



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEÚTICAS
ESCUELA DE PREGRADO

“Transformación estable de *Solanum lycoperscum* y *Nicotiana tabacum* con los genes de las proteínas dulces Taumatina y Brazeina.”

Memoria de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Bioquímico

Lisette Belén Colomer Berrios

Directora de la memoria de título

Dra. Claudia Stange K.

Co-director de la memoria de título

Luis Quiroz Iturra

Diciembre 2017

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN MEMORIA DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, de la Universidad de Chile que la Memoria de Título, presentado por la **srta. Lisette Belén Colomer Berríos** “**Transformación estable de *Solanum lycoperscum* y *Nicotiana tabacum* con los genes de las proteínas dulces Taumatina y Brazeina.**” ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Bioquímico.

Dra. Claudia Stange
Directora Seminario de Título

Luis Quiroz
Co-Director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Dante Miranda
Presidente Comisión

Dra. Daniela Seelenfreud
Evaluador

Dr. Davor Cotoras
Evaluador

Santiago de Chile, Diciembre de 2017.

“Culto es aquel que sabe dónde encontrar lo que no sabe” – Georg Simmel

Índice de contenidos

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Proteínas dulces	1
1.1.1 Taumatina	1
1.1.2 Brazeina	3
1.1.3 Señalización proteínas dulces	5
1.2 Mejoramiento genético y cultivo <i>in vitro</i>	7
1.2.1 Tomates <i>S. lycopersicum</i> var. Microtom	7
1.2.2 Tabacos	10
1.3 Expresión de la proteína taumatina y brazeina en modelos vegetales.	11
OBJETIVOS	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
2. MATERIALES Y METODOS	16
2.1 Reactivos	16
2.2 Material biológico	16
2.2.1 Material vegetal	16
2.2.2 Cepas bacterianas y vectores utilizados	17
2.2.2.a Cepas bacterianas	17
2.2.2.b Vectores utilizados	17

2.3 Métodos de cultivo y transformación _____	19
2.3.1 Cultivos bacterianos de <i>A. tumefaciens</i> EHA105 y GV3101 _____	19
2.3.2 Cultivo de <i>A. tumefaciens</i> para la transformación de tomate vr.	
Microtom y tabaco _____	20
2.3.3 Cultivo y transformación de tomate Microtom _____	21
2.3.3.1 Cultivo de tomate Microtom _____	21
2.3.3.2 Transformación de tomate Microtom _____	21
2.3.3.2.1 Transformación estable desde explantes de cotiledones _____	21
2.3.3.2.2 Transformación estable desde explantes de hojas _____	22
2.3.3.3 Transformación transitoria de frutos de tomate _____	23
2.3.4 Cultivo y transformación de tabaco _____	24
2.3.4.1 Cultivo de tabaco _____	24
2.3.4.2 Transformación estable de tabaco _____	25
2.3.4.3 Transformación transitoria de tabaco _____	26
2.4 Métodos de biología molecular _____	30
2.4.1 Extracción ARN _____	30
2.4.2 Electroforesis en geles de agarosa _____	31
2.4.3 Síntesis de ADNc (RT) _____	32
2.4.4 Extracción ADN genómico de tomate y tabaco _____	33
2.4.5 Amplificación por PCR _____	33

3. RESULTADOS	36
3.1 Transformación transitoria	36
3.1.1 Transformación transitoria de frutos de <i>S. lycopersicum</i>	36
3.1.2 Transformación transitoria de hojas de <i>N. tabacum</i>	38
3.2 Estandarización del cultivo <i>in vitro</i> desde explantes de hoja de <i>S. lycopersicum</i>	41
3.3 Transformación estable	42
3.3.1 Transformación estable de <i>S. lycopersicum</i> con los genes taubra, tau y bra.	42
3.3.2 Transformación estable de <i>N. tabacum</i> con las construcciones pGWB5-tau y pGWB5-bra	47
3.4 Expresión del transgen en plantas de <i>N. tabacum</i> transgénicas	49
4. DISCUSIÓN	51
5. CONCLUSIONES	60
REFERENCIAS	61

Índice de tablas

Tabla I: Medios para cultivo in vitro y organogénesis somática a partir de explantes de cotiledón de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate).....	27
Tabla II: Medios para cultivo in vitro y organogénesis somática a partir de explantes de Hoja de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate).....	28
Tabla III: Medios para cultivo in vitro de <i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)..	29
Tabla IV. Programas PCR	35

Índice de figuras

Figura 1: Taumatina	3
Figura 2: Brazeína	5
Figura 3. Construcciones	14
Figura 4: Expresión del transgen taubra, taumatina y brazeina en frutos de tomates transformados transitoriamente	37
Figura 5: Expresión del transgen taumatina y brazeina en hojas de tabaco agroinfiltradas	39
Figura 6: Expresión y localización de las proteínas dulces	40
Figura 7: Eficiencia de regeneración de tejido desde explantes de hoja de tomate	42
Figura 8: Regeneración de tejido desde explantes de cotiledón de <i>S. lycopersicum</i>	44
Figura 9: Regeneración de tejido desde explantes de hoja de <i>S. lycopersicum</i> transformadas con <i>A. tumefaciens</i>	45
Figura 10: Análisis molecular de líneas transgénicas de <i>S. lycopersicum</i>	46
Figura 11: Regeneración de tejido desde explantes de hoja de <i>N. tabacum</i> transformadas con <i>A. tumefaciens</i>	48
Figura 12: Análisis molecular de líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i> ..	49
Figura 13: Expresión del transgen en hojas de tabaco transgénicos	50

Lista de abreviaturas

- ADN : Ácido desoxirribonucleico
- ADNc : Ácido desoxirribonucleico complementario
- ADNg : Ácido desoxirribonucleico genómico
- NAA : Ácido 1-naftalenacético
- IBA : Ácido indol-3-butírico
- BAP : 6-bencil aminopurina
- IAA : Ácido indolacético
- CTAB : Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- D.O. : Densidad Óptica
- dNTP : Desoxinucleótido trifosfato
- mg : Miligramos
- L : Litro
- μM : Micromolar
- MS : Murashige y Skoog
- nm : Nanometro
- pb : Pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la polimerasa
- psy : Fitoeno sintasa
- tau : taumatina
- bra : brazeina
- μm : Micrometro
- wt : Silvestre

RESUMEN

Las proteínas dulces Taumatina (Tau) y Brazeina (Bra), son proteínas no tóxicas, las cuales son 2.000 a 3.000 veces más dulces que la sacarosa y 10 veces más dulces que la Stevia, pero con la ventaja de tener un sabor similar a la sacarosa. En la actualidad, se han utilizado como edulcorantes y potenciadores naturales del sabor en diferentes alimentos. Al igual que la Stevia, no aporta calorías y es un alimento apto para diabéticos. Por estas razones, la expresión de Tau y Bra, podría ser una estrategia útil para mejorar el sabor de frutos, haciéndolos más dulces, sin añadir calorías y carbohidratos. Además, también se ha descrito que estas proteínas son similares a proteínas con actividad anti patógenos (taumatina) o a péptidos antimicrobianos (brazeina) en plantas, lo que las hace también atractivas para ésta aplicación biotecnológica.

En el contexto de este trabajo y con el fin de expresar los genes tau y bra en frutos, se generaron los vectores pPG-taubra, pPG-tau, pPG-bra, 35SCaMV-tau y 35SCaMV-bra, tres con promotor fruto específico y dos con promotor constitutivo. En la presente memoria de título, se analizó la funcionalidad de los vectores a través de la transformación transitoria de frutos de tomate y hojas de tabaco. Se obtuvo que 4 de los 5 vectores son funcionales para expresar el transgen. Luego, se prosiguió con la transformación estable de tomate y tabaco, con dichos vectores de expresión. Durante esta memoria de título, se

estandarizó con éxito la transformación de tomate usando hojas como explantes y se comparó con la transformación estable a partir de explantes de cotiledón.

La correcta transformación y expresión de los transgenes tau y bra fue evaluada por PCR y RT-PCR, respectivamente en líneas de tomate y tabaco, se obtuvo 5 y 2 líneas de tomate transgénicas (por PCR) para taubra y bra, respectivamente. En tabaco se obtuvo 4 líneas transgénicas que expresan el transgen tau y 4 líneas transgénicas que expresan bra.

ABSTRACT

“Stable transformation of *Solanum lycoperscum* and *Nicotiana tabacum* with the genes of the sweet proteins Thaumatin and Brazzein.”

The sweet proteins Thaumatin (Tau) and Brazzein (Bra), are non-toxic proteins, of 2,000 to 3,000 fold sweeter than sucrose and 10 times sweeter than stevia but with the advantage of having a more similar flavor to sucrose. At present, they have been used as sweeteners and natural flavor enhancers in different foods. As proteins they do not provide calories and are suitable for diabetics. For these reasons, the expression of Tau and Bra could be a useful strategy to improve fruit flavor, making it sweeter, without adding calories and carbohydrates. In addition, these proteins are similar to proteins with anti-pathogenic activity (thaumatin) or antimicrobial peptides (brazeine) in plants, which makes them also attractive for biotechnological applications in this field.

In the context of this work and in order to express the tau and bra genes, they were generated five expression vectors for these proteins, pPG-taubra, pPG-tau, pPG-bra, 35SCaMV-tau and 35SCaMV-bra, were generated. Three of them with a fruit specific promoter and two with a constitutive promoter. In the present thesis, the functionality of these vectors was achieved through the

transient transformation of tomato fruits and tobacco leaves. We obtained that four of the five vectors were functional permitting the expression of the transgene. Then, the stable transformation of tomato and tobacco was carried out to express the transgenes in fruits and leaves, respectively. During this thesis, tomato transformation using leaves as explants was successfully standardized and compared with stable transformation from cotyledon explants.

The correct transformation and expression of the tau and bra transgenes was evaluated by PCR and RT-PCR, respectively. In conclusion five and two transgenic tomato plants for the fusion protein taubra and bra were obtained (by PCR). Also, four transgenic tobacco lines each, for tau and bra which express the transgene (by RT-PCR), were obtained.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Proteínas dulces

Las proteínas dulces, son aquellas proteínas que al ser ingeridas por primates superiores (incluyendo al humano), son percibidas con un sabor dulce, a través del sentido del gusto (Menco et al., 1993). Dentro de este grupo de proteínas las más estudiadas son: taumatina, brazeina, monelina, mabinlina, pentadina, curculina y miraculina. La mayoría de estas proteínas presentan una estructura cuaternaria de hetero u homo dímeros o tetrámeros. Destacándose así, las proteínas taumatina y brazeina, las cuales presentan una estructura monomérica (Caldwell et al., 1998; de Vos et al., 1985). Al ser monómeros, tienen la ventaja de poder ser expresadas de manera heteróloga más fácilmente, ya que no deben ensamblarse entre sí, con uno o más monómeros, iguales o diferentes, dejando afuera la posibilidad de un mal ensamblaje, lo cual podría conllevar a la pérdida de su función, como en este caso ser dulces.

1.1.1 Taumatina

La taumatina es una proteína proveniente de los arilos del katemfe (*Thaumatococcus danielli*), el cual es un arbusto de África occidental. La estructura de la taumatina (fig. 1) está compuesta principalmente por hojas β y un pequeño "loop" que es estabilizado por 8 puentes disulfuros. Además, posee 207 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 22,2 kDa (de Vos et al.,

1985; Ogata et al., 1992). En cuanto al dulzor la taumatina es la segunda más dulce después de la monelina, siendo 3.000 veces más dulce que la sacarosa, en base al peso, es decir, 1 gramo de taumatina es 3.000 veces más dulce que 1 gramo de sacarosa (Ogata et al.,1987).

Por otro lado, la taumatina no sólo es una proteína dulce, si no que posee gran similitud con las proteínas relacionadas a patógenos (PR), las cuales, tal como dice su nombre, son proteínas involucradas en el sistema de defensa contra patógenos en plantas. La taumatina específicamente posee similitud con las proteínas PR-5 o también conocidas como proteínas tipo taumatina (TLP), las cuales se asemejan en su peso molecular, poseen aproximadamente 54 residuos de aminoácidos idénticos y un alto contenido de cisteína (Pierpoint et al., 1987). Las TLP son inducidas frente al estrés biótico y abiótico, debido a que poseen actividad anti fúngica (Vigers et al., 1992; Wang et al., 2010) y también la capacidad de adaptar las células de la planta ante la presencia de estrés osmótico o estrés hídrico (Singh et al., 1987). Cabe destacar que, al contrario de la taumatina, las proteínas TLP, no reaccionan frente a los anticuerpos anti taumatina ni poseen la capacidad de ser percibidas como proteínas dulces

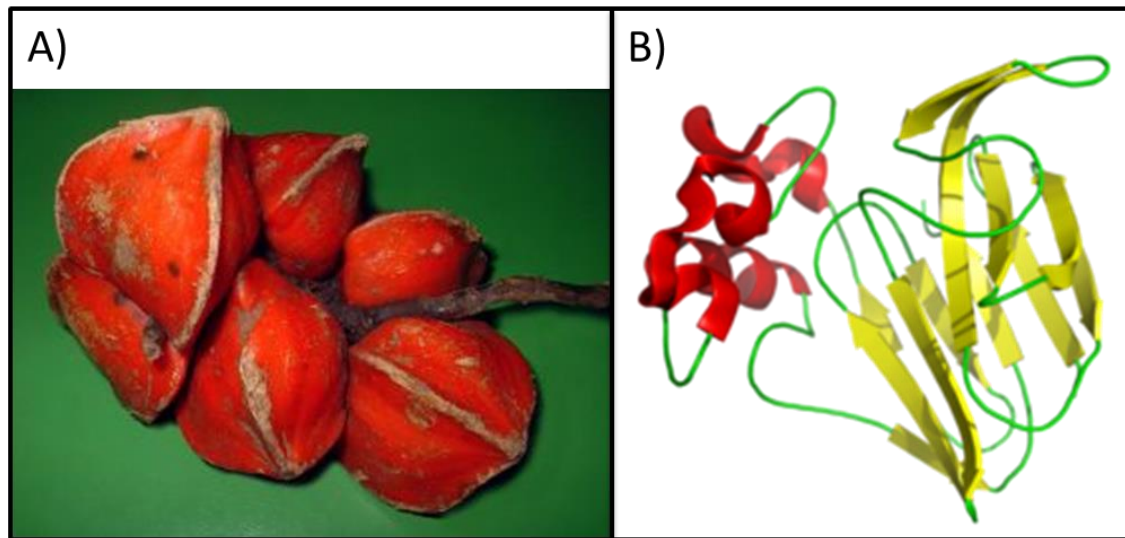


Figura 1: **Taumatina**. A) Baya africana katemfe; *Thaumatococcus daniellii*. B) Estructura de la proteína Taumatina. PDB: 1RQW. En rojo "loop" estabilizado por 8 puentes disulfuros, en amarillo estructura en hoja β .

1.1.2 Brazeína

La brazeína es una proteína proveniente de la baya africana *Pentadiplandra brazzeana*, es la proteína más pequeña de esta familia de proteínas dulces; es un monómero de un peso molecular de 6,5 kDa y 54 residuos de amino ácidos (Caldwell et al., 1998). Además, es la única de las proteínas dulces mantiene su estructura (fig. 2) de forma estable cuando es calentada a 98°C por un tiempo de 2 horas. También tiene una estabilidad estructural en un rango de pH desde 2,5 a 8,0 debido a la presencia de cuatro puentes disulfuros presentes en su estructura (Caldwell et al., 1998). En cuanto al dulzor de la proteína brazeína es 2.000 veces más dulce que la sacarosa en base al peso (Caldwell et al., 1998;

Nagata et al., 2013). Todas estas características hacen de esta proteína una excelente candidata para ser expresada en frutos para mejorar su sabor, aumentando su dulzor.

Por otro lado, la brazeina podría tener una función de péptido antimicrobiano, ya que posee un motivo en su estructura llamado “ γ -Loop”, el cual fue identificado en las proteínas conocidas como defensinas, las cuales presentan función antimicrobiana contra bacterias y hongos (Dias et al., 2015). Esto se sostiene, ya que la brazeina posee otro motivo en su estructura, conocido como motivo de alfa-beta estabilizado por cisteína o “ $CS\alpha\beta$ ”, el cual es una combinación de la estructura secundaria de α -hélice con hoja- β que está estabilizado por cuatro puentes disulfuro formado entre ocho cisteínas. En contraste con otras proteínas de este tipo, la brazeina posee una estructura de α -hélice adicional (Nagata et al., 2013). El motivo “ $CS\alpha\beta$ ” es comúnmente relacionado como el pliegue de los pequeños péptidos o proteínas que poseen actividad antibacteriana en animales y contra hongos en plantas, como es el caso actual (Dias et al., 2015).

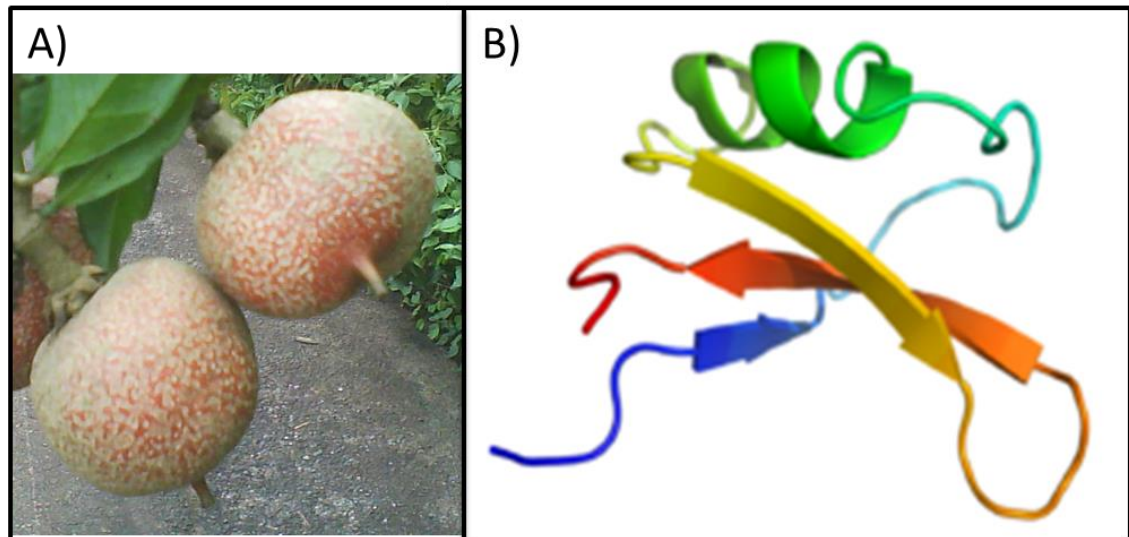


Figura 2: **Brazeína**. A) Baya africana: *Pentadiplandra brazzeana*. B) Estructura de la proteína brazeína. PDB: 2BRZ. En verde estructura α -hélice, en amarillo, naranja y azul estructura de hoja β .

1.1.3 Señalización proteínas dulces

El mecanismo por el cual estas proteínas se sienten dulces aún no está completamente descrito, pero se conoce que la familia de receptores T1 (T1R) es la que se encarga de detectar el sabor dulce en los mamíferos. Las moléculas sabrosas o estimulantes del gusto son reconocidas por los receptores T1R que están acoplados a proteína G (Hoon et al., 1999). Es importante destacar que estos receptores actúan de diferentes formas, según el tipo de molécula “dulce” con el que interactúan, ya que en presencia de azúcares como la sacarosa se activa la adenilato ciclasa, provocando un aumento en el AMPc y consumo de ión Ca^{+2} . Por otra parte, cuando esta familia de receptores interactúa con edulcorantes artificiales como la sacarina, la

respuesta del receptor acoplado a proteína G cambia, activándose la fosfolipasa C y ésto provoca el aumento de los niveles de IP3 y la liberación del ión Ca^{+2} (Bernhardt et al., 1996).

Las proteínas dulces son reconocidas por los T1R2-T1R3, pertenecientes a esta misma familia de T1R (Li et al., 2002). Es factible que el reconocimiento de estas proteínas dulces con los receptores sea a través de la estructura que se conoce como “*sweet fingers*” o dedos dulces en español. Sin embargo, esta unión no es capaz de explicar el por qué las proteínas dulces son miles de veces más dulces que los edulcorantes de baja masa molecular (Spadaccini et al., 2003). Por ello, se han postulado otras hipótesis sobre cómo interactúan estas proteínas con sus receptores, *ergo* es factible que, las proteínas dulces interactúan con un sitio secundario de unión en la superficie del receptor, conocido como un “macro modelo” (Temussi et al., 2002). También se ha postulado un “micro modelo” en donde residuos claves que se encuentran en el sitio activo del receptor se unen a residuos de las proteínas dulces (Morini et al., 2005).

El receptor humano T1R3, posee un sitio rico en cisteína de este receptor, es muy necesario para la interacción con la proteína dulce taumatina (Ohta et al., 2011). Además, se conoce que existen otros 5 residuos de aminoácidos en

este sitio rico en cisteína del receptor T1R3, que son críticos en la respuesta de dulzor frente a la proteína dulce taumatina (Masuda et al., 2013). Es por esto que la estructura y secuencia de las proteínas dulces está estrechamente relacionada con su capacidad de interactuar con los receptores de dulzor.

1.2 Mejoramiento genético y cultivo *in vitro*

1.2.1 Tomates *S. lycopersicum* var. Microtom

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza ampliamente utilizada tanto como alimento y como modelo vegetal en la investigación científica. Su importancia como recurso alimenticio se debe a su valor nutritivo, mientras que su facilidad de ser cultivada y un ciclo de vida corto lo posicionan como un buen modelo de estudio. Es por esto que el tomate ha sido sujeto de manipulación genética y utilizado como un modelo vegetal para el estudio de la expresión de proteínas, ya sea en la planta completa o en frutos (Kimura et al., 2008).

Particularmente, en el área de la investigación científica el tomate variedad Microtom posee ventajas respecto a los tomates de producción industrial. Dentro de las ventajas que presenta, está su capacidad de crecer en altas densidades de plantas (1.357 plantas por metro cuadrado), posee un ciclo de vida corto (70-90 días, desde la siembra hasta la obtención de frutos de tomate

maduros), posee un genoma diploide relativamente pequeño y bien conocido, de alrededor de 950 Mb y se puede auto-polinizar (Meissner et al., 1997).

Se ha descrito que para llevar a cabo el proceso de regeneración *in vitro* del tomate variedad Microtom, por medio de organogénesis somática, desde explantes, es necesario la utilización de un medio nutritivo base, denominado medio Murashige & Skoog (con vitaminas, myo-inositol y sacarosa añadido), suplementado con distintas hormonas, estas promueven el proceso de organogénesis somática. Se ha reportado que la combinación de hormonas para llevar a cabo el proceso de organogénesis somática en tomate es mediante la utilización de una auxinas y citoquininas (Park et al., 2003). Las auxinas influyen en ciertos aspectos de la planta, como es la división celular, la elongación y la diferenciación celular, provocando la aparición de raíces adventicias. Las citoquininas cumplen la función de promover la división celular de tejidos no meristemáticos, es decir, de tejidos que no poseen una división celular activa y se encuentran más bien diferenciadas. La función de las fitohormonas es concentración dependiente (Strnad et al., 2001; Teale et al., 2006).

En el caso de los explantes de hoja, se ha usado una combinación entre las hormonas ácido indol-3-butírico (IBA, auxina) y 6-bencil aminopurina (BAP, citoquinina) para inducir el proceso de organogénesis (Park et al., 2003). Para inducir el proceso de organogénesis, a partir de tejido de cotiledones, se ha descrito la utilización de BAP, la cual es una citoquinina (Pino et al., 2010).

La transformación genética del tomate, mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, posee una eficiencia de hasta un 80% de plantas transgénicas verificadas por PCR a partir de explantes de cotiledón (Meissner et al., 1997) y a una eficiencia de un 40% - 60% de plantas transgénicas verificadas por PCR a partir de explantes de hoja, también en transformaciones mediadas por *A. tumefaciens* (Sun et al., 2006). Por lo tanto, sumando las características relacionadas a un ciclo de vida corto, un genoma conocido, una buena eficiencia de transformación para el estudio de plantas transgénicas y los reportes de la expresión de proteínas dulces en plantas y frutos de tomates, es que esta planta se presenta como un excelente modelo para el estudio de la expresión de las proteínas de interés de esta memoria de título de forma fruto-específica.

1.2.2 Tabacos

El tabaco (*Nicotiana tabacum*) ha sido ampliamente utilizada como modelo para la investigación básica e ingeniería genética de células vegetales. Es una planta fácil de manipular *in vitro*, de fácil regeneración y organogénesis somática desde explantes de hoja (Fisher et al., 1995). Es una planta con un genoma ampliamente caracterizado, anfiploide o tetraploide, ya que contiene un conjunto diploide de cada especie parental, ($2n=4x=48$) (Renny-Byfield et al., 2011; Zimmerman et al., 1977). Las plantas de tabaco también se puede auto-polinizar, para obtener líneas transgénicas homocigotas y finalmente se puede transformar con una eficiencia de hasta un 40 – 60% a partir de explantes de hoja, en transformaciones mediadas por *A. tumefaciens* (Burow et al., 1990; Fisher et al., 1995).

El cultivo *in vitro* de tabaco, la regeneración de tejido y la transformación mediante *A. tumefaciens* a partir de explantes de hoja, se encuentran descritos y estandarizados desde los años 80. Para ello, se utiliza un medio base (macro y micronutrientes), suplementado con vitaminas, mio-inositol y sacarosa además de hormonas para la inducción de brotes. Para ello, se suplementa el medio base con la citoquinina BAP y la auxina IBA, que en las concentraciones adecuadas inducen la formación de brotes a partir de explantes de hoja de tabaco (Horsch et al., 1985; Klee et al., 1987).

Por lo tanto, sumando las características relacionadas a un genoma conocido, una buena eficiencia de transformación para el estudio de plantas transgénicas y su fácil manipulación en cultivos *in vitro*, es que esta planta se presenta como un excelente modelo para el estudio de la expresión de las proteínas dulces y también conocer la localización de éstas.

1.3 Expresión de la proteína taumatina y brazeina en modelos vegetales.

En base a los antecedentes planteados se ha desarrollado el proyecto: “Sweet kiwi: plántulas de kiwi para la producción de un endulzante natural y frutos más dulces bajos en calorías”, VIU Fondef N° 14E049, en el cual se enmarca esta memoria de título. La producción de frutos de kiwi más dulces mediante el uso de ingeniería genética busca la generación de variedades de frutos más dulces sin adicionar calorías. Además, la purificación de las proteínas desde plantas modelo que expresen estas proteínas dulces se presenta también como una buena alternativa para la purificación de las proteínas y su uso comercial.

Como objetivo del proyecto VIU Fondef N° 14E049 y también de esta memoria de título, se propone obtener plantas transgénicas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), dado que la obtención de frutos de kiwi demora aproximadamente de 3 a 5 años. Es así

como se podrá determinar en menor tiempo si la expresión de estas proteínas es viable en frutos y hojas respectivamente. Para abordar este objetivo, se usará un sistema bicistrónico en el cual ambos genes, el de la taumatina y brazeína, se expresan bajo el mismo promotor, simultáneamente y en igual proporción. Para ello, entre la secuencia codificante de ambos genes se incluyó la secuencia del péptido 2A de aproximadamente 20 aminoácidos. Este péptido se basa en el sistema viral 2A, el cual ha demostrado ser un sistema más eficiente que los usados comúnmente en la co-expresión de 2 proteínas simultáneamente (Ha et al., 2010). El clivaje de este péptido es co-traducciona, es decir, que al momento en que se traduce este ARNm en el ribosoma ocurre la separación de las proteínas mediante la prevención de la formación de un enlace peptídico normal entre la glicina y prolina que se encuentran en el extremo C-terminal de este péptido 2A, lo que resulta en un salto del ribosoma al siguiente codón , y el péptido naciente se escinde entre la Gly y Pro, quedando la glicina unido al C-terminal de la proteína río arriba del transcrito, y el residuo de prolina unido al N-terminal de la proteína río abajo del transcrito (Donnelly et al., 2001).

En el Centro de Biología Molecular Vegetal, se cuentan con cinco vectores para realizar esta memoria, de los cuales, tres son para la transformación transitoria y estable de tomate (y que serán usados también para kiwi en un futuro) y los restantes para la transformación transitoria y estable de tabaco (fig. 3). Los vectores dirigidos a la transformación transitoria y estable de tomate poseen un promotor fruto-específico, el cual es el promotor del gen de la poligalacturonidasa de kiwi (pPG) (Wang et al., 2000). En cambio, los vectores dirigidos a la transformación transitoria y estable de tabaco poseen el promotor constitutivo y fuerte 35SCaMV y un gen reportero GFP, con el cual se genera una proteína de fusión TAU::GFP y BRA::GFP.

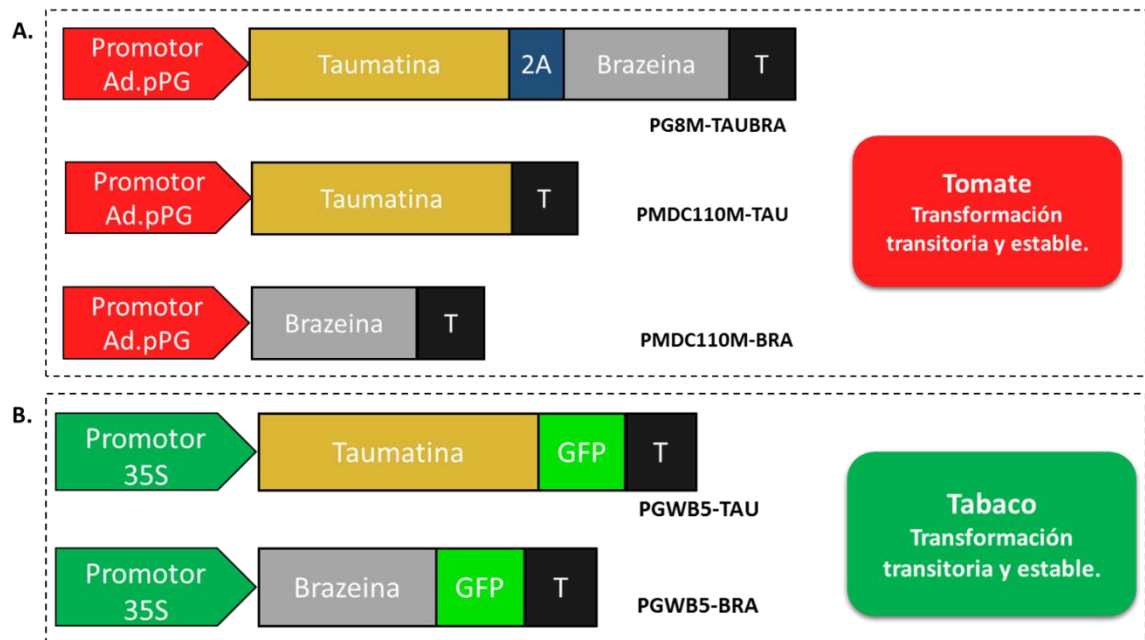


Figura 3. **Construcciones.** A) Se muestran las construcciones que poseen promotor fruto-específico para la transformación transitoria y estable de tomate. B) Se muestran los vectores con promotor 35SCaMV y gen reportero GFP, dirigidos a la transformación transitoria y estable de tabaco.

OBJETIVOS

Objetivo general

Transformar plantas de tomate y tabaco, con el transgen de las proteínas dulces taumatina y brazeina y analizar molecularmente las plantas obtenidas.

Objetivos específicos

1. Evaluar la funcionalidad de las construcciones que expresan las proteínas dulces taumatina y brazeina mediante transformación transitoria en frutos de tomate y hojas de tabaco.

2. Transformar y obtener plantas transgénicas de tomate y tabaco para los genes de las proteínas dulces taumatina y brazeina.

3. Evaluar molecularmente la expresión del transgen a nivel transcripcional en plantas de tabaco transgénicas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Reactivos

Los reactivos utilizados se adquirieron según las técnicas de biología molecular requeridas y fueron escogidas de acuerdo a los estándares de calidad necesarios. Estos productos fueron obtenidos de empresas y marcas registradas como Invitrogen, Agilent Technologies, Fermentas, Promega, Axygen, New England Biolabs, Biorad, Merck, US Biological, MO BIO Laboratories Inc., Sigma-Aldrich y Phyto Technology Laboratories.

2.2 Material biológico

2.2.1 Materia vegetal

Se utilizaron semillas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Microtom, con las que se contaban en el laboratorio. Estas fueron sembradas en condiciones de invernadero e *in vitro* en el Centro de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, para luego ser usados como material vegetal para la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 (Rif.^R).

También se utilizaron semillas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi NN), con las que se contaban en el laboratorio, las cuales se

sembraron en condiciones de invernadero e *in vitro*, para ser usadas en la transformación mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 (Rif^R, Gen^R).

2.2.2 Cepas bacterianas y vectores utilizados

2.2.2.a Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas fueron células de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Rif^R) y GV3101 (Rif^R, Gen^R), ya transformadas con los vectores que poseen los genes de interés.

2.2.2.b Vectores utilizados

Los vectores utilizados en este proyecto fueron diseñados y construidos por el equipo de trabajo del proyecto VIU Fondef N° 14E049.

- **pGWB8M-taubra.** Esta construcción proviene del vector PGWB8 el cual se encuentra modificado, debido a que se eliminó toda la región de recombinación Gateway, para insertarse la construcción pPG::Taubra. Posee un promotor fruto específico, correspondiente al promotor del gen que codifica para la enzima poligalacturonidasa del kiwi (pPG) (Wang et al., 2000). También tiene un sistema bicistrónico, en donde se encuentran los

genes de taumatina y brazeina, separados por la secuencia del péptido 2A (Ha *et al.*, 2010). Este vector confiere resistencia a higromicina y kanamicina en plantas.

- **pMDC110M-tau.** Esta construcción posee el gen para taumatina, bajo el promotor fruto específico de kiwi pPG. La construcción se encuentra inserta en el vector pMDC110, el cual fue modificado y no posee en el extremo 3' la secuencia del gen reportero GFP. Este vector también confiere resistencia a higromicina y kanamicina en plantas.
- **pMDC110M-bra.** Esta construcción es similar a la anterior. La diferencia radica solamente en que ésta posee el gen para la proteína brazeina.
- **pGWB5-tau.** Esta construcción posee el gen para la proteína taumatina, se encuentra inserto en el vector pGWB5, el cual posee el promotor 35CaMV de expresión constitutiva para plantas, y fusionado en el extremo 3' al gen que codifica para GFP. Confiere también resistencia a kanamicina e higromicina en plantas.
- **pGWB5-bra.** Esta construcción es similar a la anterior, pero posee el gen de la proteína brazeina.

Se utilizaron las construcciones pG8M-taubra, pMDC110M-tau y pMDC110M-bra insertas en *A. tumefaciens* EHA105 (Rif^R) para transformar plantas de tomates (*Solanum lycopersicum*) variedad Micro-tom y las construcciones pGWB5-tau y pGWB5-bra insertas en *A. tumefaciens* GV3101 para transformar plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

2.3 Métodos de cultivo y transformación

2.3.1 Cultivos bacterianos de *A. tumefaciens* EHA105 y GV3101

Para generar los cultivos de *A. tumefaciens* EHA105, se cultivaron estas bacterias en medio LB líquido (Tryptona 1% p/v, NaCl 0.8% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v) suplementado con rifampicina 10 mg/L (antibiótico que permite la selección cromosómica en esta cepa), más el antibiótico de selección del plásmido de interés (kanamicina), durante 20 horas a 28°C.

Para los cultivos de *A. tumefaciens* GV3101, se utilizó medio LB líquido suplementado con rifampicina 10 mg/L y gentamicina 50 mg/L, más el antibiótico de selección del plásmido de interés (kanamicina), durante 20 horas a 28°C.

Ambas cepas bacterianas se alicuotaron para su almacenamiento a -80°C, en una mezcla de 800 µL de cada cultivo con 200 µL de glicerol 85% estéril.

2.3.2 Cultivo de *A. tumefaciens* para la transformación de tomate vr.

Microtom y tabaco

Se dejó creciendo *A. tumefaciens* EHA105 y GV3101 transformada con los vectores de interés en medio LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes, en agitación constante a 28°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,2-0,4. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 2000xg durante 15 minutos y el sedimento obtenido se resuspendió en medio MS líquido suplementado con Acetosiringona 100 µM [Medio Murashige & Skoog Basal Medium with vitamins (PhytoTechnology Laboratories®) más sacarosa 2%]. Finalmente, se midió nuevamente la D.O.₆₀₀ para corroborar que ésta se mantuviera en los parámetros deseados.

2.3.3 Cultivo y transformación de tomate Microtom

2.3.3.1 Cultivo de tomate Microtom

Para el cultivo *in vitro* de tomate Microtom, se esterilizan semillas de esta variedad superficialmente durante 15 minutos mediante la agitación en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% más 2-4 gotas de Tween 20. Se realizaron 4-5 lavados con agua estéril y se secaron las semillas sobre papel absorbente estéril. Luego, las semillas se sembraron sobre medio de germinación (Tabla I) y se incubaron en una cámara de cultivo a fotoperiodo de 16 horas luz a 25°C. Las plántulas obtenidas por este medio fueron utilizadas como material vegetal para las transformaciones.

2.3.3.2 Transformación de tomate Microtom

2.3.3.2.1 Transformación estable desde explantes de cotiledones

El protocolo de transformación y organogénesis de tomate Microtom fue modificado a partir de Pino et al., (2010), el cual fue estandarizado previamente en el Centro de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (CBMV). El contenido de los medios de cultivo se detalla en la Tabla I. El protocolo indica que se colectan los cotiledones de plántulas de 8 – 10 días de edad desde su germinación, crecidas *in vitro*. Para ello, se remueven los extremos distal y proximal y se cortan de forma transversal a la

nervadura del cotiledón, obteniéndose finalmente dos explantes desde un cotiledón. Estos explantes son depositados en una solución de *A. tumefaciens* transformadas con el gen de interés (sección 2.3.2) durante 15 – 20 minutos, luego se traspasaron a medio de co-cultivo-C (Tabla I) y se mantuvieron durante dos días en oscuridad a 25°C en la cámara de cultivo. Posterior a los 2 días de incubación en medio de co-cultivo, los explantes transformados se lavaron 3 – 5 veces con agua estéril más 1 -2 lavados con medio MS líquido (medio MS con vitaminas sin sacarosa), con el objetivo de eliminar el exceso de *A. tumefaciens*. Posteriormente secados sobre papel absorbente estéril. Los explantes lavados son depositados en el primer medio, que induce la formación de callos o MI-C (Tabla I), con su cara abaxial en contacto con el medio, hasta la aparición de brotes a partir de los callos desarrollados por los explantes, lo cual sucede generalmente a partir del segundo mes de cultivo. Los callos que desarrollaron brotes son transferidos a un medio de elongación de brotes o MII-C (Tabla I), el cual no contiene hormonas, hasta que los brotes midan 3 cm aproximadamente y por lo menos tengan 4 hojas. Se cortaron brotes con estas características del callo para luego ser traspasados a medio de Enraizamiento o MIII-C (Tabla I).

2.3.3.2.2 Transformación estable desde explantes de hojas

El protocolo de transformación y organogénesis somática de tomate Microtom fue modificado a partir de Cruz-mendivil et al., (2011), y estandarizado

bajo las condiciones de trabajo en el CBMV. El contenido de los medios de cultivo se detalla en la tabla II. Primero se colectaron las hojas de plántulas de tomate de 15 - 20 días de edad crecidas *in vitro* y cortadas en trozos de 1 cm² aproximadamente. Los explantes fueron tratados al igual que en la sección 2.3.3.2.1, con la diferencia que se usaron los medios de la tabla II, es decir, los medios de co-cultivo-H, MI-H, MII-H y MIII-H. Se utilizó como control positivo del proceso de regeneración, explantes de hojas sin transformar tratadas con los mismos medios de cultivo, pero sin el agente de selección (higromicina).

2.3.3.3 Transformación transitoria de frutos de tomate

En el protocolo de transformación transitoria de frutos de tomate, se utilizaron tomates hidropónicos comerciales, en un estadio de baja madurez, en donde el epicarpio presenta una coloración verde-rojiza. Los tomates fueron transformados con una solución de *A. tumefaciens* que porta el gen de interés (sección 2.3.2), mediante la técnica de agro-infiltración (Kopertekh et al., 2005). Para este procedimiento se infiltró la solución de *A. tumefaciens* mediante una jeringa de 1 mL cuyo extremo, provisto de aguja, fue incorporado en la zona del mesocarpio y endocarpio carnoso del tomate, aplicando simultáneamente una presión leve y sostenida en la región de origen de la infiltración. La intensificación del color rojo-verde del epicarpio fue indicativo de una agro-infiltración exitosa.

Cada tomate utilizado fue identificado y rotulado adecuadamente. Se realizaron tres infiltraciones (tres réplicas técnicas) por construcción. Además, estos fueron mantenidos en condiciones de oscuridad, en un ambiente entre 22/25°C. Para el análisis molecular, el tejido fue colectado luego de 3 a 4 días post-infiltración.

2.3.4 Cultivo y transformación de tabaco

2.3.4.1 Cultivo de tabaco

Para la obtención *in vitro* de plántulas de *Nicotiana tabacum* (tabaco), las semillas silvestres almacenadas en la colección de semillas del CBMV fueron esterilizadas de acuerdo al procedimiento descrito por Fisher et al., (1995). De acuerdo a este método, las semillas se esterilizaron superficialmente durante 20 minutos mediante agitación en una solución de cloro 10% v/v y Tween-20 0,1% v/v. Luego de cinco enjuagues con agua destilada estéril, se sembraron las semillas en frascos con medio de germinación de tabaco (tabla III) y luego se incubaron en una cámara de cultivo de 16 h luz a 25°C durante aproximadamente 3 semanas. Las plántulas obtenidas por este medio fueron utilizadas como material vegetal para las transformaciones y/o para su traspaso a cultivo en tierra.

2.3.4.2 Transformación estable de tabaco

El protocolo de transformación de tabaco fue modificado a partir de lo descrito por Horsch et al., (1985) y Klee et al., (1987), el cual fue estandarizado previamente en el CBMV. El contenido de los medios de cultivo utilizados está descrito en la tabla III.

Primero, las hojas completas de las plántulas de tabaco cultivadas *in vitro* de 4 semanas de edad aproximadamente, fueron colectadas en condiciones de esterilidad y fueron sumergidas en una solución de *A. tumefaciens* transformadas con el gen de interés (sección 2.3.2) durante 15 - 20 minutos. Posteriormente, los explantes se secaron en papel absorbente estéril y se cultivaron durante 3 días en medio de co-cultivo (Tala III), en oscuridad. Luego, los explantes se lavaron con agua destilada estéril suplementada con cefotaxime (300 mg/L) para eliminar remanentes de la suspensión de *A. tumefaciens* y se secaron con papel absorbente estéril. Así los explantes fueron depositados en el medio que induce la formación de callos o MI-T (Tabla III) durante 3 – 4 semanas. Transcurrido este tiempo, aquellos explantes donde se observó la aparición de brotes fueron separados y transferidos a medio MII-T (Tabla III), donde se mantuvieron por 2-4 semanas adicionales para promover la elongación y enraizamiento de los brotes. Luego, las plántulas enraizadas fueron trasplantadas a tierra (sección 2.3.4.1) y aclimatadas durante aproximadamente 2 semanas. La aclimatación consistió en la cobertura de la

planta con un capuchón de plástico transparente totalmente cerrado, al cual se le realizaron aberturas desde la primera semana hasta descubrir completamente al final la segunda semana.

2.3.4.3 Transformación transitoria de tabaco

En el protocolo de transformación transitoria de hojas de tabaco, se utilizaron plantas de tabaco adultas, de alrededor 12 semanas de edad, cultivadas en condiciones de invernadero (sección 2.3.4.1). También, se utilizó una solución de *A. tumefaciens* transformada con el gen de interés (sección 2.3.2). Cada hoja de la planta utilizada fue previamente asperjada con agua para facilitar la apertura estomática. La técnica de agro-infiltración (Kopertekh et al., 2005) se realizó utilizando una jeringa de 5 mL cuyo extremo, desprovisto de aguja, fue incorporado en la zona abaxial del tejido foliar aplicando simultáneamente una presión leve y sostenida en la región de origen de la infiltración. La intensificación del color verde de la hoja fue indicativo de una agro-infiltración exitosa.

Cada hoja utilizada fue identificada y rotulada adecuadamente. Se realizaron 3 infiltraciones por construcción (réplicas técnicas). Las plantas utilizadas fueron mantenidas en condiciones de invernadero. El tejido fue colectado luego de 3 a 4 días post-infiltración.

Tabla I: Medios para cultivo *in vitro* y organogénesis somática a partir de explantes de cotiledón de *Solanum lycopersicum* (tomate). MS: Medio sólido Murashige &Skoog; NAA: ácido 1-naftalenacético, BAP: 6-bencil aminopurina; IBA: ácido indol-2-butírico; Acetosiringona: para promover la infección del *A. tumefaciens* a los explantes de cotiledón; higromicina, como agente de selección y timentin, como antibiótico para controlar el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Cultivo <i>in vitro</i> (Cotiledón) <i>S. lycopersicum</i>	Acetosiringona	NAA	BAP	IBA	Timentin	Higromicina
Medio germinación (MS 1x; Sacarosa 1,5%)	-	-	-	-	-	-
Co-Cultivo-C (MS 1x; Sacarosa 3%)	100 µM	0,4 µM	-	-	-	-
MI-C (MS 1x; Sacarosa 3%)	-	-	5 µM	-	450 mg/L	2 mg/L
MII-C (MS 1x; Sacarosa 1,5%)	-	-	-	-	450 mg/L	2 -5 mg/L
MIII-C (MS 0,5x; Sacarosa 1,5%)				0,5 mg/L	450 mg/L	5 mg/L

Tabla II: Medios para cultivo *in vitro* y organogénesis somática a partir de explantes de Hoja de *Solanum lycopersicum* (tomate). MS: Medio sólido Murashige &Skoog; NAA: ácido 1-naftalenacético, BAP: 6-bencil aminopurina; IBA: ácido indol-2-butírico; Acetosiringona: para promover la infección del *A. tumefaciens* a los explantes de hoja. Higromicina, como agente de selección y timentin, como antibiótico para controlar el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Cultivo <i>in vitro</i> (Hoja) <i>S. lycopersicum</i>	Acetosiringona	NAA	BAP	IBA	Timentin	Higromicina
Medio germinación (MS 1x; Sacarosa 1,5%)	-	-	-	-	-	-
Medio Co-Cultivo-H (MS 1x; Sacarosa 3%)	100 µM	0,1µM	2 mg/L	-	-	-
MI-H (MS 1x; Sacarosa 3%)	-	-	2 mg/L	0,1 mg/L	300 mg/L	5 mg/L
MII-H (MS 1x; Sacarosa 1,5%)	-	-	-	-	300 mg/L	5 mg/L
MIII-H (MS 0,5x; Sacarosa 1,5%)				0,5 mg/L	300 mg/L	5 mg/L

Tabla III: Medios para cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum* (tabaco). MS: Medio sólido Murashige & Skoog; BAP: 6-bencil aminopurina; IBA: ácido indol-2-butírico. Higromicina, como agente de selección y cefotaxime, como antibiótico para controlar el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Cultivo <i>in vitro</i> <i>N. tabacum</i>	BAP	IBA	Cefotaxime	Higromicina
Medio germinación (MS 1x; Sacarosa 1%)	-	-	-	-
Medio Co-Cultivo-T (MS 1x; Sacarosa 1%)	-	-	-	-
MI-T (MS 1x; Sacarosa 1%)	5 mg/L	1 mg/L	300 mg/L	10 mg/L
MII-T (MS 1x; Sacarosa 1%)	-	-	150 - 300 mg/L	10 - 15 mg/L

2.4 Métodos de biología molecular

2.4.1 Extracción ARN

El protocolo de extracción de ARN vegetal fue modificado a partir de Chang et al., (1993). Se utilizaron aproximadamente 150 mg de tejido vegetal, que se pulverizaron en morteros estériles, en presencia de nitrógeno líquido. Luego se agregó 1 mL tampón CTAB (cetil trimetil amonio 2%, polivinilpirrolidona al 2%, NaCl 2 M, EDTA 25 mM y Tris pH 8 100 mM) y 4 μ L de β -mercaptoetanol. Se traspasó el homogeneizado a un tubo Eppendorf de 2,0 mL, se mezcló vigorosamente durante 15 segundos en vórtex para posteriormente incubar la mezcla 10 minutos a 65°C. Se dejó enfriar, se agregó 1 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) frío y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, tras los cuales se centrifugó por 15 minutos a 12.000xg a 4°C. Se rescató la fase acuosa y se volvió a agregar 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) frío. Se agitó vigorosamente y se centrifugó 15 minutos a 12.000xg a 4°C. Concluida la centrifugación se rescató la fase acuosa y se precipitó el ARN con 0,5 volumen de LiCl 10 M frío y se incubó a 4°C durante toda la noche. Luego, se centrifugó durante 15 minutos a 12.000xg a 4°C y se lavó el precipitado obtenido con etanol 70% v/v en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Se agitó suavemente y se centrifugó durante 5 minutos a 7.500xg a 4°C. Finalmente el ARN se secó a temperatura ambiente y resuspendió en 20 μ L de agua tratada con DEPC.

La concentración y pureza de las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro (NanoVue™). Con el fin de determinar la integridad de las muestras de ARN extraído, se cargó 1 µg de ARN en geles de agarosa (sección 2.4.2).

2.4.2 Electroforesis en geles de agarosa

La integridad de los ácidos nucleicos extraídos fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 ó 2 %, dependiendo del tamaño esperado de las bandas. Se utilizó el tampón de corrida TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM), y un tampón de carga 6X para las muestras (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol, 15% glicerol) en la proporción 5:1. Para la migración electroforética se aplicaron entre 80 y 100 voltios (dependiendo del tamaño de la cámara de electroforesis) durante 45 minutos para separar moléculas de ADN y 70 voltios durante 20 minutos para ARN. Posteriormente, los geles de agarosa fueron teñidos durante 20 minutos en una solución de bromuro de etidio 20 mg/L, se visualizaron las bandas bajo luz UV en un transiluminador DarkRoom Multigenius Syngene® y se analizaron a través del programa Gene Snap® de Syngene®.

2.4.3 Síntesis de ADNc (RT)

Con el fin de sintetizar la hebra de ADN complementaria al ARN mensajero de tomate o tabaco, se prepararon reacciones de transcripción reversa (RT) utilizando la enzima RT Improm II (Promega). En primer lugar, se incubó el ARN con DNasa I con el propósito de eliminar remanentes de ADN genómico presentes en la muestra debido al proceso de extracción de ARN. Para esto en cada reacción se utilizaron entre 3 a 5 µg de ARN de alta pureza y se incubaron con 1 µL de DNasa I, 1 µL de Inhibidor de RNasa y 2 µL de tampón de la DNasa I, en agua libre de nucleasas en un volumen de reacción de 20 µL, durante 40 min, a 37°C en el termociclador. Luego, la reacción se detuvo agregando 1 µL de EDTA 50 mM e incubando a 65°C durante 10 minutos con el fin de inactivar la DNasa I.

Para la síntesis del ADNc, se incubaron 9 µL del RNA tratado con DNasa I con 1,5 µL de oligo AP 10 µM (5'-CGCCACGCGTCGACTAGTAC TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3') y 8,3 µL de una mezcla de RT en agua libre de nucleasas (0,5 µL de Inhibidor de RNasa, 1 µL de dNTPs 10 mM, 2,8 µL de MgCl₂ 25 mM, y 4 µL de tampón 5x de la RT Improm II en tubos de 0,2 mL durante 5 minutos a 70°C, en el programa de PCR "RT-PCR" (Tabla II). Luego, se detuvo la reacción y los tubos se incubaron durante 5 minutos en hielo, tras lo cual se le agregó a cada uno 1,2 µL de RT Improm II, y se continuó con el programa "RT-PCR" (Tabla IV). Finalmente se obtuvieron 20 µL finales de cada muestra de ADNc.

2.4.4 Extracción ADN genómico de tomate y tabaco

La extracción del ADN genómico de plantas se realizó siguiendo una modificación del método descrito inicialmente por Doyle & Doyle (1987). Aproximadamente 200 mg de tejido de hoja se pulverizaron en morteros en presencia de nitrógeno líquido y se les agregó 600 µL del tampón CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio al 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM y Tris 100 mM pH 8) precalentado a 60°C y 4 µL de β-mercaptoetanol. La mezcla se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL y se incubó con agitación ocasional durante 20 min. a 60°C. Luego se adicionó 400 µL de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. y la fase acuosa superior (donde se encuentra soluble el ADN) se precipitó con un volumen de isopropanol durante 10 min. a -80°C (o a -20°C durante 1 hora). Luego de una centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min. se obtuvo el precipitado de ADN, el cual fue lavado con etanol 75% (en agua libre de nucleasas), secado y resuspendido en 50 µL de agua libre de nucleasas. La integridad y pureza del DNA obtenido se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa. Su concentración se determinó mediante espectrofotometría (NanoVue™).

2.4.5 Amplificación por PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo para amplificar los genes estudiados en este trabajo desde el ADN genómico de la planta, y de este modo

verificar la presencia del inserto en las plantas transformadas. También se realizaron amplificaciones por PCR desde ADNc (RT-PCR). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en mezclas de 25 μ L en agua libre de nucleasas con 1 U de ADN polimerasa Taq, 1x del tampón de la Taq ADN polimerasa, $MgCl_2$ 2 mM (solo cuando fue requerido), dNTPs 200 μ M, 200 nM de partidor en sentido, 200 nM de partidor en antisentido y 1-2 μ L de DNA o ADNc. En todas las reacciones de PCR se realizó en paralelo una reacción de control negativo, carente de ADN, y cuando fue posible, se realizó también una reacción de control positivo, utilizando un ADN previamente verificado.

En el caso de las reacciones de PCR para la verificación de la correcta síntesis del ADNc, se incluyó un control para cada una de las reacciones. Este control consistió en realizar una reacción de PCR utilizando una cantidad equivalente de RNA proveniente desde el tratamiento con DNasa I, con el fin de asegurar la ausencia de ADN genómico en los ADNc sintetizados. Todos los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa. El programa general de PCR se detalla en la Tabla IV. La temperatura de apareamiento es específica para cada par de los partidores usados y se ajustó de acuerdo a la temperatura de disociación teórica de cada partidor. El tiempo de extensión depende a su vez del tamaño del fragmento a amplificar y se estima en 1 minuto por cada 1.000 pb a amplificar.

Tabla IV. Programas PCR

1. PCR

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturación Inicial	94	5min.	1
Desnaturación	94	40seg.	30-35
Apareamiento	Tm-5	40seg.	
Extensión	72	1min/kb	
Extensión Final	72	10min.	1

2. RT-PCR

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Incubación inicial	70	5min	1
Apareamiento	25	5min	1
Extensión	42	60min	1
Inactivación	70	15min	1

3. RESULTADOS

3.1 Transformación transitoria

3.1.1 Transformación transitoria de frutos de *S. lycopersicum*

La transformación transitoria de frutos de tomate se realizó mediante agroinfiltración con *A. tumefaciens* cepa EHA105 según la sección 2.3.3.3, con el fin de evaluar que los vectores expresan el transgen de taubra, taumatina y brazeina, para los vectores pG8M-taubra, pMDC110M-tau y pMDC110M-bra respectivamente. Para evaluar la expresión del transgen en frutos de tomates transformados transitoriamente, se infiltraron los frutos de tomate con *Agrobacterium tumefaciens*, con el transgen correspondiente (fig. 4a), en 3 réplicas biológicas para cada uno. Luego de 3 días se colectó y congeló el tejido infiltrado y se realizó la extracción de ARN (sección 2.4.1), obteniéndose un ARN en el cual se puede observar la presencia de 4 bandas, las que corresponden al ARN ribosomal principalmente (fig. 4b), comprobando que la calidad del ARN es adecuada, por lo cual se prosiguió con la síntesis de ADNc y finalmente con las reacciones de PCR (sección 2.4.3).

Se observa que los vectores con el transgen taubra (fig. 4c) y brazeina (fig. 4e) expresan el transgen, observándose amplicones del tamaño esperado y correspondiente para cada uno. Por el contrario, el transgen taumatina no se logró amplificar (fig. 4d), a pesar de que el ADNc sintetizado para todas las

muestras se encuentra en buenas condiciones, ya que se puede amplificar un gen endógeno como el gen de psy 1 de tomate. El amplicón para este gen en el tamaño esperado en todas las muestras (fig. 4f).

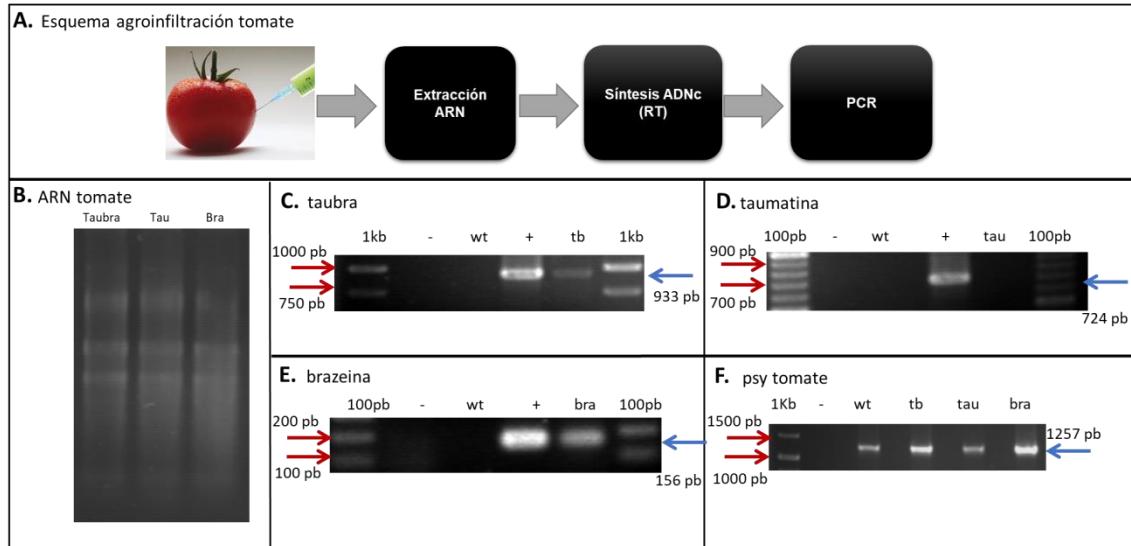


Figura 4: **Expresión de los transgenes taubra, taumatina y brazeina en frutos de tomates transformados transitoriamente.** A) Esquema de la agroinfiltración de frutos de tomate, en donde primero se infiltra el tomate con el *A. tumefaciens*, luego se extrae el ARN y finalmente se realiza la reacción de RT-PCR, para comprobar que el transgen se expresa. B) ARN de tomate en gel de agarosa 2% en TAE DEPC 1X. C) RT-PCR realizado a partir de ADNc extraído de frutos de tomates infiltrados para el transgen taubra (construcción que posee ambos genes, el de taumatina y brazeina). D) RT-PCR realizado a partir de ADNc extraído de frutos de tomates infiltrados para el transgen taumatina. E) RT-PCR realizado a partir de ADNc extraído de frutos de tomates infiltrados para el transgen brazeina. F) RT-PCR realizado a partir de ADNc extraído de frutos de tomates para el gen psy 1 de tomate. - : control negativo, agua; wt: control negativo ADNc de *S. lycopersicum*; + : control positivo DNA plasmidial del vector correspondiente; flechas rojas, tamaño bandas ladder; flechas azules, tamaño amplicon esperado. tb: taubra, tau: taumatina, bra: brazeina, wt: wild type.

3.1.2 Transformación transitoria de hojas de *N. tabacum*

La transformación transitoria de hojas de tabaco se realizó según se describe en la sección 2.3.4.3, con el fin de evaluar que los vectores pGWB5-tau y pGWB5-bra, donde los genes están dirigidos por el promotor 35SCaMV, expresan el transgen de taumatina y brazeina, respectivamente.

Para evaluar la expresión del transgen a nivel transcripcional en hojas de tabaco, se infiltraron las hojas en la zona abaxial con *A. tumefaciens* que contiene el vector con el transgen correspondiente, en 3 réplicas biológicas para cada uno (fig. 5a). Luego de 3 días se colectó y congeló el tejido infiltrado y se realizó la extracción de ARN (sección 2.4.1), obteniéndose un ARN de buena calidad (fig. 5b), el cual se encontraba íntegro, con un bajo nivel de degradación y un patrón de bandas adecuado. Por ello, se procedió a sintetizar el ADNc y finalmente se realizaron las reacciones de PCR correspondientes (RT-PCR, sección 2.4.3). De esta forma se comprobó que los vectores con el transgen taumatina (fig. 5c) y brazeina (fig. 5d) expresan el transgen, observándose el amplicón correspondiente al tamaño esperado para cada uno (fig. 5). Además, se evaluó la calidad del ADNc sintetizado, mediante la amplificación del gen *psy* endógeno de tabaco. En la figura fig. 5e se muestra el amplicón de 246 pb para este gen en el tamaño esperado en todas las muestras, indicando que ADNc se encuentra en buenas condiciones.

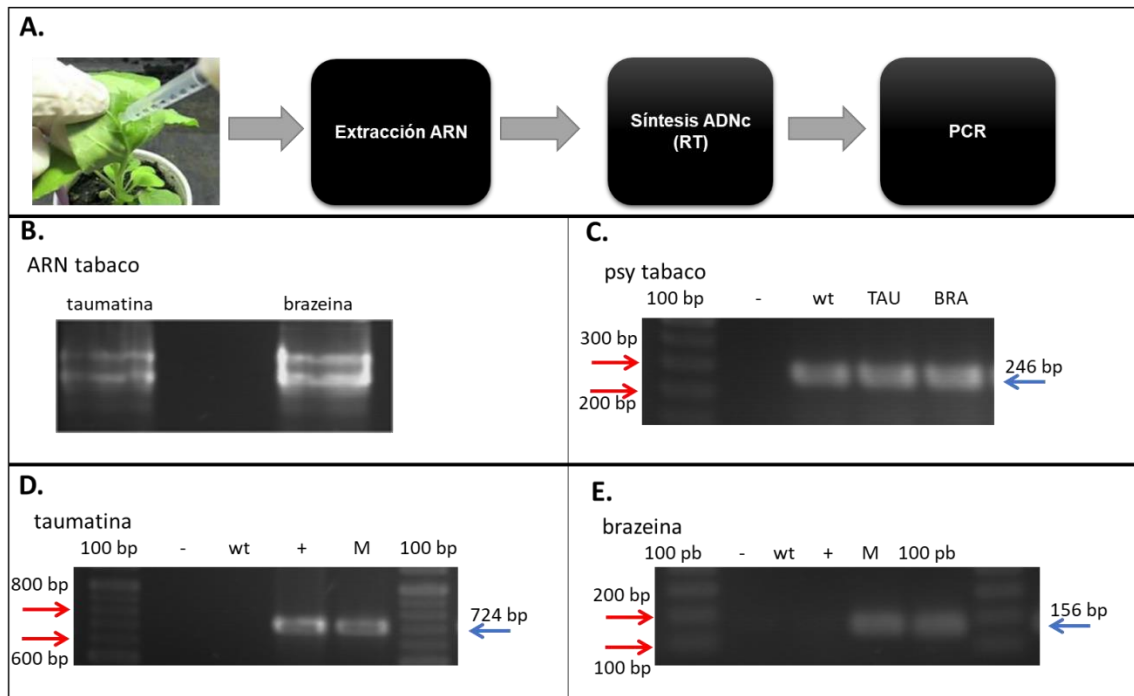


Figura 5: **Expresión de los transgenes taumatina y brazeina en hojas de tabaco agroinfiltradas.** (A) Esquema de la agroinfiltración de hojas de tabaco, en donde primero se infiltra la hoja con *A. tumefaciens*, luego se extrae el ARN y finalmente se realiza la reacción de RT-PCR, para comprobar que el transgen se expresa. (B) ARN de hojas de tabacos agroinfiltradas en gel de agarosa 2% en TAE DEPC 1X. (C) RT-PCR realizado a partir de ADNc extraído de hojas de tabacos infiltradas para el transgen taumatina. (D) RT-PCR realizado a partir de ADNc extraído de hojas de tabaco infiltradas para el transgen brazeina. (E) RT-PCR realizado a partir de ADNc extraído de hojas de tabaco para el gen psy 1 de tabaco. - : control negativo, agua; wt: control negativo ADNc de *S. lycopersicum*; + : control positivo DNA plasmidial del vector correspondiente; flechas rojas, tamaño bandas ladder; flechas azules, tamaño amplicón esperado para el gen correspondiente. tau: taumatina, bra: brazeina, wt: wild type.

Posteriormente se determinó la localización subcelular de estas proteínas dulces considerando que en las construcciones pGWB5-tua y pGWB5-bra cada gen se encuentra fusionado a GFP. Para ello, se transformaron transitoriamente hojas de tabaco mediante agroinfiltración como se indicó previamente. Luego de 3 días de infiltración, se tomaron las muestras y se visualizó en microscopio de epifluorescencia. Se observó la expresión de estas proteínas TAUMATINA

(TAU) y BRAZEINA (BRA), ya que se visualizó la emisión de la proteína fluorescente verde (GFP), para las hojas de tabaco transformadas con el transgen (fig. 6). Específicamente, se observó que la proteína dulce TAU se localiza en el citoplasma y BRA se localizó en el citoplasma y en el núcleo, al igual que lo hace GFP cuando no está unido a otra proteína.

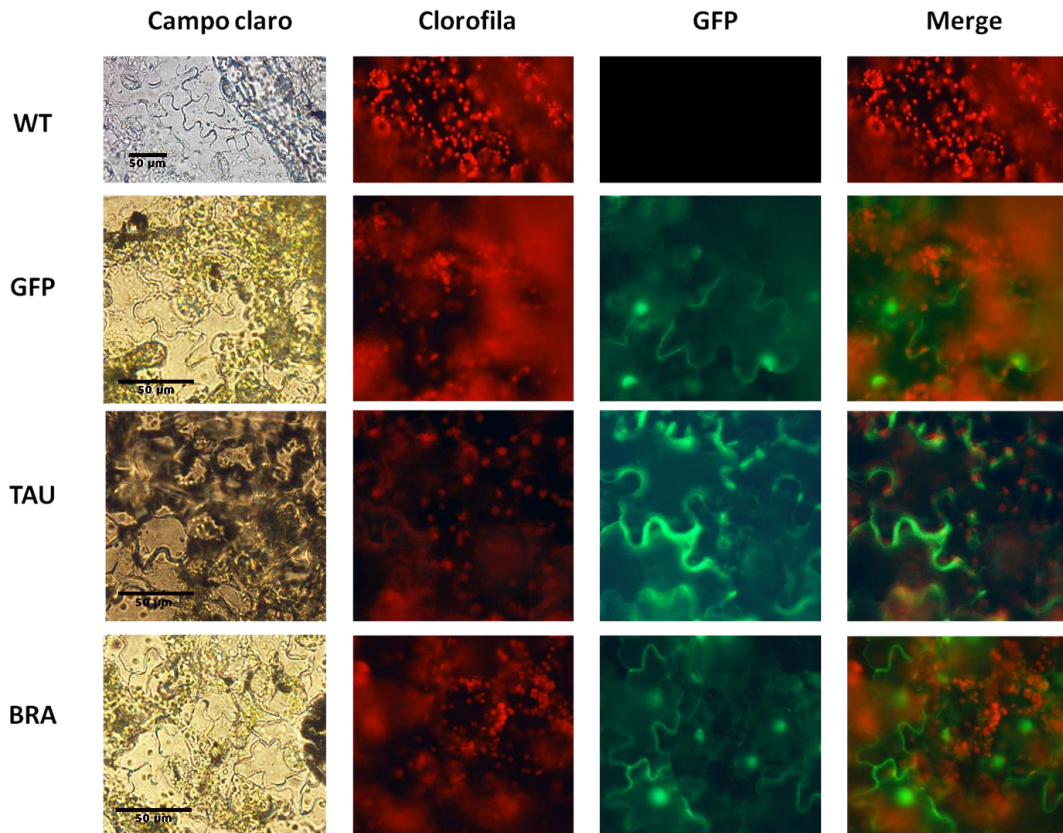


Figura 6: **Expresión y localización de las proteínas dulces.** En la primera columna, se observa el campo claro de cada muestra observada bajo microscopía de epifluorescencia. En la segunda columna se ve la emisión de luz de la clorofila a 573-648 nm. En la tercera columna se observa la emisión de luz de GFP a 510-555 nm y en la última columna se observa la superposición entre la emisión de la clorofila y GFP. Desde la primera fila hacia abajo se puede observar, WT: hojas de tabaco wild type infiltradas con medio MS-T líquido, GFP: hojas de tabaco infiltradas con vector pGWB5 vacío, que posee el transgen de gfp bajo el promotor 35SCaMV. TAU: hojas de tabaco infiltradas con el transgen taumatina y BRA: hojas de tabaco infiltradas con el transgen brazeina.

3.2 Estandarización del cultivo *in vitro* desde explantes de hoja de *S. lycopersicum*

El cultivo *in vitro* de explantes de hojas de tomate, se realizó según el protocolo descrito por Cruz-mendivil et al., (2011) y fue modificado para adaptarse a las condiciones de trabajo del CBMV. La modificación realizada fue reemplazar la hormona vegetal IAA por IBA, manteniéndose la concentración de ésta en 0,1 mg/L, y la concentración de BAP 2 mg/L indicada por el protocolo Cruz-mendivil et al., (2011).

Se realizó el cultivo *in vitro* de los explantes de hojas de tomate, según se describe en la sección 2.3.3.2.2, obteniendo inicialmente una eficiencia en la regeneración de tejido de 1,57 brotes por explante (fig. 7). En la primera etapa todos los explantes en el medio de co-cultivo-H engrosaron. Luego, en el medio de inducción de callos y brotes (medio MI-H), sólo un 77% de los explantes logró formar callo y a partir de esos, se obtuvieron brotes en donde cada callo presentaba un promedio de dos brotes, obteniéndose un porcentaje de formación de brotes de unos 15,7 brotes/10 explantes iniciales. Finalmente, en el medio MII-H y MIII-H, todos los brotes elongaron y enraizaron, por lo que la eficiencia final de la regeneración de tejido a partir de explantes de hoja de tomate fue de un 157%, lo cual quiere decir que se regeneran 1,57 plantas, en promedio, a partir de 1 explante de hoja de tomate, el cual corresponde a una porción de hoja menor a 1 cm².

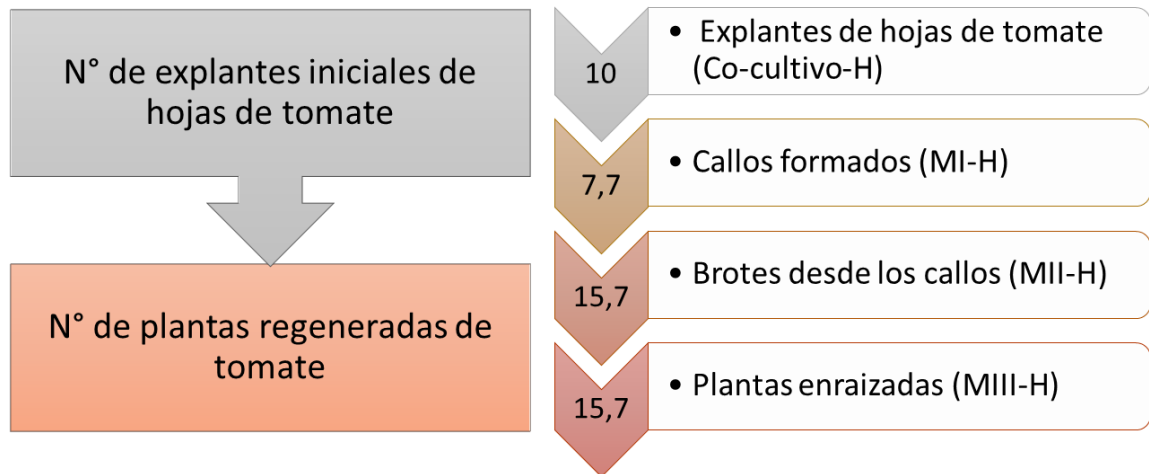


Figura 7: **Eficiencia de regeneración de tejido desde explantes de hoja de tomate.** Rendimiento y eficiencia de la organogénesis somática; los números corresponden a la cantidad de explantes, callos, brotes y plantas según corresponda. Se indican los medios de cultivo utilizados en cada etapa co-cultivo, MI-H, MII-H y MIII-H.

3.3 Transformación estable

3.3.1 Transformación estable de *S. lycopersicum* con los genes taubra, tau y bra.

Para la transformación de explantes de hoja *S. lycopersicum* mediante *A. tumefaciens*, se utilizó la cepa EHA105, previamente transformadas con los vectores correspondientes (2.2.2.b). La regeneración de plantas transformantes de tomate se realizó según se describe en la sección 2.3.3.2, en donde se utilizaron dos métodos de regeneración de tejido. El primero desde explantes de cotiledón (sección 2.3.3.2.1) y el segundo desde explantes de hoja (sección 2.3.3.2.2). En el caso de la organogénesis somática desde explantes de cotiledón no se obtuvieron plantas transgénicas, aunque este protocolo ha sido

utilizado exitosamente por otros integrantes en el laboratorio (fig. 8). La primera etapa de la regeneración de plantas transformantes de tomate a partir de explantes de cotiledón se inició con el medio de co-cultivo-C (suplementado con la hormona NAA) (fig. 8a). En esta etapa se aprecia un leve engrosamiento de los explantes de cotiledón post infección con *A. tumefaciens*. Luego estos explantes se transfirieron al medio de inducción de callos y brotes o medio MI-C, el cual utiliza sólo BAP. En este medio los explantes de cotiledón tardaron entre 6 – 10 semanas en la formación de callos con brotes (fig. 8b). Luego estos brotes se transfirieron al medio de elongación MII-C (fig. 8c), en el cual el brote formado crece hasta alcanzar aproximadamente 3 – 4 cm. Este proceso tardó 4 meses, para luego ser transferidos a la última etapa de enraizamiento, o medio MIII-C. Lamentablemente en esta última etapa no se obtuvieron plantas que desarrollaran raíz en este medio lo que es indicativo que no eran transgénicas (fig. 8d).

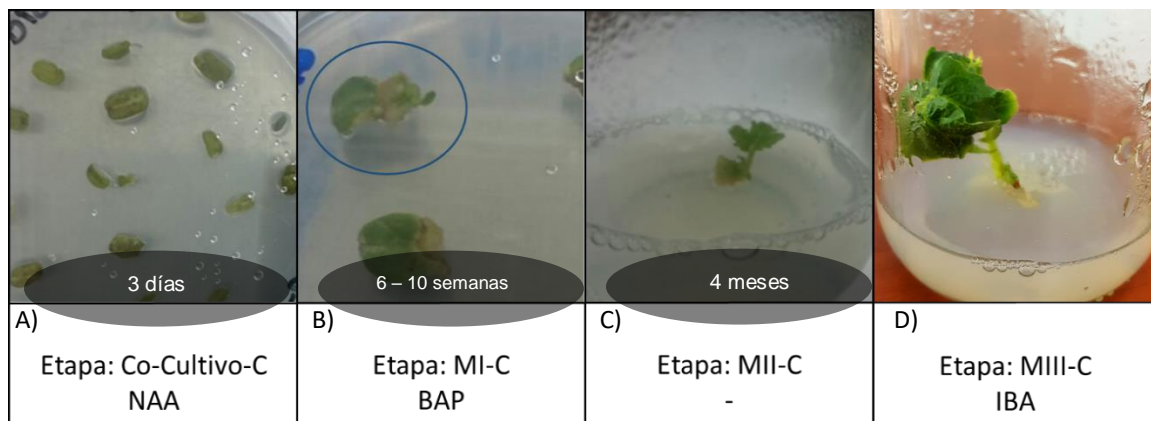


Figura 8: **Regeneración de tejido desde explantes de cotiledón de *S. lycopersicum***. A) Etapa de co-cultivo en medio MS-C suplementado con NAA, la cual tuvo una duración de 3 días y ocurre la infección de las células de los explantes por parte del *A. tumefaciens*. B) Etapa de inducción de callos y brotes en medio MS-C suplementado con BAP, la cual tuvo una duración de 6 – 10 semanas. C) Etapa de elongación de brotes de tomate, medio MS-C sin hormonas, esta etapa duró aproximadamente 4 meses. D) Etapa de enraizamiento de brotes elongados, medio MS-C suplementado con IBA; las plantas al no ser transgénica no enraizaron en este medio. Círculo azul indica el callo con brote formado; Todos los medios se encontraban suplementados con higromicina para seleccionar las plantas transformantes.

Para el caso de la transformación y organogénesis somática desde explantes de hoja de *S. lycopersicum*, la primera etapa de regeneración de tejido se realizó en el medio co-cultivo-H (fig. 9a), el cual se suplementó con una combinación hormonal de 0,1 μ M de NAA y 2 mg/L de BAP mientras eran infectados por 3 días con *A. tumefaciens*. Luego, se depositaron estos explantes en el medio de inducción de callos y brotes, o medio MI-H (fig. 9b), el cual fue suplementado con una combinación de hormonas 0,1 mg/L IBA/ 2 mg/L BAP. En esta etapa la aparición de callos con brotes tardó alrededor de 4 – 6 semanas. Luego los brotes formados se transfirieron a un medio de elongación de brotes o MII-H (fig. 9c), el cual se encuentra libre de hormonas. Los brotes tardaron 3 – 4 meses para alcanzar un tamaño de 3 – 4 cm para ser

transferidos al medio de enraizamiento o medio MIII-H (fig. 9d), en donde las posibles plantas transformantes enraizaron, en presencia de IBA y del agente de selección higromicina. Las plantas transformantes fueron seleccionadas en base a la capacidad de sobrevivir en medio MS-T, suplementados con 10 mg/L del antibiótico higromicina en el MI-H y MI-C.

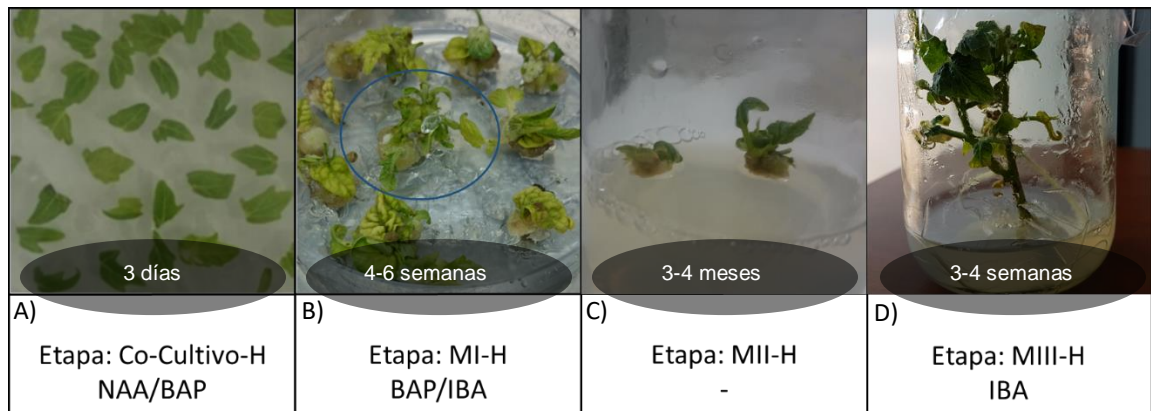


Figura 9: **Regeneración de tejido desde explantes de hoja de *S. lycopersicum* transformadas con *A. tumefaciens*.** A) Etapa de co-cultivo, la cual tuvo una duración de 3 días y ocurre la infección de las células de los explantes por parte de *A. tumefaciens*, medio MS-H suplementado con NAA/BAP. B) Etapa de inducción de callos y brotes, la cual tuvo una duración de 4 – 6 semanas, medio MS-H suplementado con IBA/BAP. C) Etapa de elongación de brotes de tomate, medio MS-H sin hormonas, esta etapa duró entre 3 - 4 meses. D) Etapa de enraizamiento de brotes elongados, medio MS-H suplementado con IBA. Se aprecia el desarrollo de raíces. El círculo azul indica el callo con brote formado; Todos los medios se encontraban suplementados con higromicina para seleccionar las plantas transformantes.

Una vez que las plantas se encontraban en el MIII-H, se analizó molecularmente un total de 20 plántulas transformadas con el transgen taubra, 2 con el transgen brazeina y una con el transgen taumatina. Cabe destacar que se cuenta con más plantas transformantes para el transgen taubra, pero no para brazeina y taumatina.

Se realizó la extracción de ADNg (sección 2.4.4) y posteriormente una PCR convencional para determinar la transgénesis en las plantas transformantes. En la fig.10, se muestran los resultados obtenidos de las PCR, en donde se obtuvieron 5 líneas transgénicas para el transgen taubra, denominadas tb1, tb2, tb3, tb4 y tb5 (fig. 10b), 2 líneas para el transgen brazeina, denominadas bra 1 y bra 2 (fig. 10c) y ninguna para el transgen taumatina (fig. 10d).

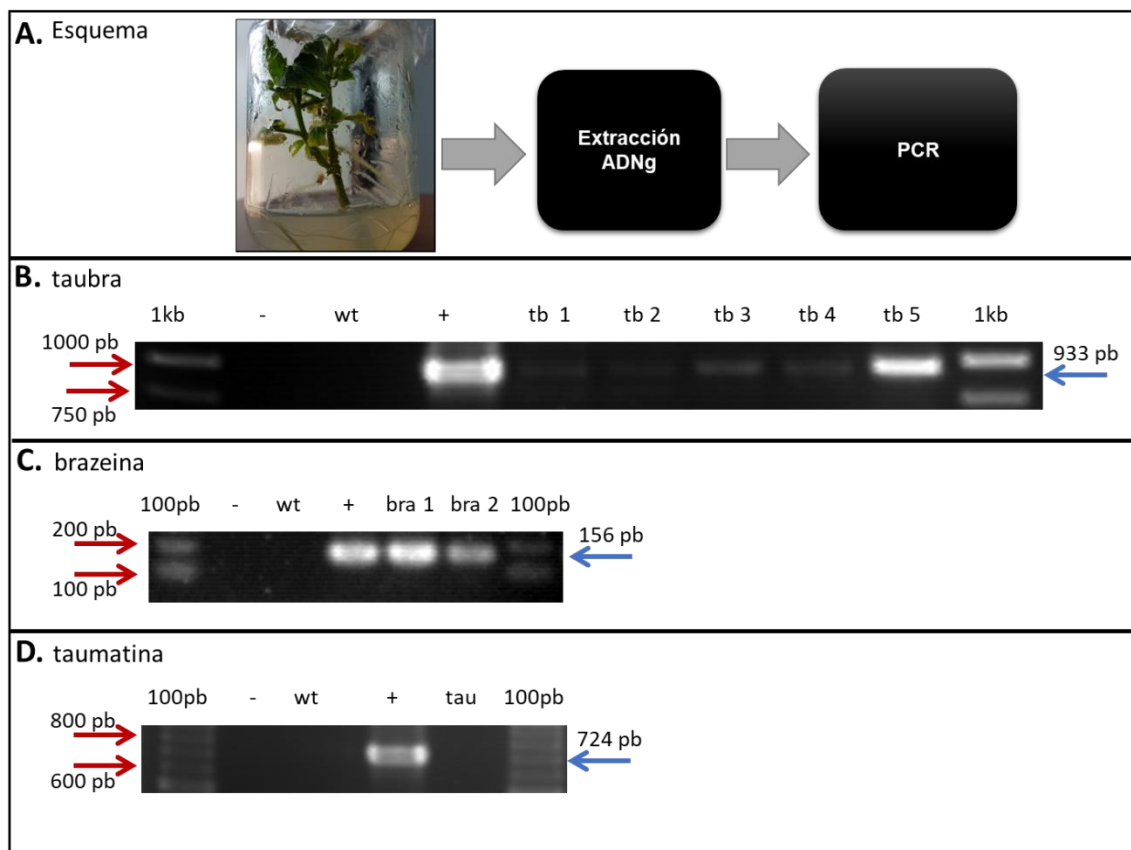


Figura 10: **Análisis molecular de líneas transgénicas de *S. lycopersicum***. A) Esquema del procedimiento del análisis molecular por PCR de las plantas transformantes de *S. lycopersicum*, en donde se extrajo el ADNg y luego se le realizó una PCR para el transgen. B) PCR realizado a partir de ADNg extraído de hojas de tomate transformantes para el transgen taubra. C) PCR realizado a partir de ADNg extraído de hojas de tomate transformantes para el transgen brazeina. D) PCR realizado a partir de ADNg extraído de hojas de tomate transformantes para el transgen taumatina. - : control negativo, agua; wt: control negativo ADNc de *S. lycopersicum*; + : control positivo ADN plasmidial del vector correspondiente; flechas rojas,

tamaño bandas ladder; flechas azules, tamaño esperado del amplicon para el gen correspondiente.

3.3.2 Transformación estable de *N. tabacum* con las construcciones pGWB5-tau y pGWB5-bra

Para la transformación de explantes de hoja de *N. tabacum* mediante *A. tumefaciens*, se utilizó la cepa GV3101, previamente transformadas con los vectores correspondientes (2.2.2.b). La organogénesis somática a partir de explantes de *N. tabacum* se realizó según se describe en la sección 2.3.4.1. La figura 8a muestra, la etapa de co-cultivo en que los explantes de hojas se infectaron por el *A. tumefaciens* en un medio libre de hormonas. Luego, los explantes fueron transferidos al medio de inducción de callos y brotes o medio MI-T (fig. 11b), el cual fue suplementado por una combinación de hormonas 1 mg/L IBA/ 5 mg/L BAP. Luego de aproximadamente 1 mes, se inició la regeneración de brotes transformantes, los que se transfirieron al medio de elongación/enraizamiento o medio MII-T (fig. 11c y 11d), el cual se encontraba libre de hormonas. Las plantas tardaron de 4 – 6 semanas en elongar y enraizar. Las plantas transformantes fueron seleccionadas en base a la capacidad de sobrevivir en medio MS-T, suplementado con el antibiótico higromicina (10 mg/L), el que se mantuvo durante todos los medios de cultivo siguientes.

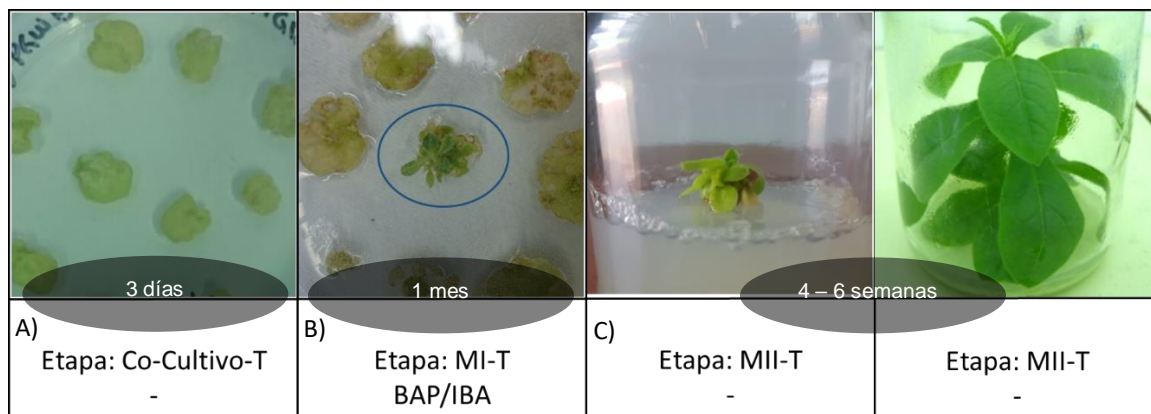


Figura 11: **Regeneración de tejido desde explantes de hoja de *N. tabacum* transformadas con *A. tumefaciens*.** A) Etapa de co-cultivo, la cual tuvo una duración de 3 días y ocurre la infección de las células de los explantes por parte del *A. tumefaciens*, medio MS-T sin hormonas. B) Etapa de inducción de callos y brotes, la cual tuvo una duración de 4 semanas, medio MS-T suplementado con IBA/BAP. C) Etapa de elongación y enraizamiento de brotes de tabaco, duró de 4 - 6 semanas en el medio MS-T sin hormonas. El círculo azul indica el callo con brote formado; Todos los medios se encontraban suplementados con higromicina para seleccionar las plantas transformantes.

Una vez enraizadas las plantas, estas se pasaron a tierra en maceteros y se aclimataron en el invernadero. Se analizaron cuatro plantas transformantes para cada transgen, de las cuales se verificó mediante PCR la correcta transformación de estas plantas. Para esto se realizó la extracción de ADNg (sección 2.4.4) y posteriormente una PCR (sección 2.4.5) para determinar la transgénesis. En la fig.9 se muestran los resultados de las PCR, en donde se obtuvieron cuatro líneas transgénicas para el transgen taumatina, denominadas tau 1, tau 2, tau 3 y tau 4 (fig. 12b) y cuatro líneas transgénicas para el transgen brazeina, denominadas bra 1, bra 2, bra 3 y bra 4 (fig. 12c).

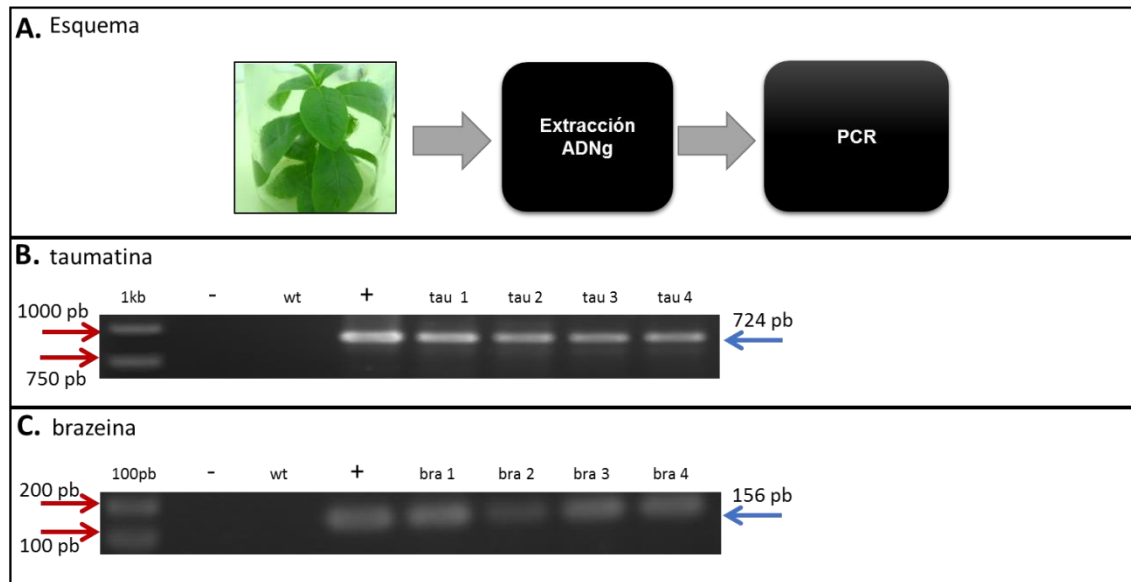


Figura 12: **Análisis molecular de líneas transgénicas de *N. tabacum***. A) Esquema del análisis molecular de las plantas transformantes de *N. tabacum*, de extracción del ADNg a las posibles líneas transgénicas y una PCR convencional para el transgen. B) PCR realizada a partir de ADNg extraído de hojas de tabaco transformantes para el transgen taumatina. C) PCR de ADNg extraído de hojas de tabaco transformantes para el transgen brazeina. - : control negativo, agua; wt: control negativo ADNc de *S. lycopersicum*; + : control positivo (vector); flechas rojas: tamaño bandas ladder; flechas azules, tamaño amplicon esperado para el gen correspondiente.

3.4 Expresión del transgen en plantas de *N. tabacum* transgénicas

Para evaluar la expresión del transgen taumatina y brazeina en hojas de tabaco transgénicos se colectó y congeló el tejido de los tabacos transgénicos y se realizó la extracción de ARN (sección 2.4.1, fig. 13a), obteniéndose un ARN de buena calidad (fig. 13b), el cual se encontraba con un bajo nivel de degradación y un patrón de bandas adecuado. A partir de esta preparación, se procedió a sintetizar el ADNc (2.4.3) y las reacciones de PCR correspondientes (RT-PCR, sección 2.4.5).

Todas las líneas transgénicas de taumatina y brazeina expresaron en transgen a nivel de ARNm (fig. 13). Las plantas transgénicas que poseen el transgen de taumatina presentaron el amplicón del tamaño esperado de 724 pb (fig. 13c). Lo mismo se aprecia en las plantas transgénicas que poseen el transgen de brazeina (fig. 13d). Además, se evaluó la calidad el ADNc sintetizado mediante la amplificación del gen psy endógeno (fig. 13e), indicando que el ADNc se encuentra íntegro.

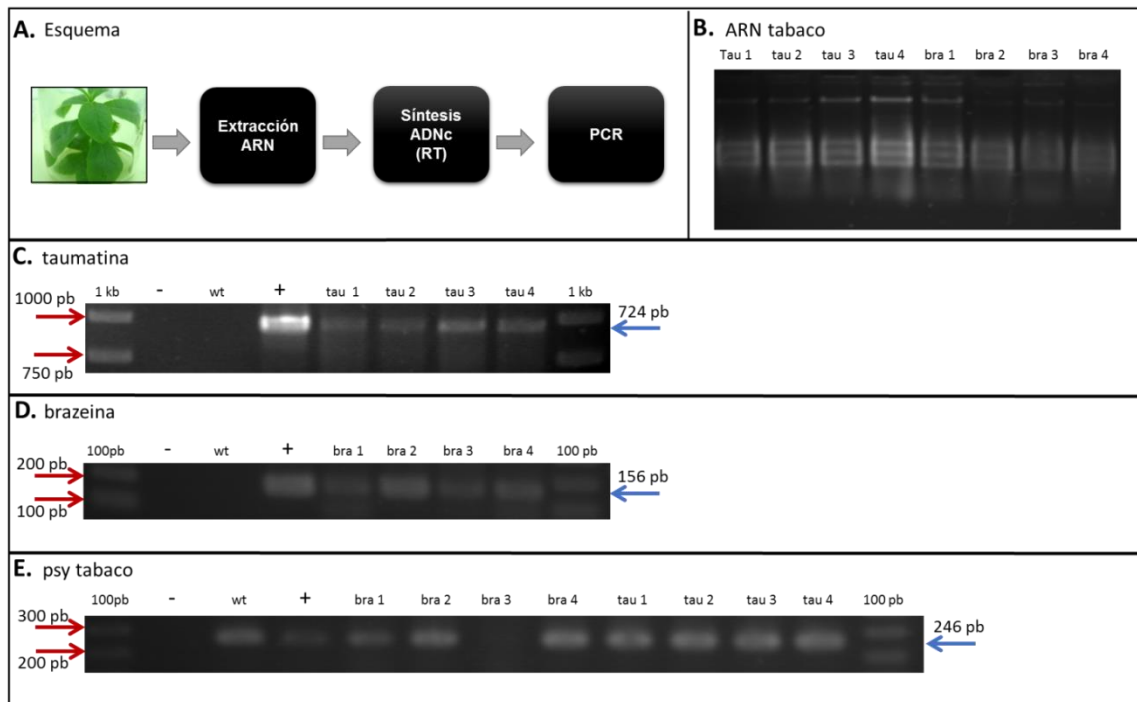


Figura 13: **Expresión del transgen en hojas de tabaco transgénicos.** (A) Esquema del experimento en hojas de tabaco, en donde primero se colecta y congela el tejido, para luego extraer el ARN y finalmente se realiza la reacción de RT-PCR, para comprobar que el transgen se está expresando. (B) ARN de hojas de tabacos transgénicos en gel de agarosa 2% en TAE DEPC 1X. (C) RT-PCR realizado a partir de ADNc extraído de hojas de tabacos transgénicos para el transgen taumatina. (D) RT-PCR realizado a partir de ADNc extraído de hojas de tabaco transgénicos para el transgen brazeina. (E) RT-PCR realizado a partir de ADNc extraído de hojas de tabaco para el gen psy 1 de tabaco. - : control negativo, agua; wt: control negativo ADNc de *S. lycopersicum*; + : control positivo ADNc plasmidial del vector correspondiente; flechas rojas, tamaño bandas ladder; flechas azules, tamaño amplicon esperado para el gen correspondiente.

4. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo se centró en obtener plántulas de tomate y tabaco transgénicos, transformados con los vectores de expresión que se contaban en el CBMV (Fig. 3). Para esto se evaluó la funcionalidad de los vectores de expresión dirigidos por un promotor fruto-específico, los cuales se evaluaron en frutos de tomate comercial, mientras que los vectores de expresión dirigidos por un promotor constitutivo fueron evaluados en hojas de tabaco.

Se ha demostrado que en frutos de tomate la expresión máxima ocurre a los 3-4 días post infiltración y decae alrededor de los 9 días post infiltración (Orzaez et al., 2006). Por este motivo se realizó el muestreo de los frutos a los 3 días post-infiltración y por consiguiente la extracción de ARN, desde el tejido previamente congelado. Esta etapa fue limitante en este trabajo, debido a que la extracción de ARN desde frutos suele contener altos niveles de polisacáridos, los cuales interfieren la cuantificación del ARN extraído (Davis et al., 2006; Asif et al., 2000) y afectan la síntesis de ADNc, ya que en esta aplicación se requiere de un ARN íntegro, de alta calidad y que se encuentre libre de contaminantes o interferentes para la reacción. Para ello se utilizó un protocolo previamente estandarizado en el grupo de investigación y descrito en la sección 2.4.1, que contiene el detergente catiónico CTAB y posee una mayor concentración de cloruro de sodio, lo cual disminuye la co-precipitación del ARN con polisacáridos (Crowley et al., 2003). De esta forma, se obtuvo un ARN de mayor calidad y sin interferentes para la posterior síntesis de ADNc. La pureza

del ARN se evaluó midiendo la absorbancia a A260/230 nm, obteniéndose una razón cercana a 2. Además, se analizó la integridad del ARN extraído (fig. 4b), en donde en un gel de agarosa en condición no desnaturante, se observa un patrón de 4 bandas, las cuales podrían corresponder a las subunidades ribosomales nuclear, de cloroplastos y de rubisco. Finalmente, se verificó la integridad del ADNc mediante un RT-PCR para las muestras de tomate agroinfiltradas (fig. 4f). Todas las muestras analizadas amplificaron el gen de *psy* endógeno de tomate, el cual se usó como control de la calidad e integridad del ADNc. Además, se obtuvo que 2 de los 3 vectores de expresión dirigidos por un promotor fruto-específico, expresaron las proteínas dulces a nivel transcripcional, estos vectores son el pGWB8M-taubra (fig. 4c) y pMDC110M-bra (fig. 4e), que poseen el transgen taumatina-brazeina y brazeina, respectivamente.

No se observó la expresión del transgen taumatina y se puede deber a varias condiciones. Los vectores se secuenciaron antes del ensayo para corroborar que no tuvieran mutaciones puntuales que afectaran la expresión del transgen, dejando fuera esta posibilidad como una de las razones de este resultado. A ello se suma que la integridad del ARN extraído fue analizada y se amplificó el gen endógeno *psy*. También se verificó que los partidores eran funcionales ya que amplificaron los controles positivos que corresponden a los vectores que contienen el gen tau. Por lo que puede ser que el promotor

constitutivo CaMV-35S que dirige el gen de selección para higromicina, afectara la especificidad espacial y temporal del promotor PG tal como se reportó para otros promotores tejido específico, en donde este promotor impide la expresión de otros promotores que se encuentran en el vector de expresión (Yoo et al., 2005; Zheng et al., 2007). Este resultado sugiere por tanto que la construcción de PG:tau puede generar complicaciones al ser usada para la transformación estable en tomates.

En tabaco, se ha reportado que la expresión máxima post-infiltración con *A. tumefaciens* ocurre a los 3 - 4 días (Kopertekh et al., 2005), por lo que se procedió de igual forma que con la de frutos de tomate.

La integridad del ARN extraído desde hojas de tabaco también se validó mediante una electroforesis en gel de agarosa (fig. 5b). Luego, el RT-PCR muestra que el ADNc sintetizado resultó integro, ya que se puede observar el tamaño esperado del amplicón del gen psy endógeno de tabaco, al igual que la expresión de los transgenes para las proteínas dulces taumatina (pGWB5-tau) y brazeina (pGWB5-bra). Este resultado demuestra la correcta constitución de ambas construcciones que permiten la expresión de los genes taumatina y brazeina.

Mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco se observó la expresión y localización subcelular de las proteínas de fusión TAU::GFP Y BRA::GFP (fig. 6), las cuales se expresaron y localizaron en el citoplasma y en el núcleo y citoplasma, respectivamente. Para el caso de ambas proteínas se esperaba que localizaran solo en citoplasma. Por lo que este resultado sugiere que la localización nuclear de BRA sea un efecto secundario debido a su pequeño tamaño. BRA está conformada por 54 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 6,5 kDa (Caldwell et al., 1998), y por esto pudo haber sido “arrastrada” al núcleo por la proteína GFP que tiene un tamaño de 26,9 kDa, considerando que GFP localiza en el citoplasma y núcleo (Chiu et al., 1996).

Para la obtención de tomates transgénicos, a partir de un protocolo de transformación mediado por *A. tumefaciens* y regeneración *in vitro*, es preciso tomar en cuenta una gran cantidad de variables que pueden afectar directamente la eficiencia de la transformación. Algunas variables son la variedad de la planta utilizada, el tipo y edad del explante utilizado, el tipo de hormonas utilizadas en los medios de inducción y regeneración, la concentración de *A. tumefaciens* utilizado para la transformación, entre otras (Cortina et al., 2004). Uno de los factores más importantes que determinan la frecuencia de transformación es el genotipo de la variedad de tomate que se está transformando (Pino et al., 2010). Ejemplo de esto último se evidencia en Pino et al. (2010) en donde se obtuvo una frecuencia de transformación de casi

un 40% (calculada según el total de eventos de transformación independientes dividido por el total de explantes transformados), utilizando la inducción de organogénesis por BAP en una variedad de tomate Microtom mutante.

En nuestro equipo de trabajo anteriormente se realizó la transformación de explantes de cotiledón mediante *A. tumefaciens* utilizando un protocolo modificado de Pino et al. (2010) (Arias, 2015, sección 2.3.3.2.1), obteniendo una eficiencia de transformación del 2%. En esta memoria de título, no fue posible obtener plantas transgénicas a partir de explantes de cotiledón. A pesar de esto, se observó el proceso de regeneración de tejido de posibles plantas transformantes desde explantes de cotiledón (fig. 8), en donde en la etapa de enraizamiento o MIII-C, el único brote elongado que llegó hasta este medio no generó raíz a pesar de haber suplementado el medio con la auxina IBA que induce la generación de raíces adventicias (Ludwig-Müller et al., 2005). Es decir, no generó aquellas raíces que no provienen de la radícula del embrión, sino que se originan en cualquier otro tejido de la planta, como el tallo, siendo la hormona IBA la más efectiva para esta función (Ludwig-Müller et al., 2005). Esto se debe a la presencia de higromicina, que es el agente de selección de plántulas posiblemente transformantes, inhibiendo el crecimiento y desarrollo de plantas que no son transformantes.

En paralelo, se estandarizó el método de transformación a partir de hojas plantas *in vitro* de tomate basado en el protocolo de Cruz-mendivil et al. (2011). La eficiencia de regeneración de tejido de explantes silvestres en medio sin antibiótico de selección (fig. 7), fue de un 157% lo que significa que por cada explante de hoja se generaron 1,6 plantas de tomate enraizadas. En dicho protocolo, se usó una combinación de auxina (que promueve la división celular de tejido no meristemático) y de citoquinina. Para el proceso de transformación de explantes con *A. tumefaciens* la combinación de la auxina IBA y la citoquinina BAP a la concentración utilizada permite la inducción de callo y consiguiente formación de brotes en *S. lycopersicum*. Se ha descrito que la combinación con mejores resultados en inducción de callos fue IAA y BAP (Cruz-mendivil et al., 2011). Para adaptar este procedimiento a las condiciones de trabajo del CBMV, se utilizó la combinación de IBA y BAP, obteniéndose una alta eficiencia de regeneración de tejido silvestre (157%, fig. 7). La etapa de elongación del brote fue la que generó más inconvenientes en el periodo de transformación debido a que la presencia del agente de selección (5 mg/L de higromicina) provocaba un gran retraso en la elongación de los brotes. Dado que esto fue observado anteriormente en nuestro equipo de trabajo, se solucionó eliminando la selección con antibiótico en esta etapa para permitir la elongación correcta de brotes, restituyendo el suplemento con higromicina una vez que los brotes elongaran. Los brotes que elongaron se transfirieron al medio MIII-H, para inducir el enraizamiento. En este medio se volvió a incluir la selección con antibiótico para así evitar la aparición de falsos positivos en la

transformación de las plantas de tomates, seleccionando las plántulas que generaron raíz en este medio para los siguientes análisis moleculares.

Las ventajas presentadas por este protocolo de transformación a partir de explantes de hoja comparado con el de cotiledón son: 1.- la cantidad de explantes iniciales para la transformación. Se pueden obtener 30 explantes desde una planta de tomate generada *in vitro* con un mes de edad, ya que posee por lo menos posee 10 – 15 hojas que pueden ser transformadas por este método mientras que desde cotiledones sólo hay dos por planta. 2.- El tamaño de los explantes. Los explantes de cotiledón son mucho más pequeños que los que se pueden obtener desde hoja, lo que hace una recuperación del tejido más eficiente desde hoja, evitando la fatiga y muerte de los explantes por el proceso de transformación y generación de heridas en éstos.

Para la obtención de plantas de tabaco transgénicas y regeneración de tejido, el medio de cultivo se suplementó con una combinación de hormonas BAP (5 mg/L) e IBA (1 mg/L) (fig 11), en donde la concentración mayor de citoquinina favorece la formación de brotes desde explantes de hoja de tabaco infectados con *A. tumefaciens* (Horsch et al., 1985; Klee et al., 1987). Este protocolo estandarizó, en la década de los años 80's y también en nuestro equipo de trabajo, utilizándose habitualmente para la obtención de plantas de tabaco transgénicas. Por ello, el protocolo no presentó grandes complicaciones para transformar y obtener plantas de tabaco transgénicas, en donde la

selección con antibiótico no generó retrasos en la elongación y formación de raíces en las posibles plantas de tabaco transformantes.

Si se compara los procesos de organogénesis somática de tomate y tabaco, la organogénesis de tabaco es directa, dado que la combinación de citoquina en conjunto de auxina, descritas como BAP e IBA producen la inducción de brotes desde el explante de hoja de tabaco (Gill et al., 1993). En tomate, se produce una organogénesis indirecta, debido a que primero se debe formar una estructura de callo y luego desde ésta se forman los brotes de tomate (fig. 8 y 9) (Robaglia et al., 2013).

En plantas transformantes de tomate se realizaron análisis moleculares a partir de ADNg desde hojas. Puesto que las plántulas de tomates no alcanzaron a presentar frutos, no se pudo realizar un análisis de la expresión de los genes de interés a nivel transcripcional considerando que el promotor corresponde al gen que codifica para la enzima poligalacturonasa del kiwi (pPG) (Wang et al., 2000), que se expresa exclusivamente en frutos. Mediante PCR determinamos que las 5 plantas transgénicas presentan el transgen taumatina-brazeina (fig. 10b), al igual que las 2 plantas líneas analizadas para brazeina (fig. 10c), lo que hace un 100% de efectividad. Sin embargo, ninguna línea fue transgénica para taumatina (fig. 10d). Este último resultado coincide con la imposibilidad de

evaluar la expresión transitoria de taumatina, sugiriendo que existió una anomalía desconocida en la construcción del vector, que pudo causar este fenómeno

En tabaco, todas las plantas transformantes analizadas poseían el transgen amplificado por PCR (fig. 12). Esto indica que la selección durante el proceso de regeneración de tejido fue exitosa, evitando la aparición de falsos positivos en las plantas transformantes. Además, un 100 % de los tabacos analizados presentaron la expresión del transgen a nivel ARNm (fig. 13), por lo cual se confirmó la transgenia de los tabacos.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de esta memoria de título son:

- Resultó que cuatro de las cinco construcciones con las que se contaban en el CBMV, expresaron a nivel transcripcional los transgenes de taumatina y brazeina, dos en frutos de tomate y las restantes dos en hojas de tabaco, transformados transitoriamente mediante *A. tumefaciens*. Las siguientes construcciones expresaron su respectivo transgen: pPG-taubra, pPG-bra, 35SCaMV-tau y 35SCaMV-bra.
- Se obtuvieron cinco y dos líneas transgénicas de plantas de *S. lycopersicum* transgénicas para el transgen taumatina-brazeina y brazeina, respectivamente.
- Se obtuvieron 4 líneas transgénicas de plantas de *N.tabacum* para los transgenes brazeina y taumatina.
- La expresión a nivel transcripcional de brazeina y taumatina en líneas transgénicas, resultó en un 100 % de las plantas transgénicas analizadas.
- La localización de estas proteínas recombinantes dulces en hojas de tabaco, es citoplasmática.

Por lo tanto, los genes de las proteínas dulces taumatina y brazeina se pueden insertar en otras variedades de plantas, tanto para mejorar el sabor de frutos (tomate) o para analizar las propiedades contra el estrés biótico en plantas (tabaco), cumpliéndose así los objetivos de esta memoria de título.

REFERENCIAS

- Asif, M. H., Dhawan, P., & Nath, P. (2000). A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18(2), 109-115.
- Bernhardt, S. J., Naim, M., Zehavi, U., & Lindemann, B. (1996). Changes in IP₃ and cytosolic Ca²⁺ in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. *The Journal of Physiology*, 490(2), 325-336.
- Burow, M. D., Chlan, C. A., Sen, P., Lisca, A., & Murai, N. (1990). High-frequency generation of transgenic tobacco plants after modified leaf disk cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8(2), 124–139.
- Caldwell, J. E., Abildgaard, F., Dzakula, Z., Ming, D., Hellekant, G., & Markley, J. L. (1998). Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein. *Nature Structural Biology*, 5(6), 427–431.
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113–116.
- Chiu, W. L., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., & Sheen, J. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, 6(3), 325-330.

- Cortina, C., & Culiáñez-Macià, F. A. (2004). Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(3), 269-275.
- Crowley TM, Muralitharan MS, Stevenson TW (2003). Isolating conifer DNA: A superior polysaccharide elimination method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21: 97a-97d.
- Cruz-Mendivil, A., Rivera-López, J., Germán-Báez, L. J., López-Meyer, M., Hernández-Verdugo, S., López-Valenzuela, J. A. & Valdez-Ortiz, A. (2011). A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv. Micro-Tom from leaf explants. *HortScience*, 46(12), 1655-1660.
- Davis, A. R., Levi, A., Kim, S., King, S. R., & Hernandez, A. (2006). RNA extraction method from fruit tissue high in water and sugar. *HortScience*, 41(5), 1292-1294.
- de Vos, a M., Hatada, M., van der Wel, H., Krabbendam, H., Peerdeman, F., & Kim, S. H. (1985). Three-dimensional structure of thaumatin I, an intensely sweet protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(5), 1406–1409.
- Dias, R. D. O., & Franco, O. L. (2015). Cysteine-stabilized defensins: From a common fold to antibacterial activity. *Peptides*, 72, 64–72.
- Donnelly, M. L., Hughes, L. E., Luke, G., Mendoza, H., Dam, E., Gani, D., &

- Ryan, M. D. (2001). The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *Journal of General Virology*, 82(5), 1027-1041.
- Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19, 11-15.
- Fisher, D. K., & Gultinan, M. J. (1995). Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed-to-seed protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13, 278-278.
- Gene, P., Asif, M. H., Dhawan, & Nath, P. (2000). A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18(2), 109-115.
- Gill, R., & Saxena, P. K. (1993). Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.: induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Reports*, 12(3), 154-159.
- Ha, S. H., Liang, Y. S., Jung, H., Ahn, M. J., Suh, S. C., Kweon, S. J., ... & Kim, J. K. (2010). Application of two bicistronic systems involving 2A and IRES sequences to the biosynthesis of carotenoids in rice endosperm. *Plant Biotechnology Journal*, 8(8), 928-938.
- Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (1999). Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, 96(4), 541-551.

- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., & Fraley, R. T. (1985). A Simple and General Method for hybridization revealed the expected. *Science*, 227, 1229–1231.
- Horsch, R.B., Hinchee, M.A., Hein, M.B. and Hoffmann, N.L., H. J. (1987). The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. *Genes & Development*, 1, 86–96.
- Kimura, S., & Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(11), pdb-emo105.
- Klee, H., Horsch, R., & Rogers, S. (1987). *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annual Review of Plant Physiology*, 38(1), 467-486.
- Kopertekh, L., & Schiemann, J. (2005). Agroinfiltration as a tool for transient expression of cre recombinase in vivo. *Transgenic Research*, 14(5), 793–798.
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., & Adler, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(7), 4692-4696.
- Ludwig-Müller, J., Vertocnik, A., & Town, C. D. (2005). Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 2095-2105.

- Masuda, T., Taguchi, W., Sano, A., Ohta, K., & Kitabatake, N. (2013). Five amino acid residues in cysteine-rich domain of human T1R3 were involved in the response for sweet-tasting protein , thaumatin. *Biochimie*, 95(7), 1502–1505.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., ... & Levy, A. (1997). A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal*, 12(6), 1465-1472.
- Menco, B. P. M., & Hellekant, G. (1993). Ultrastructural evidence for a binding substance to the sweet- tasting protein thaumatin inside taste bud pores of rhesus monkey foliate papillae. *Microscopy Research and Technique*, 26(2), 133–141.
- Morini, G., & Temussi, P. A. (2005). Micro and macro models of the sweet receptor. *Chemical Senses*, 30(1), i86-i87.
- Nagata, K., Hongo, N., Kameda, Y., Yamamura, A., Sasaki, H., Lee, W. C., ... Tanokura, M. (2013). The structure of brazzein, a sweet-tasting protein from the wild African plant *Pentadiplandra brazzeana*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(4), 642–647.
- Ogata, C., Hatada, M., Tomlinson, G., Shin, W. C., & Kim, S. H. (1987). Crystal structure of the intensely sweet protein monellin. *Nature*, 328(6132), 739-742.
- Ogata, C. M., Gordon, P. F., de Vos, A. M., & Kim, S. H. (1992). Crystal

structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 228(3), 893–908.

Ohta, K., Masuda, T., Tani, F., & Kitabatake, N. (2011). Biochemical and Biophysical Research Communications The cysteine-rich domain of human T1R3 is necessary for the interaction between human T1R2 – T1R3 sweet receptors and a sweet-tasting protein, thaumatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(3), 435–438.

Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W. H., & Granell, A. (2006). Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology*, 140(1), 3-11.

Park, S. H., Morris, J. L., Park, J. E., Hirschi, K. D., & Smith, R. H. (2003). Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *Journal of Plant Physiology*, 160(10), 1253-1257.

Pierpoint, W. S., Tatham, A. S., & Pappin, D. J. C. (1987). Identification of the virus-induced protein of tobacco leaves that resembles the sweet-protein thaumatin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 31(2), 291–298.

Pino, L. E., Lombardi-Crestana, S., Azevedo, M. S., Scotton, D. C., Borgo, L., Quecini, V. & Peres, L. E. (2010). The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. *Plant Methods*, 6, 23.

Renny-Byfield, S., Chester, M., Kovařík, A., Le Comber, S. C., Grandbastien, M.

- A., Deloger, M. & Leitch, A. R. (2011). Next generation sequencing reveals genome downsizing in allotetraploid *Nicotiana tabacum*, predominantly through the elimination of paternally derived repetitive DNAs. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2843-2854.
- Robaglia, C., Caffarri, S., & Basta, G. (2013). Optimisation of tomato Micro-tom regeneration and selection on glufosinate / Basta and dependency of gene silencing on transgene copy number, 1441–1454.
- Rout, G. R. (2006). Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. *Plant growth regulation*, 48(2), 111-117.
- Singh, N. K., Bracker, C. a., Hasegawa, P. M., Handa, A. K., Buckel, S., Hermodson, M. a., ... Bressan, R. a. (1987). Characterization of Osmotin. *Plant Physiology*, 85(2), 529–536.
- Spadaccini, R., Trabucco, F., Saviano, G., Picone, D., Crescenzi, O., Tancredi, T., & Temussi, P. A. (2003). The mechanism of interaction of sweet proteins with the T1R2-T1R3 receptor: evidence from the solution structure of G16A-MNEI. *Journal of Molecular Biology*, 328(3), 683-692.
- Stevenson, T. W., Muralitharan, M. S., & Crowley, T. M. (2003). Isolating conifer DNA: a superior polysaccharide elimination method. *Plant molecular biology reporter*, 21(1), 97-97.
- Sun, H. J., Uchii, S., Watanabe, S., & Ezura, H. (2006). A highly efficient

- transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant and Cell Physiology*, 47(3), 426-431.
- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847-859.
- Temussi, P. A. (2002). Why are sweet proteins sweet? Interaction of brazzein, monellin and thaumatin with the T1R2-T1R3 receptor. *FEBS letters*, 526(1-3), 1-4.
- Vertocnik, A., & Town, C. D. (2005). Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *Journal of experimental botany*, 56(418), 2095-2105.
- Vigers, A. J., Wiedemann, S., Roberts, W. K., Legrand, M., Selitrennikoff, C. P., & Fritig, B. (1992). Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Science*, 83(2), 155–161.
- Wang, X., Tang, C., Deng, L., Cai, G., Liu, X., Liu, B. & Kang, Z. (2010). Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust fungus. *Physiologia Plantarum*, 139(1), 27–38.
- Wang, Z. Y., MacRae, E. A., Wright, M. A., Bolitho, K. M., Ross, G. S., & Atkinson, R. G. (2000). Polygalacturonase gene expression in kiwifruit: relationship to fruit softening and ethylene production. *Plant molecular*

biology, 42(2), 317-328.

Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., & Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10487-10492.

Yoo, S. Y., Bomblies, K., Yoo, S. K., Yang, J. W., Choi, M. S., Lee, J. S. & Ahn, J. H. (2005). The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta*, 221(4), 523-530.

Zheng, X., Deng, W., Luo, K., Duan, H., Chen, Y., McAvoy, R. & Li, Y. (2007). The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue-and organ-specific gene promoters. *Plant Cell Reports*, 26(8), 1195-1203.

Zimmerman, R. H., Lieberman, M., & Broome, O. C. (1977). Inhibitory effect of a rhizobitoxine analog on bud growth after release from dormancy. *Plant Physiology*, 59(2), 158-160.