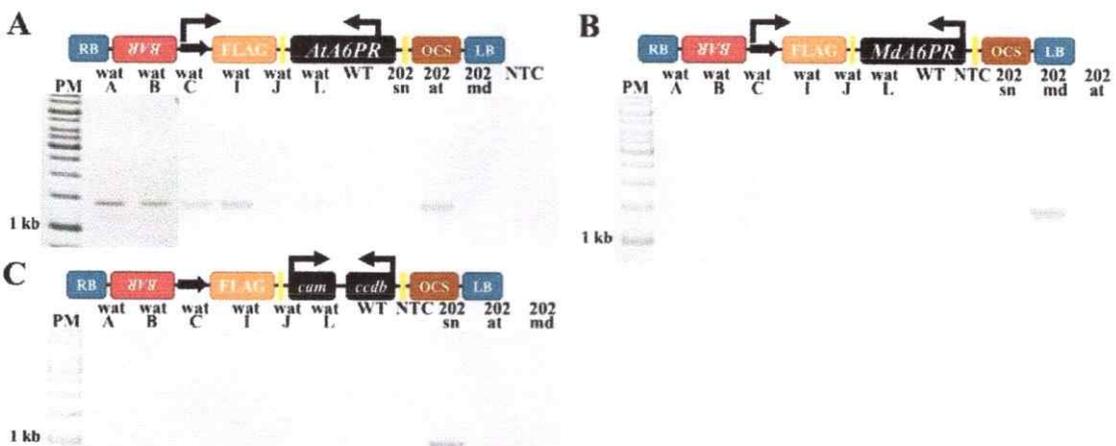
Una vez que se corroboró la integridad de los ADNg extraídos, se procedió a realizar el PCR (sección 4.2.1) para determinar la presencia de los distintos transgenes de interés. Para pEarleyGate 202-AtA6PR se amplificó la región correspondiente al promotor 35S presente en el vector, más la región codificante de *FLAG* y *AtA6PR* (Tabla II, 1421 pb), para pEarleyGate 202-MdA6PR se amplificó la región correspondiente al promotor 35S presente en el vector, más la región codificante de *FLAG* y *MdA6PR* (Tabla II, 1470 pb) y para pEarleyGate 202 se amplificó la región codificante del gen *cam* más la región

codificante del gen *ccdb* (Tabla II, 1039 pb)(Figura 6). Para genotipificar cada línea y determinar su identidad inequívocamente, a cada muestra se le aplicaron los 3 PCRs descritos, de tal manera de asegurar que dieran resultado positivo solamente para uno de los insertos en cuestión, y cerciorarse de la ausencia de falsos positivos.

En el caso de la mutante *sdh1-4*, tras analizar 12 posibles transformantes 4at y 9 posibles 4md, no se obtuvieron transformantes para ninguno de los insertos de interés (habiendo crecido en medio de selección con BASTA). En tanto, para 4sn, sí se obtuvieron 2 plantas positivas, para el PCR Cam-Ccdb (Tabla II) de 4 evaluadas (datos no mostrados). Sin embargo no se las utilizaron en el transcurso de esta tesis dado que corresponden al control de 4at y 4md, y al no tener plantas de estas líneas, fue innecesario seguir analizando ambas líneas 4sn. Para el resto de los posibles transformantes de cada línea, se muestran las imágenes de los PCRs realizados, además de un diagrama ilustrando la región amplificada en cada ensayo (Figuras 11, 12, 13, 14, 15).



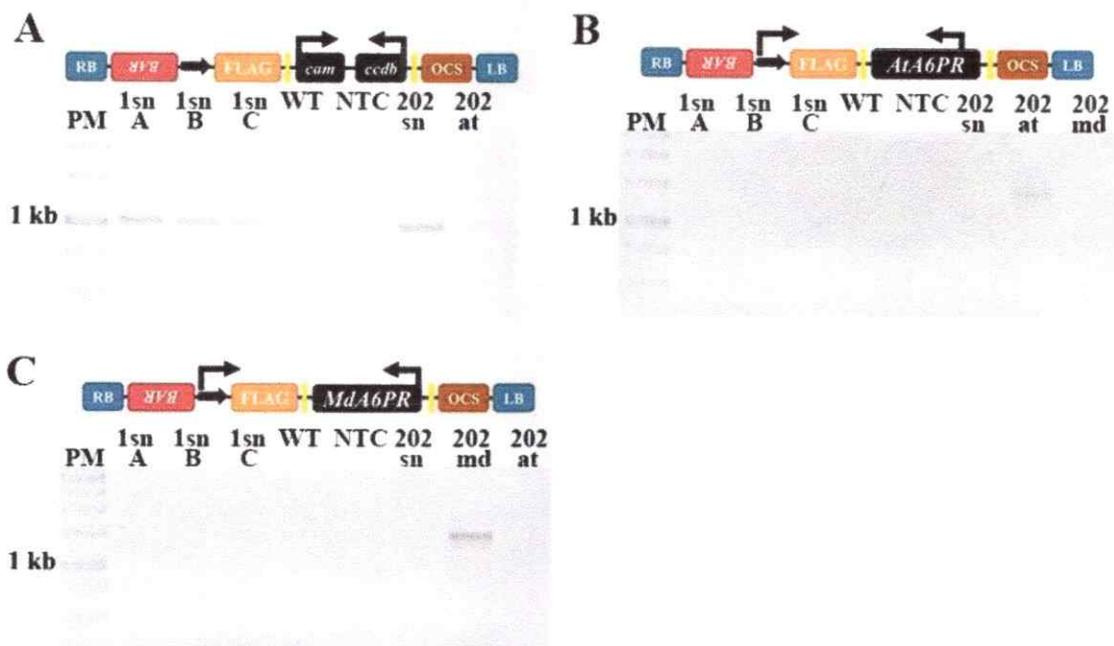
**Figura 11.** PCRs realizados en las posibles líneas *wsn*. Sobre cada gel se muestra un esquema de la región a amplificar, demarcado por las flechas negras que simbolizan las posiciones de los partidores en cada caso. *wsn* (A-D), ADN<sub>g</sub> de posible transformante *wsn*; WT, ADN<sub>g</sub> de planta silvestre; 202 sn, minipreparación de pEarleyGate 202; 202 at, minipreparación de pEarleyGate 202-AtA6PR; 202 md, minipreparación de pEarleyGate 202-MdA6PR; NTC, control usando agua como templado; PM, estándar de peso molecular.



**Figura 12.** PCRs realizados en las posibles líneas *wat*. Sobre cada gel se muestra un esquema de la región a amplificar, demarcado por las flechas negras que simbolizan las posiciones de los partidores en cada caso. *wat* (A-L), ADN<sub>g</sub> de posible transformante *wat*; WT, ADN<sub>g</sub> de planta silvestre; 202 sn, minipreparación de pEarleyGate 202; 202 at, minipreparación de pEarleyGate 202-AtA6PR; 202 md, minipreparación de pEarleyGate 202-MdA6PR; NTC, control usando agua como templado; PM, estándar de peso molecular.

Como se puede ver, se obtuvieron 5 líneas para *wat* (Figura 12) y 4 para *wsn* (Figura 11), las que mostraron amplificación sólo de los insertos esperados. No se obtuvieron

posibles transformantes wmd, dado que no hubo plantas que presentaran un fenotipo de resistencia al herbicida (datos no mostrados).



**Figura 13.** PCRs realizados en las posibles líneas 1sn. Sobre cada gel se muestra un esquema de la región a amplificar, demarcado por las flechas negras que simbolizan las posiciones de los partidores en cada caso. 1sn (A-C), ADN<sub>g</sub> de posible transformante wsn; WT, ADN<sub>g</sub> de planta silvestre; 202 sn, minipreparación de pEarleyGate 202; 202 at, minipreparación de pEarleyGate 202-AtA6PR; 202 md, minipreparación de pEarleyGate 202-MdA6PR; NTC, control usando agua como templado; PM, estándar de peso molecular.

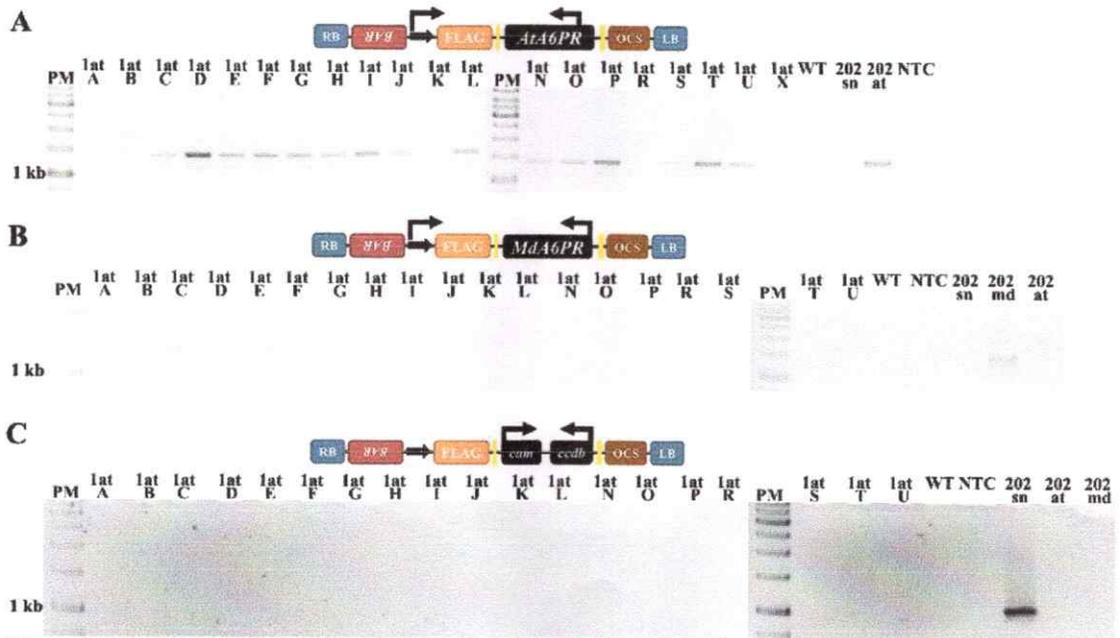


Figura 14. PCRs realizados en las posibles líneas 1at. Sobre cada gel se muestra un esquema de la región a amplificar, demarcado por las flechas negras que simbolizan las posiciones de los partidores en cada caso. 1at (A-X), ADNg de posible transformante wsn; WT, ADNg de planta silvestre; 202 sn, minipreparación de pEarleyGate 202; 202 at, minipreparación de pEarleyGate 202-AtA6PR; 202 md, minipreparación de pEarleyGate 202-MdaA6PR; NTC, control usando agua como templado; PM, estándar de peso molecular.

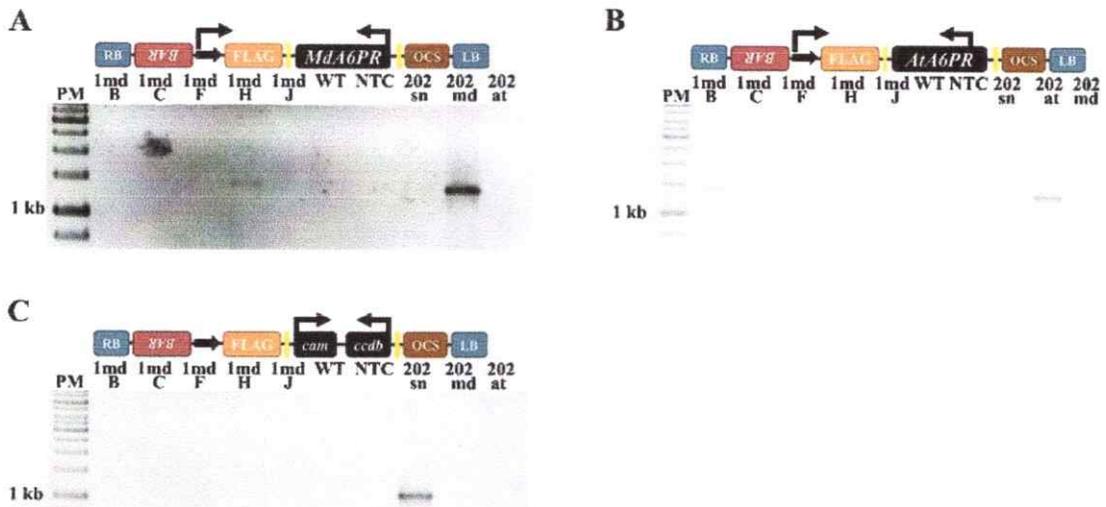


Figura 15. PCRs realizados en las posibles líneas 1md. Sobre cada gel se muestra un esquema de la región a amplificar, demarcado por las flechas negras que simbolizan las posiciones de los partidores en cada caso. 1md (B-J), ADNg de posible transformante wsn; WT, ADNg de planta silvestre; 202 sn, minipreparación de pEarleyGate 202; 202 at, minipreparación de pEarleyGate 202-AtA6PR; 202 md, minipreparación de pEarleyGate 202-MdaA6PR; NTC, control usando agua como templado; PM, estándar de peso molecular.

Como se ve en las Figuras, se obtuvieron 15 líneas 1at (Figura 14), 3 líneas 1sn (Figura 13) y 1 línea 1md (Figura 15), sin embargo, la línea 1md presentó un fenotipo enano y no dio semillas (datos no mostrados).

De esta forma se continuó trabajando con las líneas wat, wsn, 1at y 1sn, de las cuales se obtuvo un número suficiente de transformantes como para comparar tanto el crecimiento como la acumulación de proteínas y azúcares presentes en éstas.

Se volvieron a sembrar sucesivamente las líneas elegidas en medio de selección (sección 4.3.2) hasta obtener las semillas correspondientes a la tercera generación filial ( $T_3$ ), de las cuales se sembraron al menos 200 semillas en medio de selección con BASTA para determinar por medio de segregación mendeliana la homocigosis o heterocigosis de su parental correspondiente (sección 4.3.7, datos no mostrados). Este paso se realiza para disminuir la variación entre las plantas de una misma línea, que se puedan producir por efecto de dosis génica del inserto, entre plantas heterocigotas y homocigotas de una misma línea. Las plantas homocigotas de las generaciones  $T_3$  identificadas se sembraron en medio MS sin agente de selección, y tras una semana de incubación se traspararon 5 individuos por línea a medio hidropónico para que continuaran su desarrollo (este procedimiento fue repetido al menos en 3 ocasiones distintas, sección 4.3.8), y a la quinta semana de desarrollo se colectó tejido foliar (100 mg para extracción de proteínas y sacarosa, fructosa y glucosa, 200 mg para extracción de polioles, de al menos 3 plantas por línea) con el fin de evaluar la presencia de las proteínas del metabolismo del sorbitol (secciones 4.3.9 y 4.7), y cuantificar distintos azúcares en las plantas (secciones 4.3.10 y 4.3.11).

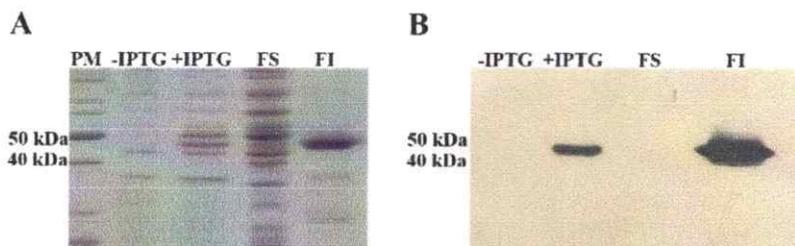
### 5.1.1 Evaluación de las proteínas involucradas en el metabolismo del sorbitol en *Arabidopsis thaliana*.

Reportes en la literatura sugieren que, al menos en Rosáceas, existe una correlación positiva entre los niveles de transcrito, proteína y actividad en las proteínas asociadas a la síntesis (A6PR) y metabolización de sorbitol (SDH), por lo que se sugiere que la regulación de estas proteínas es a nivel transcripcional y no post traduccional (de Sousa y cols., 2008; Kanamaru y cols., 2004; Loescher y cols., 1982; Zhou y cols., 2006). De esta forma, se eligió evaluar los niveles de proteína SDH, A6PR y FLAG-A6PR en las distintas líneas.

Para esto, se dispone de un anticuerpo monoclonal que reconoce el epítoto FLAG añadido a AtA6PR clonado en el vector pEarleyGate 202-AtA6PR (FLAG- AtA6PR, secciones 4.2.7 y 4.3.9), y un antisuero policlonal que reconoce a His-AtA6PR (Wurman, 2013). Por lo tanto, con el uso de ambos anticuerpos es posible determinar el cambio total en la proteína AtA6PR, además de determinar qué fracción proviene endógenamente de la planta y qué fracción corresponde a la expresada por el vector pEarleyGate 202-AtA6PR, con el que fueron transformadas las plantas (sección 4.2.7). Así, en esta tesis fue necesario obtener un antisuero policlonal capaz de detectar a AtSDH, para analizar sus niveles en el genotipo silvestre (con y sin transformación con FLAG-MdA6PR o FLAG-AtA6PR). Cabe destacar que se había determinado anteriormente que no hay niveles de proteína AtSDH detectables en el genotipo *sdh1-1* (Aguayo y cols., 2013), con un antisuero previamente obtenido (Mandujano, 2010), el cual ya se había agotado en el laboratorio antes de la realización de esta tesis.

### 5.1.2 Generación de un anticuerpo policlonal $\alpha$ -AtSDH

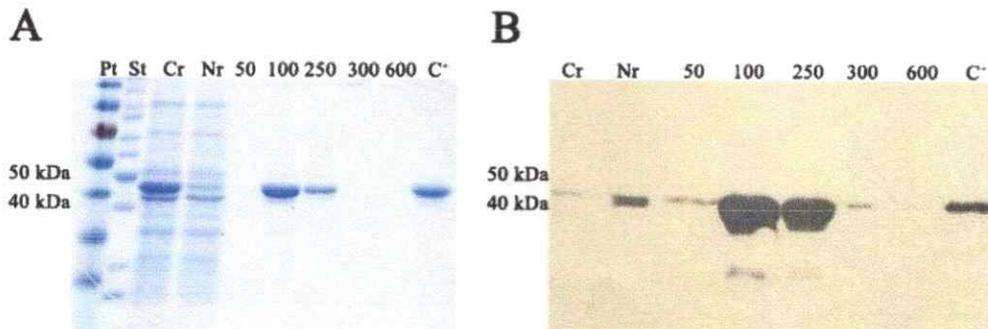
Se disponía en el laboratorio de células de *E. coli* BL21(DE3)pLys transformadas con el vector pET-28a-AtSDH, las cuales acumulan la proteína recombinante His-AtSDH (epítoto 6xHis, N-terminal) tras ser inducidas con IPTG (Mandujano, 2010). De esta manera, se realizó la inducción con IPTG y se extrajo las proteínas de ellas. Se obtuvieron dos fracciones proteicas, soluble e insoluble (la que fue resolubilizada, sección 4.2.10.1), con las cuales (y junto con muestras de células antes y después de inducir con IPTG) se realizaron ensayos de SDS-PAGE y western-blot  $\alpha$ -6xHis (secciones 4.7, 4.7.1 y 4.7.2), para evidenciar la integridad de la muestra y la aparición de la proteína de interés, respectivamente (Figura 16).



**Figura 16. Producción de His-AtSDH mediante sistema heterólogo en *E. coli*.** En A se muestra un SDS-PAGE tras tinción con azul de Coomassie de células de *E. coli* BL21(DE3)pLys previo (-IPTG) y después de inducir (+IPTG) la producción de His-AtSDH, y tras extraer sus proteínas en una fracción soluble (FS) y fracción insoluble (FI), en donde se pudo identificar a His-AtSDH en FI tras realizar un western-blot  $\alpha$ -6xHis (B).

Como puede verse en la Figura 16, tras la inducción con IPTG, aparece una banda del tamaño esperado para His-AtSDH (~43 kDa, Figura 16A y Figura 16B, carril +IPTG), y después de extraer las proteínas totales de las células, se puede apreciar que His-AtSDH se encuentra en la fracción insoluble (Figura 16B, carril FI), tras el análisis de western-blot con el anticuerpo  $\alpha$ -6xHis (sección 4.7.2). Este último resultado era esperado, ya que se tenían reportes previos de que His-AtSDH formaba cuerpos de inclusión en este

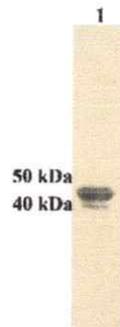
sistema (Mandujano, 2010). A partir de estos resultados se procedió a purificar His-AtSDH de la fracción insoluble resolubilizada, por medio de cromatografía de afinidad al ion níquel, utilizando columnas comerciales HisTrap™ HP (sección 4.2.10.2, Figura 17).



**Figura 17. Purificación de His-AtSDH por cromatografía de afinidad en columnas HisTrap™ HP.** A, SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. B, western-blot revelado con anticuerpo  $\alpha$ -6xHis de la purificación de His-AtSDH. Pt, marcador de peso molecular pre-teñido. St, marcador de peso molecular sin teñir. Cr, fracción insoluble de la extracción de *E. coli* inducidas con IPTG, previo al paso por la columna de afinidad. Nr, fracción de proteínas no retenida por la columna. 50; 100; 250; 300; 600, concentraciones de imidazol (en mM) con las que se eluyeron las proteínas durante la purificación. C<sup>+</sup>, His-AtSDH previamente purificada.

Como puede apreciarse en la Figura 17, la mayor parte de una proteína de tamaño ~43 kDa eluye entre los 100 y 250 mM de imidazol (Figura 17A), y por medio de un western-blot  $\alpha$ -6xHis, se deduce que aquella proteína corresponde a His-AtSDH (Figura 17B). De esta manera, se obtuvieron fracciones enriquecidas en la proteína antígeno, sin embargo, al tener una alta concentración de urea (6M, sección 4.2.10.1), estas soluciones podrían ser tóxicas para los ratones a los que posteriormente se les inyectará (sección 4.2.10.5). Por lo tanto, se dializaron las fracciones de 100 y 250 mM de imidazol (ambas fracciones fueron mezcladas), primero diluyendo lo máximo posible el imidazol de la muestra (sección 4.2.10.3), y luego cambiando el tampón a uno que fuese inocuo para los ratones (PBS, sección 4.2.10.3). Posteriormente, se concentró la proteína, para lo cual se utilizaron centricones de 30 y 50 kDa de tamaño de corte (el tamaño de His-

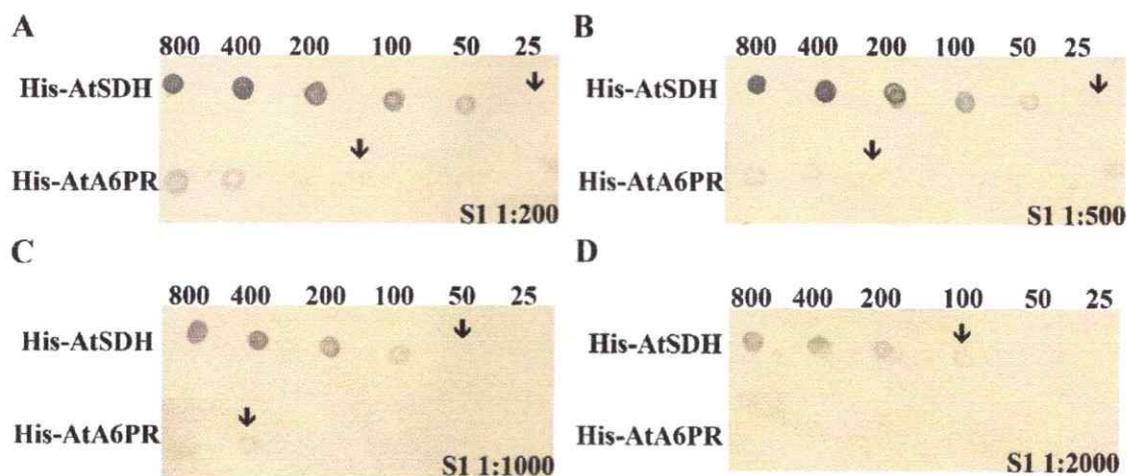
AtSDH es de ~43 kDa, sección 4.2.10.4). Este paso permite por una parte, mantener inalteradas las concentraciones de los constituyentes del tampón (si se concentrara por vacío, por ejemplo, aumentarían las concentraciones de todos los componentes ya que solo se elimina el agua de la muestra), y por otro lado permite eliminar impurezas en la muestra, dado que en algunas de las repeticiones en la obtención de proteína His-AtSDH, ésta eluía de la cromatografía con proteínas adicionales de distintos tamaños (datos no mostrados). Se probaron distintas combinaciones en el uso de ambos centricones (datos no mostrados), y finalmente se determinó que concentrando primero con el de 50 kDa y luego concentrando con el de 30 kDa se obtenía la mayor concentración de proteína (datos no mostrados) y eliminación de impurezas (Figura 18).



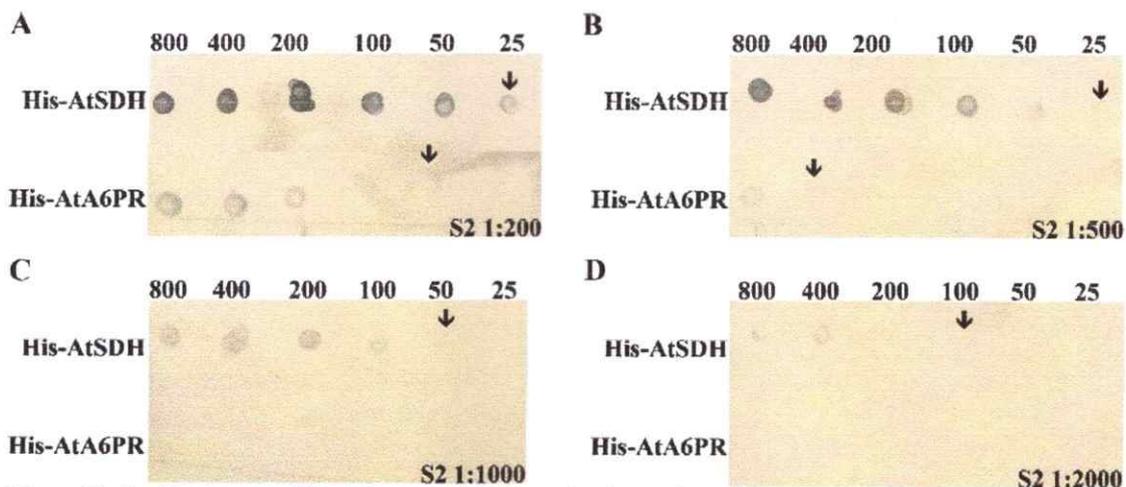
**Figura 18. Concentración de His-AtSDH por medio de centricones.** Se pasó la muestra por el centricon de 50 kDa de tamaño de corte, y el concentrado obtenido se pasó por el centricon de 30 kDa de tamaño de corte (carril 1). Se indican los tamaños de un marcador de peso molecular sin teñir.

Una vez que se obtuvo una cantidad suficiente de antígeno como para inyectar a los 3 ratones con 50  $\mu$ g de proteína a una concentración de 0,2 mg/mL durante 3 semanas, se entregaron las alícuotas a Leonardo Vargas, del Laboratorio de Inmunología de la Universidad de Chile, quien realizó las inmunizaciones respectivas durante el tiempo anteriormente mencionado (sección 4.2.10.5). Transcurridas las 3 semanas de inyecciones, se extrajo una pequeña cantidad (no letal) de sangre de cada ratón, y

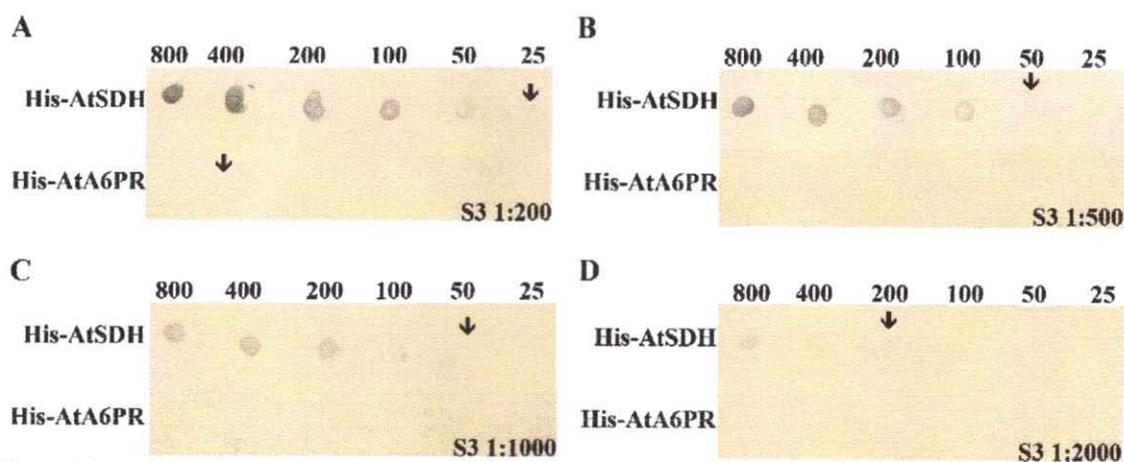
posteriormente el suero de ésta (~60  $\mu$ L; S1 (suero 1), S2 (suero 2), S3 (suero 3)), con el objeto de hacer un análisis que permitiera determinar que las inmunizaciones realizadas hasta ese momento causaron el efecto deseado en los ratones utilizados, vale decir, gatillar una respuesta inmune con la cual se generen anticuerpos capaces de reconocer a His-AtSDH. Se decidió hacer un *dot blot* (sección 4.2.10.6) en membranas de nitrocelulosa, de manera de determinar el límite de detección del antígeno, a distintas diluciones de cada suero. Además se utilizó como control His-AtA6PR (Wurman, 2013), que no posee identidad aminoacídica con His-AtSDH, si se excluye el motivo 6x-His (Figura 19, 20, 21).



**Figura 19. Dot blot de suero S1 tras 3 semanas de inmunizaciones.** Se realizó un *dot blot*  $\alpha$ -AtSDH con el suero S1, utilizando la proteína antígeno (His-AtSDH), y otra proteína que sólo contiene el motivo 6xHis en común (His-AtA6PR). 800; 400; 200; 100; 50; 25, cantidades en nanogramos de cada proteína purificada cargada sobre la membrana de nitrocelulosa. Se indica la dilución del suero en el extremo inferior izquierdo de cada panel. Con flechas negras se indica la menor cantidad de proteína detectada para cada caso.



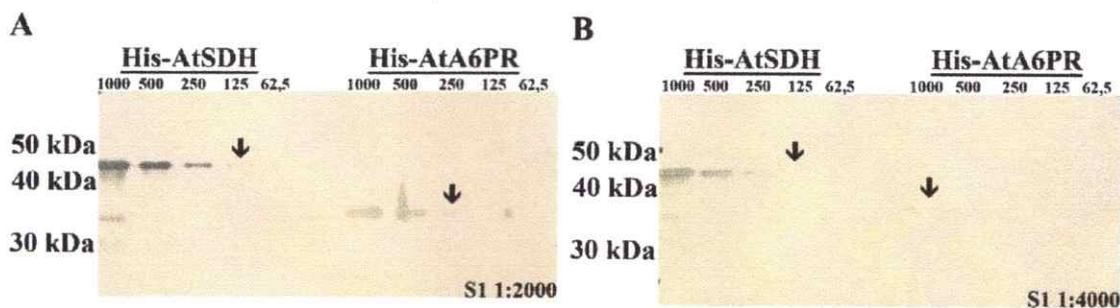
**Figura 20.** *Dot blot* de suero S2 tras 3 semanas de inmunizaciones. Se realizó un *dot blot*  $\alpha$ -AtSDH con el suero S2, utilizando la proteína antigeno (His-AtSDH), y otra proteína que sólo contiene el motivo 6xHis en común (His-AtA6PR). 800; 400; 200; 100; 50; 25, cantidades en nanogramos de cada proteína purificada cargada sobre la membrana de nitrocelulosa. Se indica la dilución del suero en el extremo inferior izquierdo de cada panel. Con flechas negras se indica la menor cantidad de proteína detectada para cada caso.



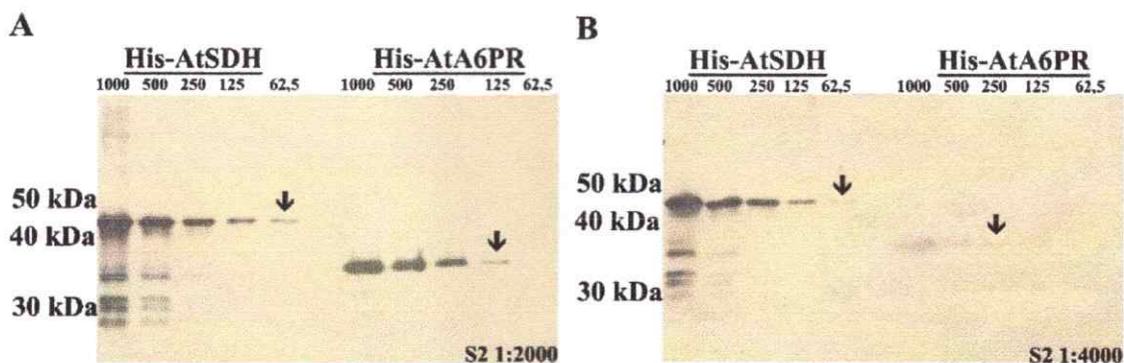
**Figura 21.** *Dot blot* de suero S3 tras 3 semanas de inmunizaciones. Se realizó un *dot blot*  $\alpha$ -AtSDH con el suero S3, utilizando la proteína antigeno (His-AtSDH), y otra proteína que sólo contiene el motivo 6xHis en común (His-AtA6PR). 800; 400; 200; 100; 50; 25, cantidades en nanogramos de cada proteína purificada cargada sobre la membrana de nitrocelulosa. Se indica la dilución del suero en el extremo inferior izquierdo de cada panel. Con flechas negras se indica la menor cantidad de proteína detectada para cada caso.

Al observar el resultado del *dot blot* realizado con todos los sueros (Figuras 19, 20, 21), se puede ver que se comportan de acuerdo a lo esperado, vale decir, a medida que aumenta la dilución del suero, disminuye la intensidad y el límite de detección, tanto del antígeno como de la proteína control. Para S1, a una dilución 1:2000, ya no es posible detectar a His-AtA6PR (Figura 19D), y es posible detectar a His-AtSDH hasta una

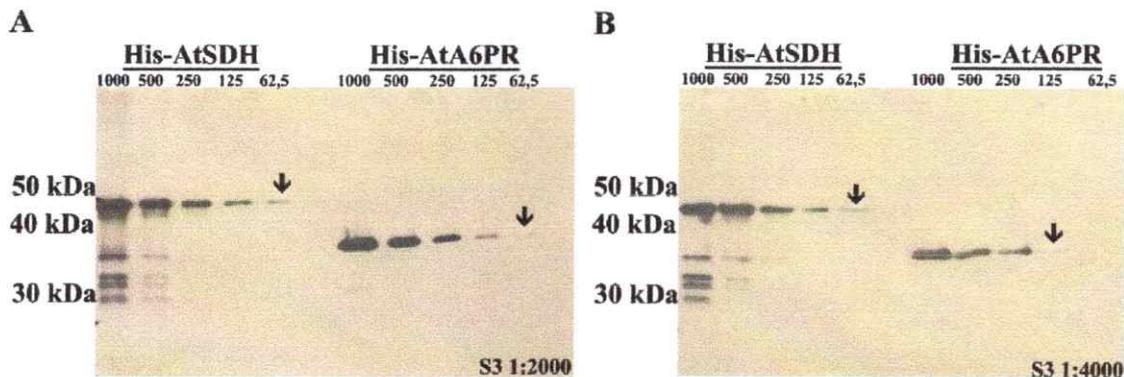
cantidad de 100 ng (Figura 19D). Al realizar el mismo ejercicio con los otros sueros (S2 y S3, Figuras 20 y 21, respectivamente), se puede ver que ambos detectan en un menor nivel a His-AtA6PR; con el suero S2 se pierde el reconocimiento en la dilución 1:1000 (Figura 20C), y con S3 en la dilución 1:500 (Figura 21B). Por otro lado, se detectan 100 ng de His-AtSDH en la dilución 1:2000 con S2 (Figura 20D), y 200 ng con S3 a la misma dilución (Figura 21D). Con estos resultados se comprobó la eficacia de las 3 inmunizaciones que habían sido llevadas a cabo (sección 4.2.10.5). Se realizó una última inmunización, y se extrajeron los sueros totales (~200  $\mu$ L) de los 3 ratones, con los cuales se realizaron ensayos de western-blot, para así determinar la cantidad de impurezas que estos sueros reconocen en la muestra, además de corroborar la cantidad de antígeno y de proteína control que éstos detectan a distintas diluciones (sección 4.2.10.6, Figuras 22, 23, 24).



**Figura 22. Western-blot  $\alpha$ -His-AtSDH utilizando suero final S1.** Se realizó un western-blot  $\alpha$ -His-AtSDH con el suero final S1, utilizando la proteína antígeno (His-AtSDH), y la proteína control His-AtA6PR. 1000; 500; 250; 125; 62,5; cantidades en nanogramos de cada proteína purificada cargada sobre la membrana de nitrocelulosa. Se indica la dilución del suero en el extremo inferior izquierdo de cada panel. Con flechas negras se indica la menor cantidad de proteína detectada para cada caso. Se indican los pesos moleculares de un marcador de peso molecular sin teñir.



**Figura 23. Western-blot  $\alpha$ -His-AtSDH utilizando suero final S2.** Se realizó un western-blot  $\alpha$ -His-AtSDH con el suero final S2, utilizando la proteína antígeno (His-AtSDH), y la proteína control His-AtA6PR. 1000; 500; 250; 125; 62,5; cantidades en nanogramos de cada proteína purificada cargada sobre la membrana de nitrocelulosa. Se indica la dilución del suero en el extremo inferior izquierdo de cada panel. Con flechas negras se indica la menor cantidad de proteína detectada para cada caso. Se indican los pesos moleculares de un marcador de peso molecular sin teñir.



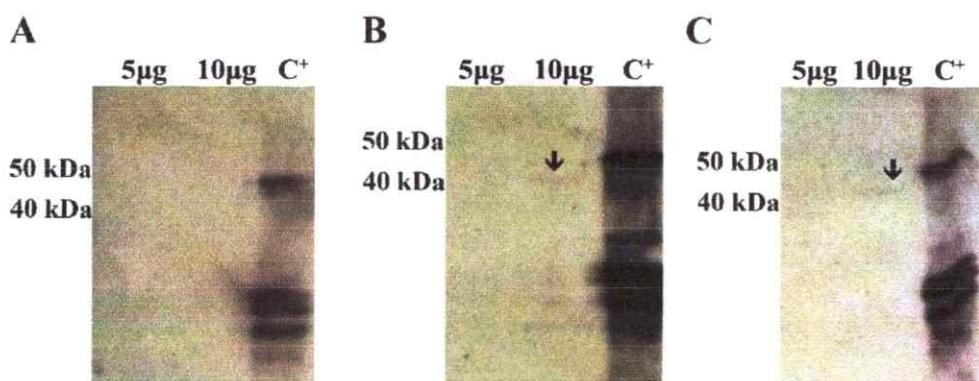
**Figura 24. Western-blot  $\alpha$ -His-AtSDH utilizando suero final S3.** Se realizó un western-blot  $\alpha$ -His-AtSDH con el suero final S3, utilizando la proteína antígeno (His-AtSDH), y la proteína control His-AtA6PR. 1000; 500; 250; 125; 62,5; cantidades en nanogramos de cada proteína purificada cargada sobre la membrana de nitrocelulosa. Se indica la dilución del suero en el extremo inferior izquierdo de cada panel. Con flechas negras se indica la menor cantidad de proteína detectada para cada caso. Se indican los pesos moleculares de un marcador de peso molecular sin teñir.

Como puede verse en las Figuras, el suero S1 en ambas diluciones es capaz de reconocer 125 ng de His-AtSDH (Figura 22), en tanto que el reconocimiento mínimo de His-AtA6PR se aumenta desde 250 ng en la dilución 1:2000 (Figura 22A) a 1000 ng en la dilución 1:4000 (Figura 22B). Por otro lado, reconoce pocas impurezas en la muestra de His-AtSDH, reconociéndolas sólo cuando se cargan 1000 ng de proteína (Figura 22B).

El suero S2 es capaz de reconocer hasta 62,5 ng de His-AtSDH en ambas diluciones ensayadas (Figura 23), mientras que para His-AtA6PR el reconocimiento mínimo es de 125 ng en 1:2000 (Figura 23A) y de 250 ng en 1:4000 (Figura 23B). Sin embargo, a pesar de tener una mayor intensidad de reacción con His-AtSDH al comparar con S1, aumenta la detección de impurezas presentes en esta muestra, siendo claramente visibles varias impurezas hasta los 500 ng de proteína, para ambas diluciones (Figura 23).

Por último, el suero S3 reconoce hasta 62,5 ng de His-AtSDH en ambas diluciones (Figura 24), y en el caso de His-AtA6PR, reconoce 62,5 ng en dilución 1:2000 (Figura 24A) y 125 ng en 1:4000 (Figura 24B). Se puede apreciar también que el reconocimiento de impurezas es similar al de S2, siendo clara la presencia de éstas en ambas diluciones en los carriles de 1000 y 500 ng de His-AtSDH (Figuras 23B y 24B).

Finalmente, se probó la eficacia de los sueros obtenidos con muestras provenientes de plantas de *Arabidopsis*, de manera de evaluar el reconocimiento de AtSDH endógena (Figura 25).

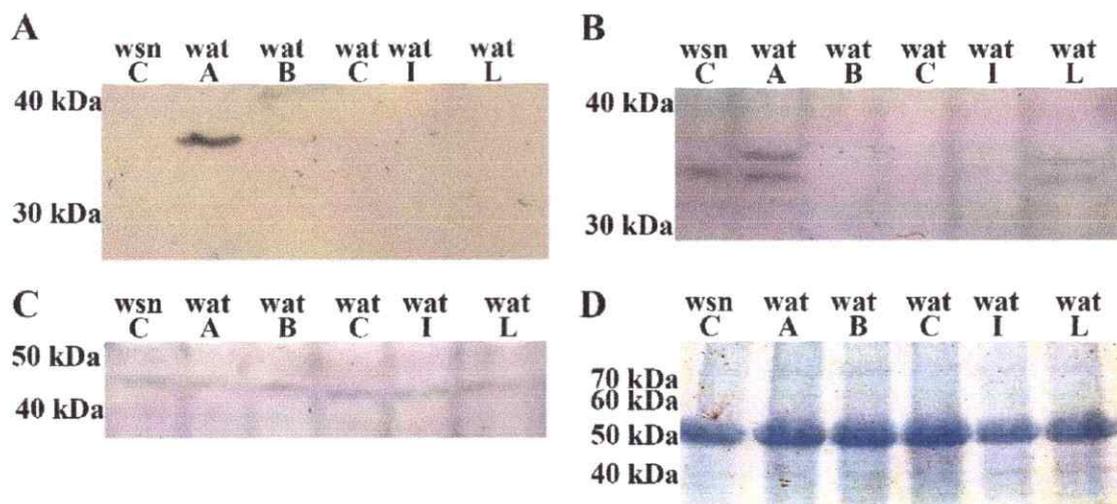


**Figura 25.** Western-blot  $\alpha$ -His-AtSDH a partir de extractos proteicos de *Arabidopsis thaliana*. Se realizó un western-blot  $\alpha$ -His-AtSDH utilizando los 3 sueros obtenidos (A, S1; B, S2; C, S3), en dilución 1:2000, con el objetivo de determinar la eficiencia de éstos en la detección de AtSDH endógena. Se cargaron 5 y 10  $\mu$ g de proteína de planta (poner tejido y edad), y se utilizó como control positivo His-AtSDH purificada. Se indican los tamaños moleculares relevantes para las imágenes, respecto de un marcador de peso molecular sin tefir.



Como se observa en la Figura, al incubar muestras proteicas provenientes de planta, el suero S1 (Figura 25A) no es capaz de reconocer el antígeno a una dilución 1:2000, mientras que S2 y S3 son capaces de reconocer a AtSDH cuando la cantidad de proteína cargada es 10 µg, aunque de manera leve, por lo que será recomendable utilizar una cantidad mayor de proteína en los ensayos posteriores. Cabe mencionar que se realizó el mismo ensayo con diluciones de los antisueros primarios a 1:500 y 1:1000, sin embargo una fuerte unión inespecífica de ellos a la membrana de nitrocelulosa hizo muy difícil la interpretación de los resultados obtenidos (datos no mostrados). Los resultados de las Figura 25 son similares a lo visto con la proteína recombinante, donde los sueros S2 y S3 son capaces de reconocer menores cantidades de antígeno que S1 (Figuras 22, 23 y 24). También se puede ver que ninguno de los 3 sueros empleados reconoce a AtA6PR endógena, lo que indica que probablemente el reconocimiento en los ensayos con proteínas recombinantes se haya debido principalmente al epítipo de histidina que poseen His-AtSDH y His-AtA6PR (Figuras 22, 23, 24 y 25). En base a este último resultado, se decidió ocupar el suero S3 para realizar los western-blot  $\alpha$ -AtSDH en las plantas transformantes (sección 4.3.9).

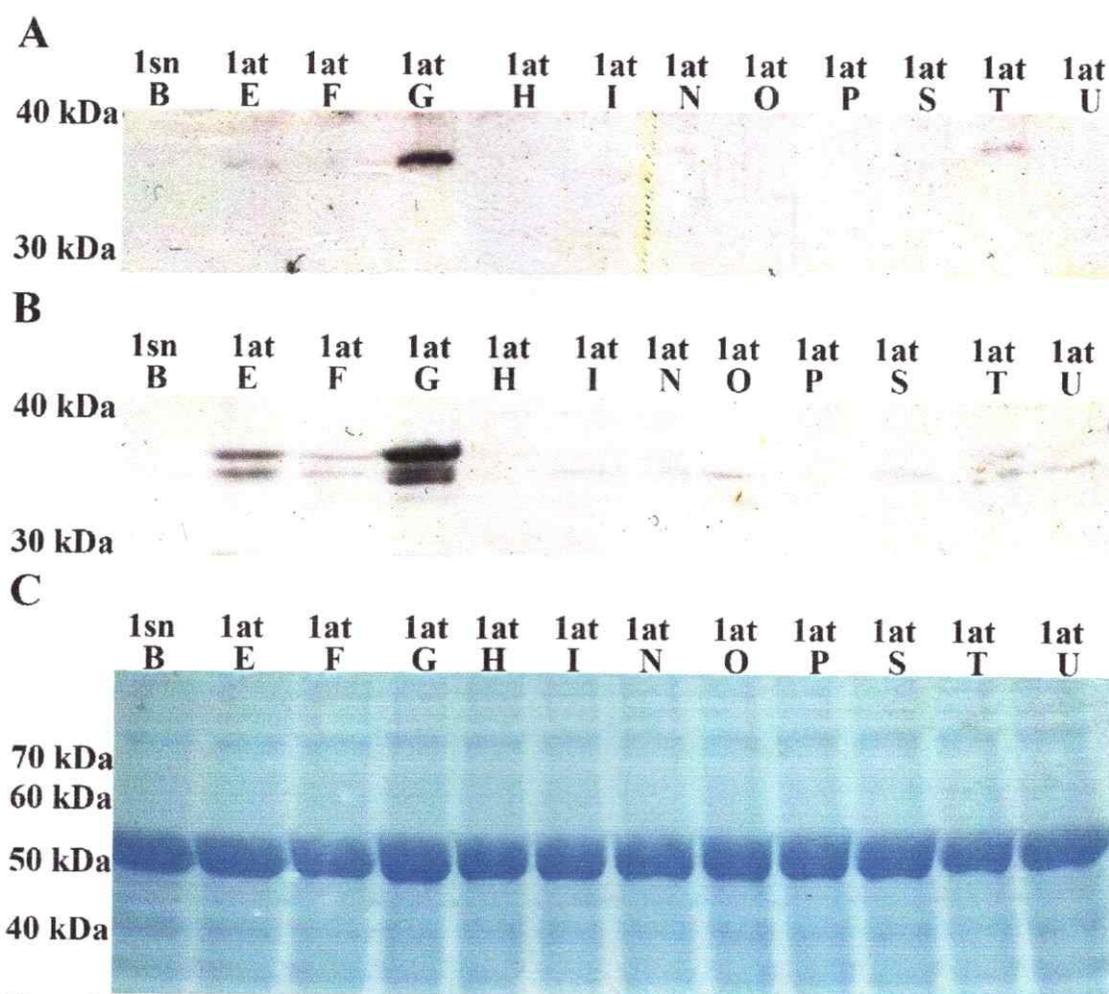
Para ello, se colectaron muestras de tejido foliar a las 5 semanas de desarrollo (sección 4.3.8) de las distintas líneas obtenidas, se realizó extracción de proteínas y se realizaron ensayos de western-blot  $\alpha$ -His-AtSDH,  $\alpha$ -His-AtA6PR y  $\alpha$ -FLAG, además de realizar tinción de Coomassie (sección 4.7.1) a modo de control de carga, cargando 30 µg de proteína para cada línea evaluada (sección 4.3.9, Figuras 26 y 27).



**Figura 26.** SDS-PAGE y western-blots de las plantas transformantes genotipo silvestre. Se realizó un western-blot  $\alpha$ -FLAG (A),  $\alpha$ -His-AtA6PR (B),  $\alpha$ -His-AtSDH (C), y SDS-PAGE con tinción de Coomassie (D) a partir de extractos proteicos (30  $\mu$ g) provenientes de tejido de hoja roseta de las líneas transformantes obtenidas (5 semanas de edad). Se indican los tamaños moleculares relevantes para cada ensayo, en base a un marcador de peso molecular no teñido.

Como puede verse en la Figura 26, el anticuerpo  $\alpha$ -FLAG solo mostró reconocimiento del epítipo en la línea wat A, lo que estaría indicando que a pesar de la presencia del inserto en todas las líneas wat (Figura 12A), solo hay niveles de FLAG-AtA6PR detectables en la línea mencionada. Al realizar el western-blot con el antisuero  $\alpha$ -His-AtA6PR, se aprecia la detección tanto de la proteína AtA6PR endógena, como la proteína producto de la expresión del inserto proveniente del vector pEarleyGate 202-AtA6PR, dado que la presencia del epítipo aumenta el peso del péptido de  $\sim$ 35 kDa (AtA6PR endógena) a  $\sim$ 36,7 kDa (FLAG-A6APR), siendo visibles ambas proteínas en wat A y wat L. Como era de esperarse, en la línea control wsn C, se detecta solo la proteína endógena, ya que esta planta posee el vector pEarleyGate 202 sin inserto. No hubo detección de AtA6PR endógena ni FLAG-AtA6PR en las líneas wat B, C e I (Figura 26B). Al analizar el western-blot realizado con el antisuero  $\alpha$ -His-AtSDH, se puede ver la presencia de la proteína en todas las líneas evaluadas, sin detectarse

diferencias en los niveles de intensidades de las detecciones de AtSDH. Por último al observar el gel teñido con tinción de Coomassie, se puede apreciar que la misma cantidad de proteína fue cargada en los distintos carriles, evidenciado por la presencia de una proteína de tamaño ligeramente superior a los 50 kDa, que corresponde muy probablemente a la proteína Rubisco (Ma y cols., 2009).



**Figura 27. SDS-PAGE y western-blots de las plantas transformantes genotipo mutante *sdh1-1*.** Se realizó un western-blot  $\alpha$ -FLAG (A),  $\alpha$ -His-AtA6PR (B) y SDS-PAGE con tinción de Coomassie (C) a partir de extractos proteicos (30  $\mu$ g) provenientes de tejido de hoja roseta de las líneas transformantes obtenidas (5 semana de edad). Se indican los tamaños moleculares relevantes para cada ensayo, en base a un marcador de peso molecular no teñido.

Para las líneas transformantes obtenidas a partir de las mutantes *sdh1-1*, no se muestra el western-blot  $\alpha$ -AtSDH, ya que como era esperado, no hubo detección de la proteína en ninguna de las líneas obtenidas, lo cual es consistente con el hecho de que estas mutantes poseen una inserción de un T-ADN en el locus del gen *AtSDH*, lo cual hace que esta mutante sea *knockout* en este gen (Aguayo y cols., 2013). Al analizar los western-blots  $\alpha$ -FLAG y  $\alpha$ -His-AtA6PR, se puede ver en el primer caso detección de la proteína fusionada al epítipo en la línea 1at E, Gy S (Figura 27A), mientras que al utilizar el antisuero  $\alpha$ -His-AtA6PR, es posible detectar la proteína marcada con FLAG en más líneas (1at E, F, G, H, N, S, T, U) además de la detección de distintos niveles de la proteína endógena en todas las líneas evaluadas, a excepción de 1at P, donde no se detectó proteína (Figura 27B). Al analizar el SDS-PAGE con tinción de Coomassie (Figura 27C) se puede ver que la misma cantidad de proteína (30  $\mu$ g) fue cargada en cada uno de los carriles del gel.

De esta manera, se logró obtener plantas de *Arabidopsis thaliana* que poseen mayor acumulación de la enzima A6PR, así cumpliendo el Objetivo 1.

## **5.2 Estudiar el efecto de la sobre-acumulación de A6PR en plantas de *Arabidopsis thaliana* en el desarrollo.**

Como se señaló en la sección anterior, se sembraron las semillas homocigotas correspondiente a la T<sub>3</sub> de cada línea seleccionada, una semana en medio MS sin agente de selección y luego se traspasaron a medio hidropónico para que continuaran su desarrollo (sección 4.3.2). A las 4 semanas de desarrollo totales, se midieron distintos parámetros morfológicos (longitud de tallo principal, número de hojas rosetas, caulinarias, tallos secundarios y órganos florales (flores más silicuas)) de manera de evidenciar posibles diferencias en el crecimiento y desarrollo de las plantas (sección 4.3.8). Esto se realizó tanto para las plantas genotipo silvestre (wsn y wat) como para las plantas genotipo mutante *sdh1-1* (1sn y 1at). Por la dificultad de contar el número de botones (por su tamaño), este valor no se incluyó en el análisis, sin embargo, es necesario mencionar que todas las plantas evaluadas poseían botones al momento de la comparación. Además se registró el peso fresco y seco de las plantas a las 5 semanas totales de desarrollo para calcular el porcentaje de agua por planta, medición que se realizó a la semana 5 en vez de la 4 principalmente por la necesidad de tener una mayor cantidad de tejido por planta, que permitiese colectar tejido suficiente para realizar la extracción de sacáridos, polioles y proteínas (sección 4.3.8).

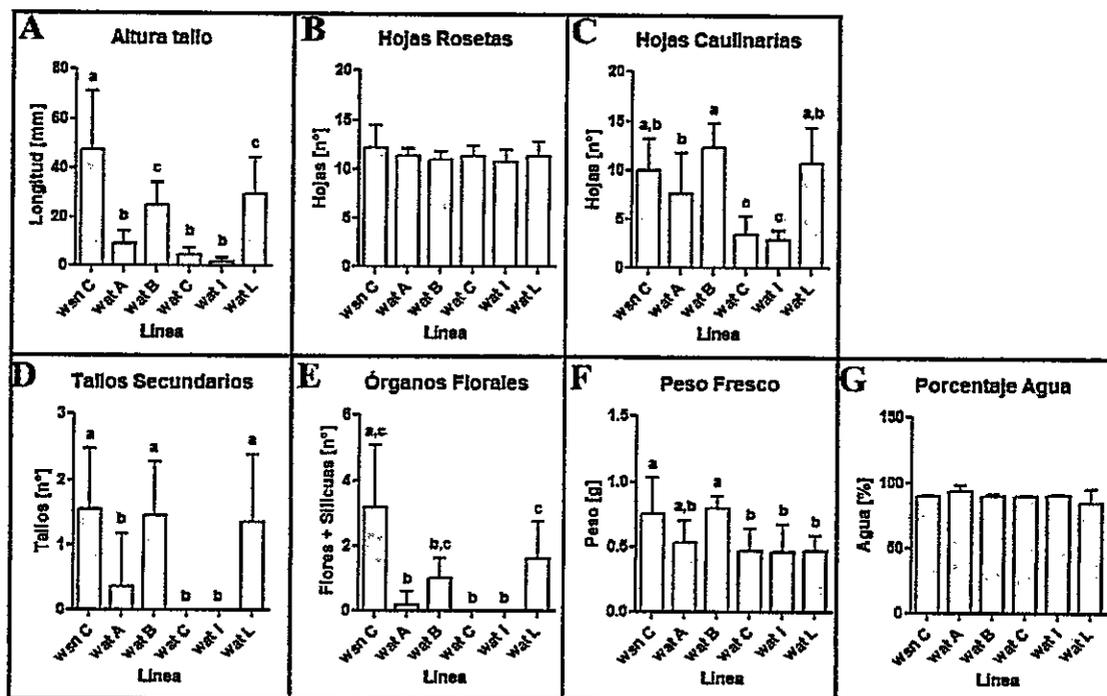


Figura 28. Parámetros morfológicos de plantas de transformantes de *Arabidopsis* genotipo silvestre. Se midieron distintas características morfológicas relacionadas al crecimiento en plantas silvestres transformadas con la región codificante del gen *AtA6PR* (líneas wat) y se compararon con una línea transformada con el vector sin inserto (wsn C) usada como control, y con el resto de las líneas. En el eje de las abscisas se indica cada línea ocupada mientras en el eje de las ordenadas se indica el parámetro medido. Longitud de tallo principal (A); número de hojas rosetas (B), hojas caulnarias (C), tallos secundarios (D), flores y silicuas (E); peso fresco (F) y porcentaje de agua por planta (G). Se utilizó el test estadístico de ANOVA de una vía con post test de Tukey para contrastar los distintos datos medidos, con un  $p < 0.05$ . A – E,  $n = 11$ ; F,  $n = 9$ ; G,  $n = 3$ . Con letras minúsculas se indica la similitud o diferencia entre los valores analizados, a partir de los resultados del post test de Tukey.

Al analizar los datos (Figura 28), se puede ver que todas las líneas transformadas con el vector pEarleyGate 202-AtA6PR presentan un crecimiento menor que la línea transformada con el vector sin inserto, evidenciado principalmente por la menor longitud del tallo principal que presentan todas las líneas wat en comparación a la línea wsn (Figura 28A). Se puede apreciar que a grandes rasgos hay dos grupos de líneas: unas con un crecimiento levemente menor que la línea control (aunque estadísticamente significativo), wat B y wat L, y otro grupo con un crecimiento pronunciadamente menor que la control, wat A, wat C y wat I (Figura 28); de este último grupo wat A en algunos parámetros se asemeja al primer grupo mencionado (Figura 28C, E, F). En este grupo se

puede apreciar además que tanto wat C como wat I no presentan tallos secundarios, ni presencia de flores o silicuas (Figura 28D, E). Los únicos parámetros fenotípicos que no se vieron afectados en ninguna de las líneas evaluadas fueron el número de hojas roseta y el porcentaje de agua en las plantas, lo que sugiere que las líneas transformantes tienen un cierto retraso en cuanto al comienzo de la fase reproductiva, no así en la fase vegetativa, y que no presentan variación en su capacidad de acumular agua, al menos en condiciones normales de crecimiento (Figura 28B, G). Cabe mencionar que las líneas evaluadas a pesar de tener un menor crecimiento, no vieron afectada su capacidad para producir semillas, ni tampoco hubo una alteración en la tasa de germinación de éstas (datos no mostrados).

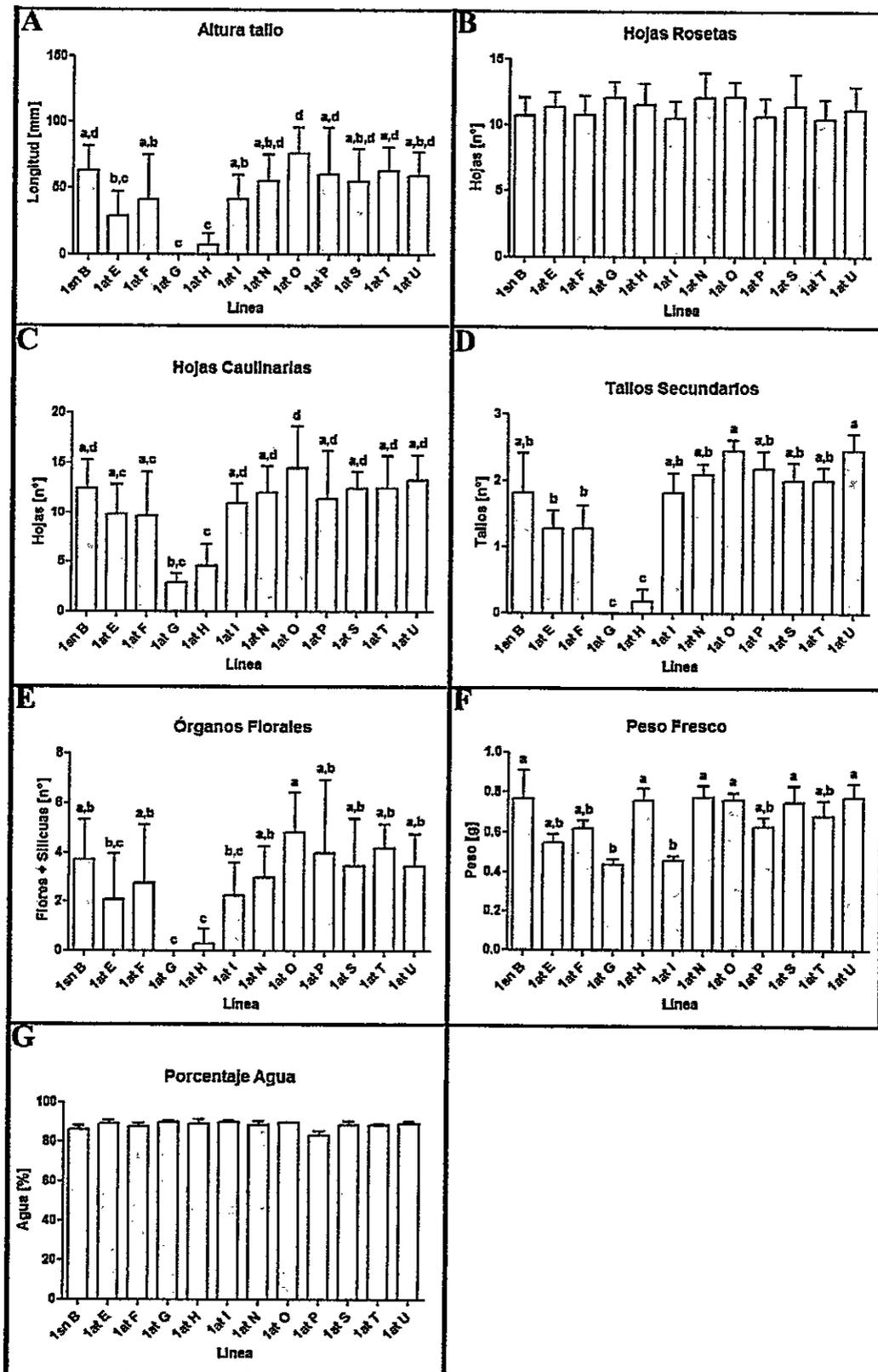


Figura 29. Parámetros morfológicos de plantas de transformantes de *Arabidopsis* genotipo mutante *sdh1-1*. Se midieron distintas características morfológicas relacionadas al crecimiento en plantas del genotipo mutante (*sdh1-1*) transformadas con la región codificante del gen *AtA6PR* (líneas 1at) y se compararon con una línea transformada con el vector sin inserto (1sn B) usada como control, y con el resto de las líneas. En el eje de las abscisas se indica cada línea ocupada mientras en el eje de las ordenadas se indica el parámetro medido. Longitud de tallo principal (A); número de hojas rosetas (B), hojas caulinares (C), tallos secundarios (D), flores y silicuas (E); peso fresco (F) y porcentaje de agua por planta (G). Se utilizó el test estadístico de ANOVA de una vía con post test de Tukey para contrastar los distintos datos medidos con un  $p < 0.05$ . A - E,  $n = 11$ ; F,  $n = 9$ ; G,  $n = 3$ . Con letras minúsculas se indica la similitud o diferencia entre los valores analizados, a partir de los resultados del post test de Tukey.

En este conjunto de líneas es posible distinguir 3 grupos de plantas (Figura 29): uno que no muestra diferencias con la línea control en la gran mayoría de los caracteres evaluados (Figura 29; 1at N, O, P, S, T, U), uno que tiene un crecimiento moderadamente menor que el control (Figura 29A, C, E, F; 1at F, E, I), y un último grupo con un crecimiento pronunciadamente menor que la línea control (Figura 29A, C, D, I, F; 1at G, H). De todas las líneas evaluadas, para ambos genotipos, es destacable 1at G, en cuyas plantas a las 4 semanas de desarrollo no hubo crecimiento del tallo principal (Figura 29A), condición que en algunos casos se mantuvo a las 5 semanas, pero que posteriormente sí elongó - de lo contrario no se hubieran podido colectar semillas de esta línea (datos no mostrados). También es destacable que si bien 1at H es la segunda línea con menor longitud de tallo principal, a la semana 5 cuando se registró el peso fresco, el valor para esta línea no fue diferente al del control. No es así el caso para 1at G, que tiene un peso fresco de aproximadamente la mitad del valor del control, y del grupo de líneas que creció sin diferencias significativas con 1sn B (Figura 29F). Nuevamente se puede ver además, que no hay diferencias significativas respecto al número de hojas rosetas y porcentaje de agua por planta entre las líneas analizadas (Figura 29B, G), lo que sugiere un retraso de la fase reproductiva, como se señaló anteriormente.

De esta manera, se puede ver que la sobre-acumulación de *AtA6PR* en las líneas wat A, wat L (Figura 26A, B), 1at E, 1at F y 1at G (Figura 27B) se condice con un menor

crecimiento en estas plantas (Figuras 28 y 29, respectivamente), así cumpliendo el Objetivo 2.

### **5.3 Estudiar el efecto de la sobre-acumulación de A6PR en plantas de *Arabidopsis thaliana* en la concentración de sacarosa, glucosa, fructosa y sorbitol.**

Con los tejidos extraídos de plantas homocigotas de 5 semanas pertenecientes a cada línea obtenida se realizó una extracción de azúcares para determinar la cantidad de sorbitol, sacarosa, glucosa y fructosa en ellas (secciones 4.3.10 y 4.3.11)

Para la cuantificación de sorbitol se ocupó un kit comercial de la empresa Megazyme International Ireland, el cual dispone de una enzima SDH que en presencia de sorbitol o xilitol es capaz de reducir  $\text{NAD}^+$  a NADH. Luego el NADH obtenido actúa como co-sustrato de la enzima diaforasa en la reducción de cloruro de iodonitrotetrazolio (INT), obteniéndose  $\text{NAD}^+$  y INT-formazán. Es este último compuesto el que se utiliza para la cuantificación del poliol, midiendo su absorbancia a 492 nm, dado que ambas reacciones son estequiométricamente equivalentes (sección 4.3.11).

Se realizó una curva de calibración para cada evento de cuantificación de polioles (para determinar además el rango de linealidad experimental de la enzima del kit comercial), y luego interpolar el valor de  $A_{492}$  obtenido para la muestra con respecto a la recta de dicha curva. Así, se obtuvo una curva de calibración que mantuvo la linealidad de la detección entre 0,00325 mg/mL y 0,05 mg/mL, no siendo posible disminuir más aún el límite inferior de la detección, considerando el volumen máximo de 60  $\mu\text{L}$  de muestra en 287  $\mu\text{L}$  totales de reacción. Sin embargo, no fue posible detectar el sorbitol o xilitol presente en al menos 30 muestras distintas provenientes de las líneas transformantes, ya fuera cuantificando plantas de manera individual (200 mg de material inicial) como mezclando hasta 3 plantas en una única muestra (600 mg de tejido inicial en el mismo

volumen final que para 1 sola planta, sección 4.3.10). Se discutirá sobre las posibles razones de este fenómeno más adelante (sección 6.5). Sin embargo, los ensayos de western (sección 5.1.1) y los análisis fenotípicos (sección 5.2) realizados en las líneas transformadas indican indirectamente que el metabolismo de sorbitol ha sido perturbado en wat y lat con respecto a sus controles respectivos (wsn y lsn).

Aunque no se logró cuantificar la concentración de sorbitol en las líneas estudiadas, sí fue posible encontrar grandes diferencias en el crecimiento de algunas líneas, para ambos genotipos transformados (Figuras 28 y 29), lo que es un indicio de que hay sorbitol siendo sintetizado por FLAG-AtA6PR, que dé cuenta de los cambios fenotípicos. En base a lo descrito en la literatura para las plantas que han sido transformadas con A6PR de manzano (tabaco, caqui; Gao y cols., 2001; Sheveleva y cols., 1998), hay un cambio en los sacáridos (glucosa, fructosa y sacarosa) en algunos casos (además de alteraciones en el crecimiento y síntesis de sorbitol), razón por la cual se hace interesante evaluar el contenido de estos azúcares en las líneas obtenidas.

Los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa fueron cuantificados mediante un kit comercial de la empresa Megazyme International Ireland (4.3.11).

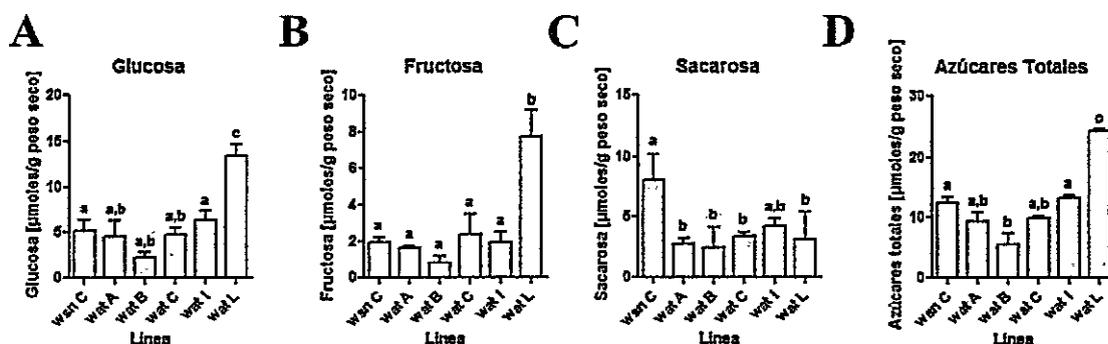


Figura 30. Composición de azúcares solubles en plantas transformantes de *Arabidopsis thaliana*, genotipo silvestre. Se midieron las cantidades de glucosa (A), fructosa (B) y sacarosa (C) en plantas silvestres transformadas con la región codificante del gen *AtA6PR* (líneas wat) y se compararon con una línea transformada con el vector sin inserto (wsn C) usada como control, y con el resto de las líneas. En base a esas mediciones se calculó la cantidad total de azúcares (D) presente en las distintas líneas. Se utilizó el test estadístico de ANOVA de una vía con post test de Tukey para contrastar los distintos datos medidos con un  $p < 0.05$ .  $n = 2 - 5$ . Con letras minúsculas se indica la similitud o diferencia entre los valores analizados, a partir de los resultados del post test de Tukey.

Como puede verse en la Figura 30, la presencia del transgen en las líneas provocó distintos efectos en los azúcares. En el caso de la glucosa y fructosa, se registró un aumento de su concentración en la línea wat L, mientras que en el resto de las líneas no hubo variación con respecto a la línea control wsn C (Figura 30A, B). Se detectó en el caso de la sacarosa, una disminución de aproximadamente un 50% en todas las líneas, siendo en wat I no significativamente distinta a la cantidad de este azúcar en wsn C (Figura 30C). Sin embargo, la baja en la concentración de sacarosa en las líneas analizadas no fue suficiente como para que la cantidad de azúcares totales por planta difiriera significativamente en las líneas wat A, C e I, mientras que en wat B sí es menor la cantidad de azúcares solubles y en wat L se registró un aumento de los azúcares totales medidos (Figura 30D).

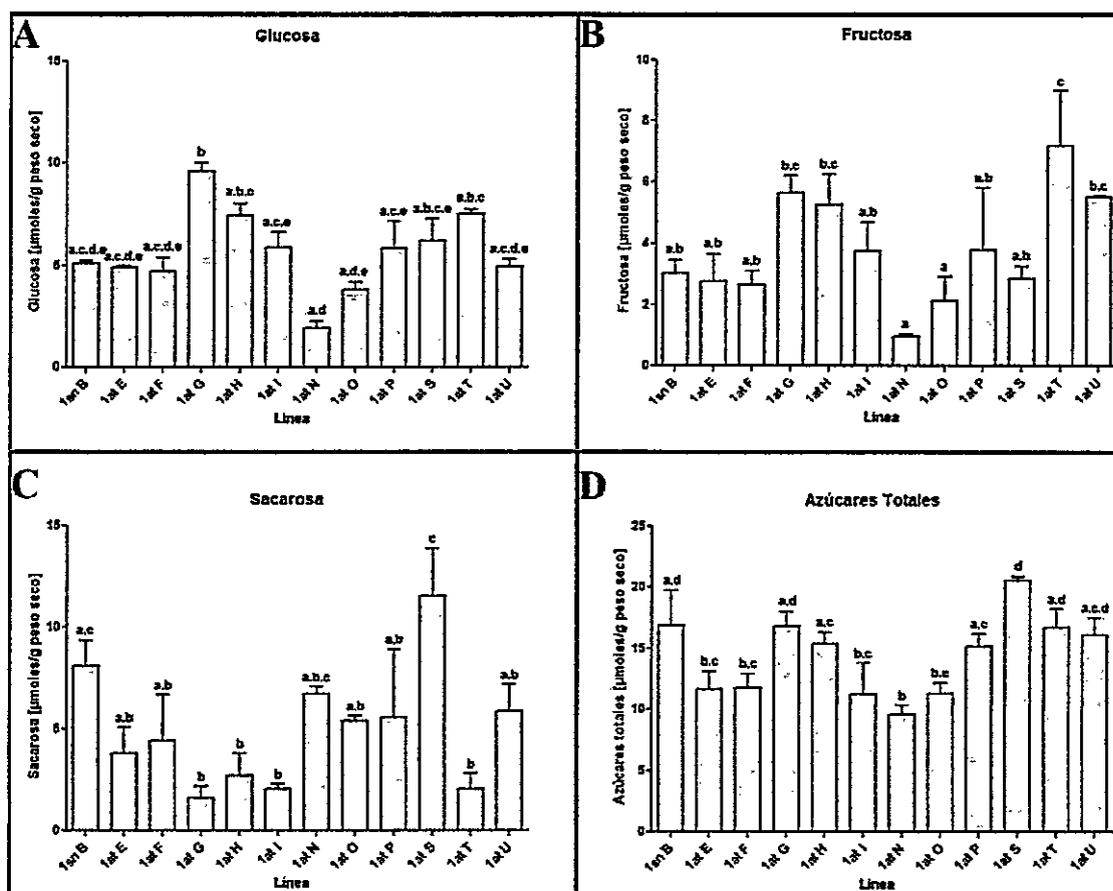


Figura 31. Composición de azúcares solubles en plantas transformantes de *Arabidopsis thaliana*, genotipo mutante *sdh1-1*. Se midieron las cantidades de glucosa (A), fructosa (B) y sacarosa (C) en plantas mutantes *sdh1-1* transformadas con la región codificante del gen *At46PR* (líneas 1at) y se compararon con una línea transformada con el vector sin inserto (1sn B) usada como control, y con el resto de las líneas. En base a esas mediciones se calculó la cantidad total de azúcares (D) presente en las distintas líneas. Se utilizó el test estadístico de ANOVA de una vía con post test de Tukey para contrastar los distintos datos medidos con un  $p < 0.05$ .  $n = 2 - 4$ . Con letras minúsculas se indica la similitud o diferencia entre los valores analizados, a partir de los resultados del post test de Tukey.

En el caso de las transformantes 1at, se ve que hay un aumento significativo de glucosa para el caso de 1at G, seguido de 1at H y 1at T, sin embargo en estas últimas dos líneas los niveles este azúcar no se diferencian estadísticamente de la línea control 1sn B (Figura 31A). Se observa también que hay una disminución en los niveles de glucosa de 1at N, aunque sin diferencias significativas con 1sn B (Figura 31A). Para la concentración de fructosa se observa una tendencia parecida a la de glucosa, con

aumentos en 1at G, H y T, siendo la última línea diferente estadísticamente de la control, y nuevamente se aprecia una aparente disminución en los niveles de fructosa de la línea 1at N (Figura 31B). Para sacarosa se observa una disminución significativa en las líneas 1at G, H, I y T. Además se aprecia una tendencia en general a la disminución del disacárido en el resto de las líneas, a excepción de 1at S, donde los niveles aumentaron levemente respecto a 1sn B (Figura 31C). Finalmente al analizar la sumatoria de las cantidades de azúcar en las líneas analizadas, se ve que en 1at G, H, P, S, T y U no hay diferencias respecto al control, en tanto que en el caso de 1at E, F, I, N y O hay una disminución en la concentración total de los azúcares evaluados (Figura 31D).

Con estos resultados se puede ver que la acumulación de AtA6PR en las distintas líneas analizadas, produce cambios en las cantidades de azúcares, reflejado principalmente por una disminución en los niveles de sacarosa (Figuras 30C y 31C), dando cumplimiento al Objetivo 3.

## 6 Discusión

En esta tesis se generó plantas de *Arabidopsis* sobre-acumuladoras de la enzima aldosa-6-fosfato reductasa (A6PR), con el fin de evaluar su efecto en la concentración de azúcares, crecimiento y desarrollo vegetal en una especie no-Rosaceae. La estrategia utilizada fue mediante la modificación de la acumulación de enzimas involucradas en la síntesis (A6PR) y movilización (SDH) de sorbitol. Para ello se transformó *Arabidopsis* con un vector que confiriera una expresión fuerte y constitutiva al gen de elección, y que añadiera un epítoto que permitiera identificar el péptido producido en las plantas mediante western-blot (pEarleyGate 202; Earley y cols., 2006). Se trabajó con las regiones codificantes de los genes *AtA6PR* y *MdA6PR*, dado que la enzima A6PR es la proteína clave en la síntesis de sorbitol (Hirai, 1981; Kim y cols., 2007; Negm y Loescher, 1981), particularmente la secuencia proveniente del genoma de manzano que ha mostrado ser suficiente para producir acumulación de sorbitol en plantas que de forma natural no lo sintetizan, como tabaco y caquis japonés (Brown y cols., 1999; Gao y cols., 2001; Tao y cols., 1995).

Se trabajó con 3 genotipos distintos, uno silvestre y dos mutantes *knockout* en el gen *AtSDH*, *sdh1-1* y *sdh1-4* (Aguayo y cols., 2013). La elección de los mutantes, el genotipo silvestre y ambos ADNc con los que se transformaron se basó en que primero, *Arabidopsis* posee genes que codifican para enzimas que sintetizan y metabolizan sorbitol (Zamudio, 2010; Mandujano, 2010). Por lo tanto una sobre-acumulación de una enzima A6PR podría haber sido compensada mediante un cambio en la expresión de

*AtSDH* endógena, de tal manera de mantener constantes los niveles de sorbitol en la planta transformada. Para explorar este fenómeno en mayor profundidad, se trabajó con mutantes en el locus del gen encargado de la conversión de sorbitol a fructosa, *AtSDH*, de manera de causar mayores perturbaciones en los niveles de azúcares en las líneas obtenidas. Segundo, en el trabajo de Nosarzewski y cols. (2012), los niveles de sorbitol están en el orden de los nmoles/g PS (~300 nmoles/g PS en la mutante *sdh1-1*, 250 nmoles/g PS para la planta silvestre, ambos en condiciones normales de desarrollo), en comparación al resto de los azúcares solubles usualmente reportados en la literatura (sacarosa, glucosa y fructosa) cuya concentración varía entre ~2 - ~25  $\mu$ moles/g PS (este trabajo, (Strand y cols., 2000; Strand y cols., 1997). Esto podría sugerir que la actividad SDH es alta en *Arabidopsis*, y/o la actividad A6PR es baja, no permitiendo la acumulación de este poliol, por lo menos en condiciones de crecimiento normales. De ahí, se decidió además transformar plantas silvestres, *sdh1-1* y *sdh1-4* con la secuencia codificante de *A6PR* de manzano, la cual se ha reportado que aumenta a altos niveles el sorbitol en tabaco y caquis japonés (Gao y cols., 2001; Tao y cols., 1995). Tercero, si se considera el tamaño pequeño de *Arabidopsis* en comparación a las plantas recién mencionadas, y la baja acumulación endógena de sorbitol en este organismo (Nosarzewski y cols., 2012), podría resultar más notorio, incluso perjudicial el efecto de la transformación de *MdA6PR*, tanto en el genotipo silvestre como en ambas mutantes.

## 6.1 Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreacumulen la proteína A6PR.

El vector de destinación elegido para transformar plantas, pEarleyGate 202, tiene incorporada la tecnología Gateway en el proceso de clonación. Como se mencionó anteriormente, el vector de entrada pCR8 (Gateway compatible) con la secuencia codificante de *AtA6PR* clonado en él fue obtenido en un trabajo previo a esta tesis (Zamudio, 2010), por lo cual solo fue necesario clonar la secuencia codificante de *MdA6PR* en pCR8. El proceso de clonamiento de esta secuencia en pCR8 fue concretada sin problemas, lo que se puede apreciar en las Figuras 3, 4 y 5, obteniéndose 4 colonias con la secuencia clonada en orientación sentido, respecto a los sitios *attL1* y *attL2*, las que fueron secuenciadas y se determinó que si bien poseían un cambio de base con respecto a la secuencia disponible en la base de datos, esta mutación es silente (sección 5.1). La recombinación de ambos vectores de entrada (pCR8-*AtA6PR* y pCR8-*MdA6PR*) con pEarleyGate 202 se llevó a cabo sin inconvenientes, realizando pruebas diagnósticas de biología molecular para comprobar la correcta inserción de los *A6PRs* (Figuras 7 y 8). La transformación de *Agrobacterium* con los vectores obtenidos, y con pEarleyGate 202 sin inserto también fue exitosa (sección 5.1, Figura 9). Subsecuentemente, los tres genotipos de *Arabidopsis* fueron transformados ( $T_0$ ) por inmersión floral con cada uno de los tres vectores portados por *Agrobacterium* (pEarleyGate 202, pEarleyGate 202-*AtA6PR* y pEarleyGate 202-*MdA6PR*; sección 4.3.3).

Tras la transformación de las plantas, se colectaron las semillas ( $T_1$ ), las cuales fueron sembradas en medio MS suplementado con BASTA. Considerando la tasa de transformación habitual de *Arabidopsis* (1-2%, Clough y Bent, 1998), se sembraron al menos 2000 semillas  $T_1$  colectadas de cada transformación (wsn, wat, wmd, 1sn, 1at, 1md, 4sn, 4at y 4md; Tabla III), de tal manera de evidenciar la presencia de los organismos transgénicos, los cuales serán resistentes a BASTA, en tanto que las plantas no transformantes germinan, pero presentan un fenotipo de crecimiento retardado a los 7 días de desarrollo, y posteriormente mueren (datos no mostrados). Con las plantas seleccionadas, se realizó extracción de ADNg (sección 4.3.4 y distintos PCRs (Tabla II)) para comprobar la presencia de los insertos de interés (Figura 6). A pesar de obtener múltiples líneas al transformar con el vector sin inserto y pEarleyGate 202-AtA6PR (ver abajo), no se lograron identificar plantas transformadas con Mda6PR (wmd, 1md o 4md). Particularmente, no se registraron plantas con fenotipo resistente a BASTA en las semillas wmd (datos no mostrados), se identificaron 9 posibles transformantes 4md (resistentes a BASTA, pero sin amplificar el fragmento 35S-Mda6PR por PCR (sección 4.3.6, Tabla II), datos no mostrados), y 5 posibles 1md de los cuales solo uno mostró presencia del inserto por PCR (1md H, sección 5.1, Figura 15). Sin embargo, este transformante no dio semillas al finalizar su ciclo de vida, presentando estructuras florales aberrantes sin completar el desarrollo de las silicuas (datos no mostrados), por lo cual no se pudo seguir trabajando con esta línea. Puede haber varios motivos para estos resultados, la no obtención de líneas transformadas con *Mda6PR*. En primer lugar, se puede descartar que la extracción del material genético con el cual se realizó el PCR para detectar *Mda6PR*, haya sido mal realizada, dado que previo al PCR mencionado,

siempre se realizó otro PCR para demostrar la calidad de ADN<sub>g</sub> extraído (*GAPA*, sección 4.3.5). Segundo, puede ocurrir que en el proceso de transformación mediada por *Agrobacterium*, el ADN-T sufrió una truncación, y como consecuencia se insertó el gen *BAR* que otorga resistencia a BASTA, pero no *Mda6PR*; así se obtienen plantas que si bien sobreviven al agente de selección, no portan el inserto de interés (Hobbs y cols., 1990; Li y cols., 2008). Sin embargo, esta posible truncación no ocurrió con un vector muy similar, pEarleyGate 202-AtA6PR. Tercero, y como se mencionó anteriormente, *Mda6PR* es una enzima que produce una gran cantidad de sorbitol en al menos tabaco (hasta 130  $\mu\text{mol/g}$  PF; Sheveleva y cols., 1998) y caquis japonés (hasta 61,5  $\mu\text{mol/g}$  PF; Gao y cols., 2001). Para el caso de tabaco, con una concentración superior a 3  $\mu\text{mol/g}$  FW foliar, se empezaron a evidenciar daños en las hojas de las plantas (manchas necróticas). Sin embargo si se transforma también con el gen de la SDH de manzano, este valor alcanza un máximo de 4,5  $\mu\text{mol/g}$  PF sin causar efectos negativos en el desarrollo de las plantas (Deguchi y cols., 2006). En caqui, solo la planta que acumuló la cantidad máxima de sorbitol (61,5  $\mu\text{mol/g}$  PF, la planta sin daño alguno mostró una acumulación máxima de 23,1  $\mu\text{mol/g}$  PF) mostró enanismo y un aumento de la ramificación lateral aérea, sin aparición de manchas necróticas (Gao y cols., 2001). Al tener en cuenta que el proceso de selección de los transformantes en esta tesis, es la resistencia a una herbicida que produce un menor crecimiento en las plantas sensibles, es posible que hayan aparecido más plantas transformadas con *Mda6PR*, pero que debido a su expresión, se haya producido acumulación de sorbitol de manera que el crecimiento haya sido menor al que presenta una planta resistente a BASTA, de tal forma que no lograron ser identificadas como transformantes en las placas de selección. Esta hipótesis

cobra más fuerza, si se considera que la única planta que se logró identificar exitosamente como portadora de *Mda6PR*, 1md H (Figura 15), presentó un fenotipo enano y malformaciones en las flores (datos no mostrados) lo que impidió que se obtuvieran semillas de esta línea.

Dicho esto, sí se logró obtener una cantidad de transformantes ( $T_1$ ) suficientes para wat (5, Figura 12) y lat (15, Figura 14), y sus controles respectivos, wsn (4, Figura 11) y lsn (3, Figura 13), por lo cual la no obtención de mutantes con el ADNc de *Mda6PR* no afectó el desarrollo de la tesis. Todos estos transformantes fueron comprobados por la presencia de amplicón en el PCR correspondiente. Posteriormente se sembraron las semillas obtenidas de esta generación de transformantes, y se propagaron hasta obtener la generación  $T_3$ , donde es posible por medio de segregación mendeliana respecto del carácter "resistencia a BASTA", identificar las plantas homocigotas para cada línea obtenida, además de descartar posibles líneas con más de una inserción en el genoma (sección 4.3.7). La importancia de obtener líneas homocigotas donde realizar los análisis posteriores, es tener líneas homogéneas en la expresión del transgen, de manera de disminuir la variación fenotípica que pueda producir la cantidad de copias del inserto en el genoma, dado que justamente son las alteraciones en estos parámetros los que se quiere estudiar. De esta forma, a partir de 8 plantas  $T_2$  por línea, se obtuvieron homocigotas para todas, a excepción de lat D, lat J y lat L (datos no mostrados), dejando 12 líneas independientes del genotipo *sdh1-1* transformada con *AtA6PR*, en tanto que para las transformantes wat se obtuvieron plantas homocigotas para todas las líneas obtenidas (datos no mostrados).

Como se mencionó en la sección 5.1, al transformar el genotipo *sdh1-4* con los distintos vectores obtenidos, 12 plantas 4at, 9 4md y 4 4sn, crecieron en el medio con agente de selección, sin embargo solo se obtuvieron 2 plantas 4sn que dieron positivo para el PCR Cmr-Ccdb (Tabla II, datos no mostrados), en tanto que el resto de las plantas no dio positivo para sus respectivos PCRs (datos no mostrados). Esta baja eficiencia de transformación se puede explicar en parte por los motivos ya comentados; cabe mencionar que los 3 genotipos transformados en esta tesis se encontraban en las mismas condiciones de crecimiento al momento de realizarse la inmersión floral (sección 4.3.3), por lo que se puede descartar que las plantas *sdh1-4* hayan estado en malas condiciones cuando se transformaron. No se encontraron reportes en la literatura de problemas para transformar líneas provenientes de la colección SALK, además de que se logró transformar exitosamente al genotipo *sdh1-1*, de tal forma que no fue relevante finalmente no contar con transformantes 4at y 4md, ya que se logró el objetivo de tener transformantes en una línea mutante *sdh-*.

## **6.2 Obtención de un antisuero policlonal $\alpha$ -His-AtSDH.**

Como se mencionó en sección 5.1, se contaba con un antisuero policlonal  $\alpha$ -His-AtA6PR y de un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -FLAG, para detectar la proteína AtA6PR endógena y el producto de la expresión de *FLAG-AtA6PR* en las plantas transformantes, respectivamente, por lo que era necesario generar un anticuerpo capaz de reconocer a AtSDH. Dado que no existe un anticuerpo comercial que cumpla dicha función (y que se había acabado el obtenido por Mandujano (2010)), se elaboró un antisuero policlonal  $\alpha$ -His-AtSDH en ratones.

Se disponía de un trabajo anterior en el laboratorio (Mandujano, 2010), de un clon de *E. coli* BL21(DE3)pLys transformado con el vector pET-28a-AtSDH, capaz de producir la proteína recombinante His-AtSDH tras una inducción con IPTG (sección 5.1, Figura 16). Tras realizar la inducción, extracción de proteínas totales de las células, resolubilización de la fracción insoluble (His-AtSDH se encontraba en los cuerpos de inclusión), purificación mediante columnas His-Trap, diálisis y concentración de la proteína con el uso de centricones (sección 5.1, Figuras 16, 17 y 18), se obtuvo His-AtSDH de suficiente pureza para inyectar tres ratones durante tres semanas. El fin de estas inmunizaciones sucesivas, incorporando el adyuvante de Freund es generar una respuesta inmune adquirida en los ratones, con la consiguiente producción de anticuerpos, entre los cuales se encontrarán los que reconozcan al antígeno de interés, His-AtSDH. Tras la tercera inmunización se realiza una pequeña extracción de suero, con el propósito de evaluar el efecto de las inyecciones previas. Se realizaron ensayos de *dot blot* con los 3 sueros obtenidos (S1, S2 y S3) y se encontró que eran capaces de reconocer a His-AtSDH hasta una cantidad de 100 ng para S1 y S2, y de 50 ng para S3, en la máxima dilución utilizada (1:2000, Figuras 19, 20 y 21, respectivamente). Con este resultado se puede apreciar que las inmunizaciones realizadas hasta ese momento surtieron el efecto esperado, y se evidencia la producción de anticuerpos  $\alpha$ -His-AtSDH por parte de los 3 ratones. En base a esto se realizó una última inyección de antígeno y se extrajeron los sueros totales de los ratones. Para evaluar la especificidad de la detección, se utilizó una proteína que tenga baja identidad aminoacídica con el antígeno a comparar. En nuestro caso se utilizó His-AtA6PR, que aparte del epítotope 6xHis, no comparte identidad con His-AtSDH. Como se puede ver en las Figuras 22, 23 y 24, en la

máxima dilución de antisuero empleada (1:4000) hay un reconocimiento de His-AtA6PR purificada hasta los 1000 ng y de His-AtSDH purificada hasta 125 ng para S1, de 250 ng para His-AtA6PR y 62,5 ng para His-AtSDH en S2, y de 125 ng de la proteína control y 62,5 ng del antígeno en S3, indicando que S2 y S3 podrían ser los más útiles al utilizar extractos proteicos de plantas, donde AtA6PR y AtSDH están presentes. Este hallazgo fue corroborado utilizando muestras de proteínas totales de hojas de *Arabidopsis silvestre* en donde S2 y S3 a una dilución de 1:2000 detectaron una banda del tamaño esperado de AtSDH (Figuras 25B y 25C, respectivamente), no así en la mutante *sdh1-1* (datos no mostrados), no así al utilizar S1 (Figura 25A). Se decidió utilizar en los ensayos posteriores el antisuero S3 en una dilución 1:2000.

Se puede apreciar una degradación de His-AtSDH a medida que se congela y descongela para su uso, en la forma de bandas de menor peso molecular que son detectadas por los antisueros en las Figuras 22, 23, 24 y 25, que se mencionan en la sección 5.1.2 como “impurezas”.

A continuación se describirán los resultados de la variación en niveles de proteínas, azúcares y variaciones fenotípicas por separado, para luego dar una explicación global para explicar los hallazgos encontrados.

### **6.3 Detección de las proteínas involucradas en el metabolismo del sorbitol en *Arabidopsis thaliana*.**

Una vez se obtuvieron los antisueros capaces de detectar a AtSDH en extractos proteicos vegetales (sección 5.1.2), se procedió a evaluar las variaciones en los niveles de AtSDH

y AtA6PR en las líneas obtenidas, en respuesta a la sobre-expresión de *FLAG-AtA6PR*, la cual es regulada por un promotor de expresión constitutiva fuerte en plantas (35S).

En el caso de las plantas silvestres transformadas (Figura 26), solo son detectables niveles de proteína transgénica en la línea wat A (Figuras 26A y 26B), al utilizar tanto el anticuerpo  $\alpha$ -FLAG como el antisuero  $\alpha$ -His-AtA6PR (que es capaz de reconocer la proteína endógena y la proteína con epítipo), en tanto que se detecta la presencia de la proteína endógena en wat A y wat L (y FLAG-AtA6PR en wat L solo al utilizar el antisuero  $\alpha$ -His-AtA6PR (Figura 26B)), además de en la línea wsn C, transformada con el vector sin inserto (Figura 26B). Una posible explicación de este fenómeno sea que con la fuerte expresión del promotor 35S, y al ser *FLAG-AtA6PR* prácticamente idéntica a *AtA6PR* (la única diferencia entre ellas es el epítipo FLAG de 24 nt, Earley y cols., 2006), se haya gatillado silenciamiento génico post transcripcional (SGPT), debido al paso de los niveles de ARNm sobre un cierto umbral, de tal forma que no se acumula el transcrito endógeno ni el transgénico, produciéndose finalmente la carencia de la proteína correspondiente (Butaye y cols., 2005; Eamens y cols., 2008; Hirai y cols., 2010; Schubert y cols., 2004). Además, se aprecia que los niveles de AtA6PR endógena en wat A y L no sobrepasan los niveles encontrados en wsn C, y también se puede ver un posible silenciamiento parcial en wat L, que presenta menos FLAG-AtA6PR que wat A, y menos AtA6PR que wsn C (Figura 26B). Al evaluar la presencia de AtSDH, se puede ver que, cualitativamente, no pareciesen haber diferencias en los niveles de ésta entre las líneas respecto al control (Figura 26C). Por lo tanto, no pareciese haber una regulación de la cantidad de proteína AtSDH en las distintas líneas, si se considera que se generaron

líneas con mayor AtA6PR (wat A), y líneas sin AtA6PR detectables (wat B, C e I), por lo que sus niveles de sorbitol debiesen ser diferentes que las plantas wsn C.

Para el caso de las transformantes del genotipo *sdh1-1* hay que recalcar en primer lugar que, tal como se tenía de antecedente (Aguayo y cols., 2013), no hubo detección de AtSDH en ninguna de las líneas analizadas (datos no mostrados). Dicho esto y considerando que el antisuero  $\alpha$ -His-AtA6PR mostró una mayor detección de FLAG-AtA6PR que el anticuerpo  $\alpha$ -FLAG (al menos en las condiciones utilizadas) se explicarán los niveles de proteína en conjunto (Figura 27). Se detectó AtA6PR marcada con FLAG, además de AtA6PR endógeno en las líneas 1at E, 1at F, 1at G, 1at H, 1at I, 1at N, 1at O, 1at S, 1at T y 1at U, además de detectar solo la proteína endógena en la línea control 1sn B, y un posible silenciamiento en 1at P (Figura 27B). Se puede ver variación en los niveles de AtA6PR totales, en donde, en orden decreciente, se encuentran los mayores niveles totales de esta proteína en 1at G, 1at E, 1at F, y 1at T. Éste es un resultado común en la obtención de líneas transformantes, donde es habitual que al expresar un transgen con un promotor fuerte como el 35S, se obtengan líneas con niveles variables de expresión, ya sea por eventos de silenciamiento del transgen, o por el lugar de inserción de éste, lo cual puede determinar la potencialidad de las secuencias a ser expresadas (Allen, 2009; Matzke y Matzke, 1998). La cantidad de material requerida para realizar análisis de western, de azúcares y de sorbitol era alta, y se extrajeron proteínas y metabolitos de todas las hojas roseta de las plantas (el órgano más abundante, presente en todas las líneas). Sin embargo, en vista de los resultados, sería muy interesante analizar los niveles de los transcritos de *FLAG-AtA6PR* y *AtA6PR*, en

las líneas en donde no se pudo detectar la presencia de ninguna de las proteínas y compararlas con las líneas que muestran acumulación de ambas proteínas, para determinar la ocurrencia efectiva de SGPT en ellas.

Otro aspecto que llama la atención es la variación en los niveles de AtA6PR endógena entre las distintas líneas obtenidas en comparación a sus controles. Para el genotipo silvestre y el mutante además se ven situaciones distintas, en donde se ve que wat A y wat L no sobrepasan los niveles de AtA6PR de wsn C (Figura 26 B), en cambio en el genotipo *sdh1-1* se observa un claro aumento en los niveles de AtA6PR en la mayoría de las líneas (Figura 27B). En primer lugar, se puede descartar un mal manejo de las muestras al momento de realizar los geles de poliacrilamida, ya que para ambos casos se adjunta un SDS-PAGE con tinción de Coomassie como control de carga (Figuras 26D y 27C). En ambos se aprecia la presencia de la subunidad grande de la enzima Rubisco, (de un tamaño ~50 kDa) la cual representa hasta el 50% de la proteína en una célula vegetal (Ma y cols., 2009), por lo que representa un buen indicador de la uniformidad de la proteína ensayada en cada línea evaluada. Ahora bien, en el caso del genotipo silvestre esta variación en los niveles de AtA6PR se puede explicar por un posible silenciamiento génico parcial en la línea wat L, lo que se traduce en que haya una cantidad relativamente baja tanto de FLAG-AtA6PR como de AtA6PR, pero el silenciamiento no es tan drástico como para inhibir su producción (como podría ser el caso de wat B, wat C y wat I). Además se puede ver que no hay diferencias entre wsn C y wat A en cuanto a AtA6PR, lo cual es un resultado esperado (Figura 26B). En el caso de las líneas del genotipo *sdh1-1*, la situación es más compleja. Se observa que hay una

alta acumulación de AtA6PR en las líneas 1at G, 1at E, 1at T y 1at F, principalmente, y en el resto de las líneas (a excepción de 1at P, donde no hay detección) hay un aumento leve de AtA6PR, a pesar de tener relativamente poca FLAG-AtA6PR. Teniendo en cuenta la carencia de AtSDH en este genotipo, una explicación es posible: si se considera que la presencia de FLAG-AtA6PR produce un aumento del sorbitol celular, podría ser que el poliol esté actuando como señalizador produciendo un aumento en la tasa de transcripción del gen endógeno, provocando su mayor acumulación, y al no estar presente AtSDH, a mayor acumulación de FLAG-AtA6PR, mayor acumulación de sorbitol, y por lo tanto mayor acumulación de AtA6PR. Esto no ocurriría en el genotipo silvestre, dado que la presencia de AtSDH podría estar metabolizando parte del sorbitol producido, de manera que con la técnica empleada no se pudo detectar aumentos en la cantidad de AtA6PR. Si bien no existen ejemplos en la literatura con el metabolismo del sorbitol que den cuenta de este fenómeno, existen casos de retroalimentación positiva entre un metabolito y su ruta de síntesis, como en la síntesis de etileno o ácido abscísico (Petruzzelli y cols., 2000; Xiong, 2003). Además, se ha reportado en diversos trabajos que los azúcares en general sirven como señales celulares que comandan la expresión de genes (Ciereszko y Kleczkowski, 2002; de Sousa y cols., 2008; Klotke y cols., 2004; Koch, 1996; Rekart-Cowie y cols., 2008), y que su abundancia relativa altera los patrones de expresión de los genes relacionados tanto a su síntesis como a su degradación, redirección a otras rutas, etc. Por lo tanto, un análisis *in silico* y experimental del promotor de *AtA6PR* sería muy informativo para determinar la identidad de las cajas presentes, y para determinar si responde a sorbitol.

#### 6.4 Estudiar el efecto de la sobre-acumulación de A6PR en plantas de *Arabidopsis thaliana* en el desarrollo.

Al analizar primero el caso de las plantas silvestres transformadas, se puede ver en la Figura 28 que, a grandes rasgos, existen 2 grupos de plantas, unas que presentan una disminución moderada de algunos de los atributos morfológicos medidos (Figuras 28A, E, F), mientras en otros caracteres no difieren estadísticamente de la planta control wsn C (Figuras 28B, C, D, G), wat B y wat L, y otro que presenta una severa disminución de los caracteres evaluados, wat A, wat C y wat I, a excepción de la cantidad de hojas rosetas y el porcentaje de agua por planta (Figuras 28B, G). Para el caso de las transformantes genotipo *sdh1-1*, se puede identificar 3 grupos de plantas, el primero donde las plantas no presentan diferencias estadísticas con el control (1at N, 1at O, 1at P, 1at S, 1at T y 1at U, Figura 29), otras que si bien no difieren estadísticamente del control 1sn B en la mayoría de los parámetros evaluados (1at E, 1at F y 1at I), muestran un promedio menor al control, lo que los sitúa en algunos casos relacionados con el tercer grupo (Figuras 29A, C, D, E, F), en donde el crecimiento se vio drásticamente disminuido (1at G y 1at H, Figuras 29A, C, D, E, F). Nuevamente en estas mutantes, con respecto a su control, no hay diferencias en el número de hojas rosetas ni en el porcentaje de agua por planta (Figuras 29B, G). Pareciera ser hasta el momento, que las diferencias entre las líneas analizadas está en el tiempo que demoran en alcanzar la fase reproductiva de crecimiento, dado que finalmente todas las líneas muestran un crecimiento que les permite formar flores y silicuas, y posteriormente semillas.

Además al comparar los cambios morfológicos entre las líneas wat y lat, se puede ver una mayor severidad en lat G y lat H, que presentan un tallo de menor longitud que línea wat A, y que como se comentó antes, la disminución en hojas caulinares, tallos secundarios y órganos florales se puede interpretar como una extensión del rasgo “longitud de tallo” (Figuras 28 y 29). Este fenómeno podría estar ligado aparte a la presencia de AtA6PR, a la falta de AtSDH en las mutantes *sdh1-1*, lo que produciría una mayor acumulación de sorbitol en ellas, respecto a wat A.

#### **6.5 Evaluación de la concentración de sorbitol y sacáridos en las líneas transformantes obtenidas, sobre-expresoras del gen *AtA6PR*.**

Como se mencionó en la sección 5.3, no se logró cuantificar el sorbitol en las muestras provenientes de las líneas transformantes obtenidas mediante el método empleado (kit de detección de sorbitol/xilitol de Megazyme International Ireland). Cabe destacar que las cantidades reportadas por Nosarzewski (2012) deberían haber sido detectables, según las instrucciones del fabricante del kit (ver abajo). Al respecto se manejan dos opciones. Primero, en el proceso de extracción (sección 4.3.10), es necesario realizar una extracción con cloroformo, dado que el extracto de alcoholes es de color verde producto de la clorofila presente (esta coloración interfiere con las mediciones posteriores y debe ser removida según el fabricante). Al mezclar los extractos con cloroformo y realizar una centrifugación se obtiene una fase orgánica y una acuosa, en donde se produjo la separación de la clorofila (y otros compuestos lipofílicos) de los azúcares solubles. Este paso de limpieza resultó ser eficaz en la extracción y cuantificación de los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa, con el kit de detección apropiado de la misma empresa

(sección 4.3.11). Esto sugiere que quizás los polioles presentes en la mezcla cloroformo:agua partitionaron completa, o parcialmente en la fase orgánica de la extracción con cloroformo, considerando que el poliol es parcialmente soluble en cloroformo, a diferencia del resto de los azúcares evaluados en esta tesis, glucosa, fructosa y sacarosa (Akhilesh y cols., 2012; Gomez y cols., 2002).

Una segunda alternativa es que hubo una menor cuantificación de polioles por el kit utilizado, de lo que señalaba el manual del fabricante. Los niveles de sorbitol detectados en *Arabidopsis* por Nosarzewski y cols. (2012) alcanzan 400 nmoles/g PS, lo que equivale a 2.2 ng de sorbitol/g PS. Considerando que el peso seco es ~10% del PF (Figuras 28G, 29G), y que en esta tesis se extrajeron los polioles a partir de ~0,2 g, se debería obtener 110 ng de sorbitol en la muestra. El volumen de la muestra obtenida es de 200  $\mu$ L, y al realizarse en triplicados se tiene un volumen de 60  $\mu$ L por reacción, lo que equivale a 0,033  $\mu$ g (33 ng) de sorbitol por reacción. Según las indicaciones del fabricante, el límite de detección de sorbitol teórica es de 10 ng/reacción, considerando las condiciones empleadas en esta tesis. Sin embargo, el límite de detección experimental (utilizando dos soluciones estándar) fue de 195 ng/reacción, cantidad ~6 veces mayor que la cantidad de sorbitol reportado por Nosarzewski y cols. (2012). Es probable que si el kit hubiese funcionado con un valor cercano al ~100% de eficiencia, se hubiera logrado cuantificar sorbitol en al menos algunas de las muestras donde se hubiese producido la acumulación de este poliol. Otra forma de explorar esta hipótesis sería probar la cuantificación de sorbitol a partir de una muestra biológica que naturalmente acumule una alta y conocida concentración del poliol, como por ejemplo

una muestra proveniente de manzana (Loescher y cols., 1982), de manera de evaluar la efectividad del kit en cuanto a la cuantificación de sorbitol biológico.

Al combinar ambas explicaciones, se puede dar cuenta del por qué finalmente el método adoptado fue insuficientemente sensible para cuantificar el sorbitol en nuestras muestras, de tal manera que se debe buscar una técnica de mayor sensibilidad, o que se base en otros principios para la identificación de compuestos, que no requiera el paso de eliminación de clorofila en la muestra (como HPLC o espectrometría de masas con cromatografía de gases (GC - MS)).

Se cuantificaron los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa en todas las líneas homocigotas obtenidas (sección 5.3), a partir de hojas roseta. Se puede ver que para las transformantes wat solo hay diferencias en glucosa y fructosa en la línea wat L (Figuras 30A y 30B), que en ambos casos aumenta, y hay una disminución en los niveles de sacarosa de todas las líneas en comparación a wsn C (Figura 30C). Sin embargo, no se aprecia una correlación entre los niveles de sacarosa y el fenotipo de disminución en el crecimiento encontrado en las distintas líneas (Figura 28). Más aún, las cantidades de azúcares solubles totales solo son estadísticamente diferenciables del control en wat B y wat L (Figura 30D), las líneas que presentaron menor discrepancia con respecto al control en los caracteres evaluados, como longitud del tallo, número de hojas caulinares, etc (sección 5.2). Por otro lado, en wat B los azúcares totales disminuyeron en tanto que en wat L aumentaron con respecto a wsn C (Figura 30D). De esta manera no pareciera poder explicarse por este factor aislado (cambio de concentración de

sacarosa o cambio de niveles de azúcares totales), las alteraciones morfológicas encontradas a lo largo de los transformantes wat.

Para las líneas transformantes genotipo *sdh1-1*, en los niveles de glucosa solo se registran diferencias significativas en 1at G, donde aumentan a aproximadamente el doble en comparación al control 1sn B, mientras que se puede apreciar un leve aumento, y disminución (aunque no significativo) en las líneas 1at H y 1at I, y en 1at N, respectivamente (Figura 31A). En los niveles de fructosa se puede apreciar aumentos no significativos en las líneas 1at G, 1at H, 1at I y 1at U, una disminución no significativa en 1at N y un aumento significativo de aproximadamente el doble en 1at T (Figura 31B).

Para la concentración de sacarosa se ven disminuciones significativas de alrededor de 4 veces en las líneas 1at G, 1at H, 1at I y 1at T, disminuciones moderadas pero no significativas en las líneas 1at E y 1at F, y un aumento significativo en los niveles de este azúcar en la línea 1at S (Figura 31C). Finalmente, en los azúcares totales, se ve variación significativa en las líneas 1at E, 1at F, 1at I, 1at N y 1at O, en las que disminuye, y un aumento aunque no significativo en la línea 1at S, mientras que en el resto de las líneas los promedios se mantienen cercanos al nivel de la línea transformada con el vector sin inserto, 1sn B (Figura 31D).

En base a los análisis de ambos tipos de genotipos transformantes, se puede decir que no hay una relación directa entre los niveles de los distintos azúcares y los fenotipos morfológicos observados. Por un lado, en el genotipo silvestre, no hay variaciones en los niveles de glucosa ni fructosa a excepción de wat L (Figuras 30A y 30B), donde aumentan, sin embargo esta línea no difiere en sus características morfológicas con el



control, y además tampoco presenta diferencias con wat B (Figura 28), la cual no presenta diferencia en estos azúcares respecto a wsn C ni a las líneas que tienen un crecimiento menor, wat A, wat C y wat I (Figuras 28 y 30). Por otro lado los niveles de sacarosa disminuyeron en todas las líneas a excepción de wat I (Figura 30C), y los azúcares totales se mantuvieron constantes en wat A, wat C y wat I, disminuyeron en wat B y aumentaron en wat L (Figura 30D). De esta manera, en este genotipo aislado, no se puede inferir alguna incidencia directa entre la variación de azúcares y el desarrollo y crecimiento de la planta.

En el caso de las transformantes del genotipo *sdh1-1*, existe una situación similar, en donde se encuentran líneas que tienen características morfológicas distintas pero presentan variaciones similares en algunos de los azúcares (1at G, 1at H, 1at T y 1at U Figura30B; 1at G, 1at H, 1at I y 1at T, Figura31C), o líneas con desarrollo y crecimiento similares pero diferentes concentraciones en los carbohidratos analizados (1at N respecto al control, Figura 31D, 1at T y 1sn B, Figura31C).

Estos resultados ponen de manifiesto que la introducción de AtA6PR en los distintos genotipos produjo un cambio en las concentraciones de los azúcares medidos en las distintas líneas, y en algunas de éstas se produjeron además cambios morfológicos, habiendo un retardo en el desarrollo de la fase reproductiva, en relación a los controles respectivos.

## **6.6 Consideraciones Finales.**

A continuación se integrarán todos los resultados obtenidos, a modo de determinar el efecto final de la sobre-expresión de la secuencia codificante de *AtA6PR* en *Arabidopsis*.

La información disponible hasta la fecha es insuficiente para comprender lo ocurrido en las líneas que no muestran acumulación de *AtA6PR* endógena ni fusionada a FLAG (wat B, wat C, wat I y 1at P). Como se mencionó anteriormente (sección 6.1), es necesario evaluar por medio de qRT-PCR la expresión de los genes correspondientes, y compararla con la expresión en las líneas donde sí se detectó *AtA6PR*, de manera de corroborar si efectivamente no debería haber proteína, o si bien los antisueros y anticuerpo utilizados no son capaces de detectar tan bajas cantidades (Figuras 26 y 27). Esto es de suma importancia dado que si se compara el comportamiento de estos azúcares con dos líneas *knockout* para *AtA6PR* (Zamudio, 2013), se observa una disminución en los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa, sin diferencias fenotípicas entre las mutantes y la planta silvestre. Esto no concuerda con el comportamiento de las líneas (con presunto SGPT) generadas en esta tesis, donde no se observaron variaciones en los niveles de glucosa ni fructosa, solo disminuciones significativas de sacarosa en algunas líneas (wat B, wat C, Figura 30C) y líneas donde tampoco varió la sacarosa (wat I y 1at P, Figura 31C). Sin embargo, las diferencias observadas por Zamudio (2013) podrían deberse a que trabajó con plántulas enteras de 15 días en medio MS suplementado con 3% de sacarosa, mientras que en esta tesis se trabajó con plantas que se sembraron en medio MS sin suplemento, y que a la semana de desarrollo se traspasaron a medio hidropónico, donde luego de la quinta semana total de desarrollo se extrajeron las hojas rosetas para realizar las distintas mediciones. Cabe mencionar que en el trabajo de Kanamaru (2004), se transformó manzano con su propio ADNc de *MdA6PR*, obteniéndose efectivamente líneas silenciadas (además de líneas sobreexpresoras), en la que solo se evaluó el contenido de sorbitol y sacarosa, encontrándose

que tanto en las líneas silenciadas como sobre-expresoras de *MdA6PR*, hubo un aumento en los niveles de sacarosa, a distintos grados en las distintas líneas, lo que sugiere que la regulación del flujo de carbono entre estas dos especies está distintamente regulado, lo que tiene sentido dado que manzano utiliza como principal fuente de carbono sorbitol (Negm y Loescher, 1979, 1981), mientras que *Arabidopsis* utiliza sacarosa (Haritatos y cols., 2000).

Las líneas transformantes que presentaron una disminución acentuada en el crecimiento fueron wat A, 1at G y 1at H (Figuras 28 y 29), en todos los parámetros evaluados a excepción del número de hojas rosetas y el porcentaje de agua (Figuras 28B, 28G 29B y 29G), las que mostraron un crecimiento levemente menor fueron wat L, 1at E, 1at F, 1at I y 1at N (Figuras 28 y 29), y las que no mostraron diferencias con el control fueron 1at O, 1at S, 1at T y 1at U (Figura 29). Teniendo en cuenta de que la cantidad de hojas caulinares, tallos secundarios, flores y silicuas correlacionan con la longitud del tallo principal, vale decir, en términos generales mientras más largo sea el tallo principal, mayor número del resto de los órganos mencionados, se hace evidente que lo que ocurre en estas plantas es un retardo del crecimiento reproductivo. Cabe mencionar que estas líneas con menor crecimiento eventualmente alcanzan tamaños normales, luego de 8 - 9 semanas, al menos de forma cualitativa (datos no mostrados). La acumulación relativa de *AtA6PR* total (nativa y exógena) es alta en wat A, 1at G, moderada en 1at E, 1at F y 1at T, y baja en 1at H, 1at I, 1at N, 1at O, 1at S y 1at U (Figuras 26 y 27). Los cambios en los niveles de glucosa y fructosa no son iguales entre las plantas de estos 3 grupos de plantas; en wat A no cambian (Figuras 30A y 30B), mientras que en 1at G y 1at H se

puede observar una tendencia al aumento en estos carbohidratos (Figuras 31A y 31B). Más aún, al evaluar el comportamiento de los mismos azúcares en lat T, una de las líneas que crece normal, no hay diferencias con las líneas que presentan un menor crecimiento (Figura 31). Por lo tanto, no parece haber una relación entre los niveles de glucosa y fructosa y el retardo en el crecimiento en las líneas analizadas.

Al enfocar en los niveles de sacarosa en las líneas, la acumulación de AtA6PR total se correlaciona con algunos de los resultados encontrados en la literatura para especies que han sido genéticamente manipuladas para sintetizar polioles. Por ejemplo, en el trabajo de Sheveleva y cols. (1998), se registra la aparición de lesiones y menor crecimiento en plantas de tabaco que acumulan sobre 3  $\mu\text{g/g}$  PF de sorbitol producto de su transformación con Mda6PR, y al medir los niveles de azúcares, solo se registra disminución en los niveles de sacarosa (no así en los niveles de glucosa o fructosa). En este trabajo además se detecta una baja en los niveles de myo-inositol (azúcar importante como precursor de lípidos de membrana y como señalizador celular), y más aún, es posible rescatar el fenotipo alterado en plántulas de tabaco acumuladoras de sorbitol, al agregar myo-inositol 1 mM, obteniéndose fenotipos indistinguibles entre plantas acumuladoras y no acumuladoras de sorbitol. Además, en el trabajo realizado por Deguchi y cols. (2006) donde se obtienen tabacos transgénicos que producen (Mda6PR) y metabolizan (MdSDH) sorbitol (acumulando entre 3 – 4,5  $\mu\text{g/g}$  PF de sorbitol) sin mostrar efectos secundarios visibles, se encontró que los niveles de myo-inositol no eran distintos a los de las plantas control, solo habiendo aumento en la sacarosa, lo que apoyaría la premisa de que al menos en tabaco, el myo-inositol es en parte responsable

de las alteraciones fenotípicas. En manzano sobre-acumuladores de sorbitol, también se registró un aumento de los niveles de sacarosa en algunas de las líneas, sin presentar diferencias físicas con las plantas control (Kanamaru y cols., 2004). Si bien en el presente trabajo no se midieron los niveles de myo-inositol, se considera que es poco probable que éste sea el motivo del menor crecimiento en algunas de las líneas, dado que el medio donde se seleccionaron las líneas en primer lugar contenía myo-inositol 1 mM, y además se intentó en una oportunidad agregarlo al medio hidropónico de las plantas, sin efectos aparentes (datos no mostrados). Por otro lado, en los trabajos de Gao (2001) y Deguchi (2004), se miden los niveles de myo-inositol en líneas con enanismo (con alta acumulación de sorbitol) y líneas con crecimiento normal (con moderada acumulación de sorbitol), y no se encontraron diferencias suficientes en la concentración del poliol cíclico, que explicasen la aparición de enanismo. En este último trabajo se postula que la acumulación de sorbitol sobre un cierto umbral podría estar generando un desbalance osmótico entre el citosol y la vacuola que dé cuenta de la alteración en el crecimiento. Es notable además de que el efecto de la acumulación de sorbitol tiene distintos niveles de severidad en los organismos analizados, dado que en tabaco van desde la aparición de necrosis en las hojas hasta la esterilidad y muerte de las plantas en la aclimatación a tierra (Sheveleva y cols., 1998), en caquis solo se registró enanismo y un aumento de la ramificación lateral (Deguchi y cols., 2004; M. Gao y cols., 2001), en manzano aparentemente no tienen efectos negativos en ninguna concentración (Kanamaru y cols., 2004), y en este trabajo solo se detectó un retraso de la elongación del tallo, sin aumento de las ramificaciones laterales aéreas cuando el tallo había elongado (Figuras 28D y 29D). Esto sugiere distintos grados de tolerancia o distinta activación de rutas

metabólicas por la presencia de sorbitol en las distintas especies. Este último punto se refuerza por el hecho de que se ha registrado enanismo en tabacos y trigo acumuladores de manitol, no así en *Arabidopsis*, a pesar de que en todos los casos las plantas transformantes presentan una mayor tolerancia a estrés salino (Abebe y cols., 2003; Chan y cols., 2011; Gao y cols., 2003; Karakas y cols., 1997; Thomas y cols., 1995).

Dados estos antecedentes, se puede especular que si bien se detectó la presencia de AtSDH en wat A, probablemente la alta acumulación de AtA6PR total causó un gran aumento de polioliol, que la actividad SDH no logró mantener bajo un umbral, resultando en el menor crecimiento observado. Caso contrario al de wat L, donde los niveles de AtA6PR son menores a los de wat A (Figuras 26A y 26B), pero la severidad de la disminución en el crecimiento no es tan pronunciada (Figura 28). En los casos de las líneas del genotipo *sdh1-1*, al no poseer SDH (Aguayo y cols., 2013), probablemente las concentraciones de polioliol requeridas para disminuir el crecimiento no sean tan altas como en plantas silvestres (como se observó en los trabajos de Sheveleva (1998) y Deguchi (2004), dado que no poseen la maquinaria necesaria para su metabolización. Además en las líneas *sdh-* se registró un aumento considerable de otro polioliol en comparación a las plantas silvestres, el ribitol (Nosarzewski y cols., 2012), el cual podría estar sumando su efecto al aumento del sorbitol provocado por AtA6PR en este genotipo. Sin embargo, falta información, como por ejemplo lograr cuantificar el sorbitol, y medir los contenidos de almidón y myo-inositol en las líneas obtenidas en esta tesis, para corroborar estos supuestos.

Si AtA6PR ocasiona un aumento de sorbitol en las líneas con menor crecimiento, éste obtendría sus materias primas de las reservas de G6P de la célula, con una consiguiente baja en los niveles de sacarosa y/o en los niveles de almidón y myo-inositol, no evaluados en este trabajo (Caspar y cols., 1985; Deguchi y cols., 2006; Orzechowski, 2008; Sheveleva y cols., 1998). Se ha postulado que el almidón almacenado en etapas tempranas del desarrollo sirve como reserva de carbono para procesos de crecimiento posteriores (Orzechowski, 2008; Zeeman y cols., 2007), lo que podría explicar el poco crecimiento del tallo y estructuras asociadas vistos en estas líneas (en wat A, 1at E, 1at F, 1at G, 1at H, 1at N). Se ha visto en mutantes de *Arabidopsis* en la síntesis o en la degradación de almidón, un retardo en el crecimiento y en la floración de las plantas (Caspar y cols., 1991, 1985; Corbesier y cols., 1998; Zeeman y cols., 2010), un escenario similar al encontrado en wat A, 1at E, 1at F, 1at G, 1at H, 1at N, en donde las plantas de la líneas que se destinaron a la producción de semillas alcanzaron posteriormente tamaños similares a los de la planta control correspondiente (wsn C y 1sn B) y a los de las líneas que no vieron drásticamente afectado su desarrollo, wat L y 1at T (datos no mostrados).

Por otro lado en mutantes que sintetizan menos sacarosa, se ha visto una disminución en el crecimiento (Barratt y cols., 2009; Fallahi y cols., 2008; Strand y cols., 2000), lo que puede explicar en parte lo observado en las líneas con menor crecimiento, pero no por completo, dado que la reducción en los niveles de sacarosa de 1at T no ocasionaron una disminución de su crecimiento, si es que solo la disminución de la sacarosa fuera responsable de los fenotipos obtenidos.

Con la información obtenida en esta tesis es posible afirmar que la acumulación de AtA6PR en *Arabidopsis thaliana* es capaz de generar una disminución en los niveles de sacarosa, además de alteraciones en el tiempo de desarrollo de la fase reproductiva de crecimiento en este organismo. Los efectos vistos en disminución de la longitud de tallo, menor cantidad de hojas caulinares, tallos laterales y órganos florales se pueden explicar en parte por la disminución de sacarosa (dado que la línea 1at T tiene un crecimiento normal, y niveles bajos de sacarosa, Figuras 29 y 31), que coinciden en el retardo en el crecimiento con mutantes en la síntesis o utilización de este azúcar (Barratt y cols., 2009; Fallahi y cols., 2008; Strand y cols., 2000). Una posible baja en los niveles de otros azúcares, como el almidón, myo-inositol, podrían explicar en conjunto la disminución en el crecimiento de las líneas observadas (wat A, wat L, 1at E, 1at F, 1at G, 1at H, 1at I, 1at N). De esta manera, se puede concluir que la hipótesis fue respondida aunque no completamente comprobada, observándose que la sobre-acumulación de AtA6PR es capaz de provocar un retraso en el crecimiento reproductivo en *Arabidopsis thaliana*, pero que causó una disminución en el contenido de sacarosa en las líneas obtenidas, y no hubo variaciones en los contenidos de glucosa y fructosa.

## 7 Conclusiones

En esta tesis se evaluó el crecimiento y concentración de azúcares solubles en *Arabidopsis thaliana* mediante la sobre-acumulación de la proteína A6PR, utilizando el ADNc del gen endógeno del mismo organismo (*AtA6PR*), o a partir de manzano (*MdA6PR*). Se obtuvieron 5 líneas que presentaron la inserción de *AtA6PR* utilizando el genotipo silvestre, y 11 líneas al utilizar el genotipo mutante *sdh1-1*. En ningún caso se obtuvieron transformantes viables con la construcción que portaba el ADNc de *MdA6PR*, probablemente por el efecto que la enzima desencadenó en las plantas. Se comprobó por medio de ensayos de western blot, la acumulación diferencial de proteína AtA6PR en varias de las líneas obtenidas, para ambos genotipos utilizados. En estas líneas, se observó un retraso en el establecimiento de la fase reproductiva del desarrollo, reflejado en una disminución en la elongación del tallo principal, menor número de tallos laterales y de hojas caulinares, y una disminución en la cantidad de órganos florales, en comparación a la línea control utilizada en cada caso, no viéndose afectada la fase vegetativa (o fase de roseta) en ninguna de las líneas obtenidas. La severidad de dicho retraso en el desarrollo fue variable en de las distintas líneas, con una mayor severidad del retraso en la mayoría de las líneas que mostraron mayor acumulación de AtA6PR. Al analizar el contenido de azúcares solubles, se constató en términos generales, una ausencia de modulación en los niveles de glucosa y fructosa, no así para el caso de la sacarosa, la cual disminuyó en las líneas que presentaron una alta acumulación relativa de AtA6PR total. Por otro lado, no fue posible medir el contenido de sorbitol en las líneas. De esta forma se corrobora parcialmente la hipótesis planteada

en esta tesis, y se puede decir que la sobre-acumulación de A6PR en *Arabidopsis thaliana* provoca una disminución del contenido de sacarosa foliar, no altera los contenidos de glucosa y fructosa, y gatilla efectos negativos en el crecimiento de la planta, reflejado como un retraso en el desarrollo de las líneas obtenidas.

## 8 Proyecciones

- Realizar ensayos de qRT-PCR con el fin de determinar la acumulación de ARNm de *AtA6PR*, de manera de corroborar los resultados obtenidos en los western-blots  $\alpha$ -FLAG y  $\alpha$ -His-*AtA6PR*.
- Cuantificar otros azúcares importantes para el desarrollo vegetal como el almidón y el myo-inositol, para así tener una visión más completa de los efectos de la acumulación de *AtA6PR* en las líneas transformantes obtenidas.
- Como se mencionó en la introducción, uno de los fines de la acumulación artificial de sorbitol o manitol en plantas que no lo acumulan (trigo, tabaco, caquis) es desarrollar en estos organismos una mayor tolerancia a estrés de tipo abiótico, como sequía o alta salinidad. Entonces, sería interesante evaluar el comportamiento de las líneas obtenidas en estas condiciones, para ver si la acumulación de sorbitol en estas plantas les confiere un mejor desempeño frente a las condiciones mencionadas en comparación a plantas silvestres.
- Medir el contenido de polioles en las líneas transformantes obtenidas por medio de una técnica con mayor sensibilidad, como HPLC o GC-MS.

## 9 Presentaciones

- Zamudio M., Wurman J., **Parada R.**, Handford M. Characterisation of AtA6PR, a putative aldose-6-phosphate reductase from *Arabidopsis thaliana*. VI Reunión de Biología Vegetal. Pucón, 30 de noviembre, 1 y 2 de diciembre 2011. Chile.
- **Parada R.**, Aguayo M.F., Zamudio S., Ampuero D., Handford M. Sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*, a non-translocating sorbitol species. XXXV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, 2 al 5 de octubre 2012. Chile
- **Parada R.**, Handford M. Altering the AtA6PR content in *Arabidopsis thaliana* affects growth. IX Reunión de Biología Vegetal. La Serena, 1 al 4 de diciembre 2014

## 10 Referencias

- Abebe, T., Guenzi, A. C., Martin, B., & Cushman, J. C. (2003). Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology*, *131*(4), 1748–55.
- Aguayo, M. F. 2013. Caracterización bioquímica y rol in vivo de AtSDH, una supuesta sorbitol deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas mención Biología Celular, Molecular y Neurociencias. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Aguayo, M. F., Ampuero, D., Mandujano, P., Parada, R., Muñoz, R., Gallart, M., ... Handford, M. (2013). Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, *205-206*, 63–75.
- Akhilesh, D., Faishal, G., & Kamath, J. V. (2012). Review Article Comparative study of carriers used in proniosomes. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, *1*(1), 164–173.
- Allen, G. C. (2009). *Functional Organization of the Plant Nucleus*. (I. Meier, Ed.) (Vol. 14, pp. 1–29). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Archbold, D. D. (1999). Carbohydrate availability modifies sorbitol dehydrogenase activity of apple fruit. *Physiologia Plantarum*, *105*(3), 391–395.
- Bantog, N. A., Yamada, K., Niwa, N., Shiratake, K., & Yamaki, S. (2000). Gene Expression of NAD<sup>+</sup>-Dependent Sorbitol Dehydrogenase and NADP<sup>+</sup>-Dependent Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase During Development of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Fruit. *Engei Gakkai Zasshi*, *69*(3), 231–236.
- Barratt, D. H. P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., ... Smith, A. M. (2009). Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(31), 13124–9.
- Bellaloui, N., Brown, P., & Dandekar, A. (1999). Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant Physiology*, *119*(2), 735–42.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–54.

- Brown, P., Bellaloui, N., Hu, H., & Dandekar, a. (1999). Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency. *Plant Physiology*, 119(1), 17–20.
- Brown, P. H., & Hu, H. (1996). Phloem Mobility of Boron is Species Dependent: Evidence for Phloem Mobility in Sorbitol-rich Species. *Annals of Botany*, 77, 497–506.
- Butaye, K. M. J., Cammue, B. P. a., Delauré, S. L., & De Bolle, M. F. C. (2005). Approaches to Minimize Variation of Transgene Expression in Plants. *Molecular Breeding*, 16(1), 79–91.
- Büttner, M. (2007). The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters*, 581(12), 2318–24.
- Carey, E. E., Dickinson, D. B., Wei, L. Y., & Rhodes, A. M. (1982). Occurrence of sorbitol in *Zea mays*. *Phytochemistry*, 21(8), 1909–1911.
- Caspar, T., Huber, S. C., & Somerville, C. (1985). Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity. *Plant Physiology*, 79(1), 11–7.
- Caspar, T., Lin, T. P., Kakefuda, G., Benbow, L., Preiss, J., & Somerville, C. (1991). Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiology*, 95(4), 1181–8.
- Chan, Z., Grumet, R., & Loescher, W. (2011). Global gene expression analysis of transgenic, mannitol-producing, and salt-tolerant *Arabidopsis thaliana* indicates widespread changes in abiotic and biotic stress-related genes. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4787–803.
- Cheng, L., Zhou, R., Reidel, E. J., Sharkey, T. D., & Dandekar, A. M. (2005). Antisense inhibition of sorbitol synthesis leads to up-regulation of starch synthesis without altering CO<sub>2</sub> assimilation in apple leaves. *Planta*, 220(5), 767–76.
- Ciereszko, I., & Kleczkowski, L. a. (2002). Glucose and mannose regulate the expression of a major sucrose synthase gene in *Arabidopsis* via hexokinase-dependent mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(11), 907–911.
- Clough, S. J., & Bent, a F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 16(6), 735–43.

- Corbesier, L., Lejeune, P., & Bernier, G. (1998). The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta*, *206*(1), 131–137.
- Cuin, T. A., & Shabala, S. (2008). Compatible solutes mitigate damaging effects of salt stress by reducing the impact of stress-induced reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*, *3*(3), 207–8.
- De Sousa, S. M., Paniago, M. D. G., Arruda, P., & Yunes, J. A. (2008). Sugar levels modulate sorbitol dehydrogenase expression in maize. *Plant Molecular Biology*, *68*(3), 203–13.
- Deguchi, M., Bennett, A. B., Yamaki, S., Yamada, K., Kanahama, K., & Kanayama, Y. (2006). An engineered sorbitol cycle alters sugar composition, not growth, in transformed tobacco. *Plant, Cell & Environment*, *29*(10), 1980–8.
- Deguchi, M., Koshita, Y., Gao, M., Tao, R., Tetsumura, T., Yamaki, S., & Kanayama, Y. (2004). Engineered sorbitol accumulation induces dwarfism in Japanese persimmon. *Journal of Plant Physiology*, *161*(10), 1177–84.
- Dinant, S., & Lemoine, R. (2010). The phloem pathway: new issues and old debates. *Comptes Rendus Biologies*, *333*(4), 307–19.
- Eamens, A., Wang, M.-B., Smith, N. a, & Waterhouse, P. M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiology*, *147*(2), 456–68.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *45*(4), 616–29.
- Everard, J. D., Gucci, R., Kann, S. C., Flore, J. a., & Loescher, W. H. (1994). Gas Exchange and Carbon Partitioning in the Leaves of Celery (*Apium graveolens* L.) at Various Levels of Root Zone Salinity. *Plant Physiology*, *106*(1), 281–292.
- Fallahi, H., Scofield, G. N., Badger, M. R., Chow, W. S., Furbank, R. T., & Ruan, Y.-L. (2008). Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *Journal of Experimental Botany*, *59*(12), 3283–95.
- Figueroa, C. M., & Iglesias, A. a. (2010). Aldose-6-phosphate reductase from apple leaves: Importance of the quaternary structure for enzyme activity. *Biochimie*, *92*(1), 81–8.

- Gao, M., Tao, R., Miura, K., Dandekar, a M., & Sugiura, a. (2001). Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 160(5), 837–845.
- Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S., Nocker, S. Van, & Loescher, W. (2003). Cloning , Expression , and Characterization of Sorbitol Transporters from Developing Sour Cherry Fruit and Leaf Sink Tissues 1, 131(April), 1566–1575.
- Gomez, L., Rubio, E. (2002). A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(4), 360–369.
- Guo, Z.-X., Pan, T.-F., Li, K.-T., Zhong, F.-L., Lin, L., Pan, D.-M., & Lu, L.-X. (2012). Cloning of NAD-SDH cDNA from plum fruit and its expression and characterization. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 57, 175–80.
- Haritatos, E., Medville, R., & Turgeon, R. (2000). Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 211(1), 105–11.
- Hirai, M. (1981). Purification and Characteristics of Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase from Loquat Leaves. *Plant Physiology*, 67(2), 221–4.
- Hirai, S., Takahashi, K., Abiko, T., & Kodama, H. (2010). Loss of sense transgene-induced post-transcriptional gene silencing by sequential introduction of the same transgene sequences in tobacco. *The FEBS Journal*, 277(7), 1695–703.
- Hobbs, S. L., Kpodar, P., & DeLong, C. M. (1990). The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Molecular Biology*, 15(6), 851–64.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Kaiser, C., Jörnvall, H., Eklund, H., Höög, J., & Ramaswamy, S. (2001). Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132(1-3), 351–8.
- Kanamaru, N., Ito, Y., Komori, S., Saito, M., Kato, H., Takahashi, S., ... Yamaki, S. (2004). Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA. *Plant Science*, 167(1), 55–61.
- Kanayama, Y., Mori, H., Imaseki, H., & Yamaki, S. (1992). Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding NADP-Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase from Apple. *Plant Physiology*, 100(3), 1607–8.

- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N., ... K, E. H. F. (2004). Exploring the Temperature-Stress Metabolome, *136*(December), 4159–4168.
- Karakas, B., Ozias-Akins, P., Stushnoff, C., Suefferheld, M., & Rieger, M. (1997). Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant, Cell and Environment*, *20*(5), 609–616.
- Kim, H.-Y., Ahn, J. C., Choi, J.-H., Hwang, B., & Choi, D.-W. (2007). Expression and cloning of the full-length cDNA for sorbitol-6-phosphate dehydrogenase and NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from pear (*Pyrus pyrifolia* N.). *Scientia Horticulturae*, *112*(4), 406–412.
- Klepek, Y., Geiger, D., Stadler, R., Klebl, F., Landouar-Arsivaud, L., Lemoine, R., ... Sauer, N. (2005). Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H<sup>+</sup>-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *The Plant Cell*, *17*(1), 204–18.
- Klepek, Y.-S., Volke, M., Konrad, K. R., Wippel, K., Hoth, S., Hedrich, R., & Sauer, N. (2010). Arabidopsis thaliana POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H<sup>+</sup> symporters in pollen and young xylem cells. *Journal of Experimental Botany*, *61*(2), 537–50.
- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N., & Heyer, A. G. (2004). Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of Arabidopsis thaliana with contrasting cold adaptation - evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell & Environment*, *27*(11), 1395–1404.
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(3), 235–46.
- Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *47*, 509–540.
- Kuo, T. M., Doehlert, D. C., & Crawford, C. G. (1990). Sugar metabolism in germinating soybean seeds: evidence for the sorbitol pathway in soybean axes. *Plant Physiology*, *93*(4), 1514–20.
- Li, J., Brunner, A. M., Meilan, R., & Strauss, S. H. (2008). Matrix attachment region elements have small and variable effects on transgene expression and stability in field-grown Populus. *Plant Biotechnology Journal*, *6*(9), 887–896.

- Liang, X., Peng, L., Baek, C.-H., & Katzen, F. (2013). Single step BP/LR combined Gateway reactions S2. *BioTechniques*, 55(5), 265–8.
- Loescher, W. H. (1987). What ' s New in Plant Physiology Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol. Plantarum*, (70), 553–557.
- Loescher, W. H., Everard, J. D., & Lansing, E. (2000). Chapter 12 Regulation of Sugar Alcohol Biosynthesis, 275–299.
- Loescher, W. H., Marlow, G. C., & Kennedy, R. a. (1982). Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves. *Plant Physiology*, 70(2), 335–9.
- Ma, Z., Cooper, C., Kim, H.-J., & Janick-Buckner, D. (2009). A study of rubisco through western blotting and tissue printing techniques. *CBE Life Sciences Education*, 8(2), 140–6.
- Mandujano, P. 2010. Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDL una probable sorbitol deshidrogenasa. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas mención Biología Celular, Molecular y Neurociencias. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Matzke, a J., & Matzke, M. a. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(2), 142–8.
- Negm, F. B., & Loescher, W. H. (1979). Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant Physiology*, 64(1), 69–73.
- Negm, F. B., & Loescher, W. H. (1981). Characterization and Partial Purification of Aldose-6-phosphate Reductase (Alditol-6-Phosphate:NADP 1-Oxidoreductase) from Apple Leaves. *Plant Physiology*, 67(1), 139–42.
- Noiraud, N., Delrot, S., & Lemoine, R. (2000). The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiology*, 122(4), 1447–55.
- Noiraud, N., Maurousset, L., & Lemoine, R. (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(9), 717–728.
- Nosarszewski, M., Clements, A. M., Downie, a. B., & Archbold, D. D. (2004). Sorbitol dehydrogenase expression and activity during apple fruit set and early development. *Physiologia Plantarum*, 121(3), 391–398.

- Nosarzewski, M., & Archbold, D. D. (2007). Tissue-specific expression of SORBITOL DEHYDROGENASE in apple fruit during early development. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), 1863–72.
- Nosarzewski, M., Downie, a. B., Wu, B., & Archbold, D. D. (2012). The role of SORBITOL DEHYDROGENASE in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 39(6), 462.
- Ohta, K., Moriguchi, R., Kanahama, K., Yamaki, S., & Kanayama, Y. (2005). Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochemistry*, 66(24), 2822–8.
- Orzechowski, S. (2008). Starch metabolism in leaves. *Acta Biochimica Polonica*, 55(3), 435–45.
- Parada, R. 2011. Análisis del patrón de expresión de AtSDL, una posible sorbitol deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*. Seminario de título para Ingeniería en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile, Santiago. Chile.
- Park, S. W., Song, K. J., Kim, M. Y., Hwang, J.-H., Shin, Y. U., Kim, W.-C., & Chung, W.-I. (2002). Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. *Plant Science*, 162(4), 513–519.
- Petruzzelli, L., Coraggio, I., & Leubner-Metzger, G. (2000). Ethylene promotes ethylene biosynthesis during pea seed germination by positive feedback regulation of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid oxidase. *Planta*, 211(1), 144–9.
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., & Sauer, N. (2007). Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiology*, 144(2), 1029–38.
- Ranney, T. (1991). Osmotic adjustment and solute constituents in leaves and roots of water-stressed cherry (*Prunus*) trees. *Journal Of The American Society For Horticultural Science*, 116(4), 684–688.
- Reidel, E. J., Rennie, E. a, Amiard, V., Cheng, L., & Turgeon, R. (2009). Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology*, 149(3), 1601–8.
- Reinders, A., Panshyshyn, J. a, & Ward, J. M. (2005). Analysis of transport activity of *Arabidopsis* sugar alcohol permease homolog AtPLT5. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1594–602.

- Rekarte-Cowie, I., Ebshish, O. S., Mohamed, K. S., & Pearce, R. S. (2008). Sucrose helps regulate cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *59*(15), 4205–17.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., & Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*, *134*(4), 1683–96.
- Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S., & Schmidt, R. (2004). Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *The Plant Cell*, *16*(10), 2561–72.
- Shaw, J. R., & Dickinson, D. B. (1984). Studies of sugars and sorbitol in developing corn kernels. *Plant Physiology*, *75*(1), 207–11.
- Sheveleva, E., Marquez, S., Chmara, W., Zegeer, a, Jensen, R., & Bohnert, H. (1998). Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. High amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. *Plant Physiology*, *117*(3), 831–9.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, *28*(4), 1057–1060. Stoop, J., Williamson, J., & Masonpharr, D. (1996). Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, *1*(5), 139–144.
- Strand, a, Zrenner, R., Trevanion, S., Stitt, M., Gustafsson, P., & Gardeström, P. (2000). Decreased expression of two key enzymes in the sucrose biosynthesis pathway, cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and sucrose phosphate synthase, has remarkably different consequences for photosynthetic carbon metabolism in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *23*(6), 759–70.
- Strand, A., Hurry, V., Gustafsson, P., & Gardeström, P. (1997). Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *12*(3), 605–14.
- Swedlund, B., & Locy, R. D. (1993). Sorbitol as the Primary Carbon Source for the Growth of Embryogenic Callus of Maize. *Plant Physiology*, *103*(4), 1339–1346.
- Tao, R., Uratsu, S. L., & Dandekar, A. M. (1995). Sorbitol synthesis in transgenic tobacco with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant & Cell Physiology*, *36*(3), 525–32.

- Tarczynski, M. C., Jensen, R. G., & Bohnert, H. J. (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5094), 508–10.
- Thomas, J. C., Sepahi, M., Arendall, B., & Bohnert, H. J. (1995). Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment*, 18(7), 801–806.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., ... Viola, R. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42(10), 833–9.
- Wang, X.-L., Xu, Y.-H., Peng, C.-C., Fan, R.-C., & Gao, X.-Q. (2009). Ubiquitous distribution and different subcellular localization of sorbitol dehydrogenase in fruit and leaf of apple. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 1025–34.
- Williams, M. W., & Raese, J. T. (1974). Sorbitol in Tracheal Sap of Apple as Related to Temperature. *Physiologia Plantarum*, 30(1), 49–52.
- Xiong, L. (2003). Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 133(1), 29–36.
- Wurman, J. 2012. Generación de un anticuerpo para el estudio de AtA6PR, una enzima involucrada en el metabolismo de sorbitol en *Arabidopsis thaliana*. Seminario de título para Ingeniería en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Zamudio, M. 2010. Determinación de la localización subcelular y la expresión de AtS6PDH, una potencial sorbitol-6-P deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*. Seminario de título para Ingeniería en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Zamudio, M. 2013 Estudios Bioquímicos y Fisiológicos de AtA6PR, una posible Aldosa-6-fosfato Reductasa de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas mención Biología Celular, Molecular y Neurociencias. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Zeeman, S. C., Delatte, T., Messerli, G., Umhang, M., Stettler, M., Mettler, T., ... Kötting, O. (2007). Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms. *Functional Plant Biology*, 34(6), 465.
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., & Smith, A. M. (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 209–34.

- Zhifang, G., & Loescher, W. H. (2003). Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. *Plant, Cell and Environment*, 26(2), 275–283.
- Zhou, R., Cheng, L., & Dandekar, A. M. (2006). Down-regulation of sorbitol dehydrogenase and up-regulation of sucrose synthase in shoot tips of the transgenic apple trees with decreased sorbitol synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3647–57.