



Obtención y análisis de posibles secuencias promotoras de genes expresados  
tejido específicamente, y regulados negativamente por disponibilidad de fósforo  
en *Triticum aestivum*

**Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular**

**Luis Apolo Milla Brito**

Director de Tesis: Dr. Herman Silva

Laboratorio de Genética Molecular Vegetal  
Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

## **AGRADECIMIENTOS**

Al terminar este trabajo de tesis, no puedo dejar de agradecer a las personas que de una u otra manera me han ayudado y han hecho posible que esto haya salido adelante. A Cecilia, mi madre, sin ella nada de esto habría sido posible, a Lala y Hugo, mis abuelos, mis hermanos, y mi pequeño sobrino Tomás.

A Herman, por toda la ayuda y la experiencia que me ha traspasado, tanto en lo profesional como en lo personal.

A Lee y Ariel por las enriquecedoras discusiones de los días Lunes, a los miembros del Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, y a mis amigos.

Esta tesis fue financiada en su totalidad por el proyecto FIA BIOT 1-A-36

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>I</b>
<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS UTILIZADAS</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.- HIPÓTESIS</b>	<b>9</b>
<b>3.- OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>3.1.- Objetivo General</b>	<b>9</b>
<b>3.2.-Objetivos Específicos</b>	<b>9</b>
<b>4.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
<b>4.1.- Material vegetal y condiciones de crecimiento</b>	<b>10</b>
<b>4.1.1.- Crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> en tierra</b>	<b>10</b>
<b>4.1.2.- Crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> en condiciones estériles</b>	<b>10</b>
<b>4.2.- Material microbiológico, medios y condiciones de cultivo</b>	<b>11</b>
<b>4.3.- Preparación de células de <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math> competentes</b>	<b>11</b>
<b>4.4.- Transformación de <i>E. Coli</i> DH5<math>\alpha</math> por estrés térmico</b>	<b>12</b>
<b>4.5.- Extracción de ADN plasmidial desde <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	<b>12</b>
<b>4.6.- Crecimiento de trigo en condiciones de carencia y</b>	<b>13</b>

suficiencia de fósforo	
4.7.- Extracción de ARN desde plantas de trigo	13
4.8.- Extracción de ADN desde hojas de trigo.	14
4.9.- “Caminata genómica” o “Genome Walker”	15
4.9.1- Generación de librerías genómicas	15
4.9.2- Amplificación de putativas secuencias promotoras o “caminata genómica”	16
4.10.- Análisis de expresión génica mediante Northern	17
4.11.- Análisis de transcripción reversa con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	17
4.12.- Electroforesis en geles de agarosa para análisis de ADN	18
4.13.- Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	18
4.14.- Ligación de ADN utilizando T4 ADN ligasa	19
4.15.- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	19
4.16.- Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> cepa GV3101	19
4.17.- Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa GV3101	20
4.18.- Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante inmersión floral	20
4.19.- Análisis de secuencias “ <i>in silico</i> ”	21
5.-RESULTADOS	22
5.1.- Análisis de las secuencias de transportadores de fosfato	22
5.2.- Análisis de la expresión de los transportadores de fosfato	22

de trigo.

<b>5.3.- Clonamiento de la secuencia promotora de PHT1;2</b>	<b>29</b>
<b>5.4.- Clonamiento de secuencias 5' río arriba a genes que codifican para transportadores de fosfato de alta afinidad</b>	<b>31</b>
<b>5.5.- Subclonamiento de la putativa secuencia promotora de TaPT2 en vector binario</b>	<b>33</b>
<b>5.6.- Análisis de la secuencia 5' río arriba a TaPT2</b>	<b>35</b>
<b>6.- DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>7.- REFERENCIAS</b>	<b>44</b>
<b>8.- ANEXO</b>	<b>50</b>
<b>8.1.- Obtención de sondas utilizadas como control de carga</b>	<b>50</b>
<b>8.2.- Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>50</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Figura 1: Enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) involucradas en el metabolismo y exudación de ácidos orgánicos</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2: Alineamiento de las secuencias correspondientes a transportadores de fosfato de <i>Arabidopsis</i> y trigo</b>	<b>25</b>
<b>Figura 3: Perfiles de hidrofobicidad de los transportadores de fosfato de <i>Arabidopsis thaliana</i> (PHT1;2 y PHT1;4), y de trigo (TaPT1 y TaPT2)</b>	<b>26</b>
<b>Figura 4: Análisis de la expresión de TaPT1 y TaPT2 mediante Northern</b>	<b>27</b>
<b>Figura 5: Secuencia de los transportadores de fosfato de alta afinidad de trigo (TaPT1 y TaPT2).</b>	<b>28</b>
<b>Figura 6: Análisis de la expresión de TaPT1 y TaPT2 mediante RT-PCR</b>	<b>29</b>
<b>Figura 7: Mapa del vector pLMB2</b>	<b>30</b>
<b>Figura 8: Genome Walker</b>	<b>32</b>
<b>Figura 9: Mapa del vector pLMB9</b>	<b>34</b>
<b>Figura 10. Secuencia de la región río arriba del sitio de inicio de la traducción para el gen TaPT2.</b>	<b>34</b>
<b>Tabla 1: Sitios de unión a factores de transcripción encontradas en la secuencia 5' al gen TaPT2 aislada de trigo.</b>	<b>37</b>

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>ADN</b>	<b>Acido desoxirribonucleico</b>
<b>ADNc</b>	<b>ADN complementario</b>
<b>AP</b>	<b>“Adaptor primer” (Partidor del adaptador)</b>
<b>ARN</b>	<b>Acido ribonucleico</b>
<b>CS</b>	<b>Citrato sintasa</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido Etilendiaminotetraacético</b>
<b>EST</b>	<b>“Expressed sequence tags” (Etiquetas de secuencias expresadas)</b>
<b>ETM</b>	<b>Elementos traza metálicos</b>
<b>DEPC</b>	<b>Dietil pirocarbonato</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetilsulfóxido</b>
<b>GFP</b>	<b>“Green fluorescent protein” (Proteína fluorescente verde)</b>
<b>GSP</b>	<b>“Gene specific primer” (Partidor gen específico)</b>
<b>MDH</b>	<b>Malato deshidrogenasa</b>
<b>PCR</b>	<b>“Polimerase Chain Reaction” (Reacción en cadena de la polimerasa)</b>
<b>PDH</b>	<b>Piruvato deshidrogenasa</b>
<b>PEPC</b>	<b>“Phosphoenol pyruvate carboxylase” (Fosfoenolpiruvato carboxilasa)</b>
<b>PIPES</b>	<b>Piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico)</b>
<b>PK</b>	<b>“Pyruvate kinase” (Piruvato kinasa)</b>
<b>Rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RT</b>	<b>“Reverse transcription” (Transcripción reversa)</b>
<b>SDS</b>	<b>“Sodium dodecyl sulphate” (Dodecil sulfato de sodio)</b>
<b>SUFT</b>	<b>Sitios de unión a factores de transcripción</b>

## RESUMEN

El fósforo (P) es un nutriente esencial para las plantas, la mayoría de las cuales no poseen un sistema eficiente para obtenerlo en suelos con poca biodisponibilidad. Una de estas plantas es el trigo (*Triticum aestivum*), de gran importancia económica para Chile. Una estrategia para generar plantas más eficientes en la obtención de P, requiere contar con promotores que activen la expresión génica cuando no exista disponibilidad. Mediante la información entregada por el proyecto de secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana*, planta modelo en biología vegetal, y con la información presente en Genbank, se han logrado identificar promotores y putativas secuencias promotoras de algunos genes, tanto de *Arabidopsis* como de trigo, posiblemente expresados bajo una carencia de P, en raíces, tejido responsable de la captación de P desde la rizósfera. Basados en dicha información, y mediante análisis de expresión, en comparación con un gen constitutivo (actina de trigo, acceso Genbank AY423548), se concluye que los transportadores de fosfato de trigo TaPT2, y TaPT1 son regulados por carencia de fósforo en raíces. Un análisis bioinformático del putativo promotor obtenido permitió establecer la existencia de elementos regulatorios *cis* conservados entre promotores de otras especies, tanto mono como dicotiledóneas.



## ABSTRACT

Phosphorus (P) is an essential nutrient for plants. Most of the plants do not have an efficient system to uptake it from the soil. Among these plants, wheat (*Triticum aestivum*), has economical importance for Chile. One of the strategies to generate plants that could improve the uptake of phosphorus is the use of specific promoters. These promoters must be activated under P starvation. Thanks to the *Arabidopsis thaliana* sequencing initiative and the Genbank database, it has been possible to identify putative promoter sequences of some genes in Arabidopsis and wheat, probably expressed under P starvation in roots, being the roots responsible for P uptake from the rhizosphere. With this information and the use of expression analysis we concluded that wheat phosphate transporters TaPT2 and TaPT1 are regulated under phosphate starvation on the roots. Bioinformatic analysis showed conserved *cis* regulatory elements between other species promoters (mono and dicots).

## 1.- INTRODUCCIÓN

Las plantas, en crecimiento natural, o en cultivos artificiales se ven expuestas a diferentes condiciones ambientales adversas, desde un cambio brusco en la temperatura, hasta una carencia prolongada de algún nutriente. En el caso de plantas de interés agronómico, como los cereales, la investigación en relación a la respuesta a estrés es muy activa. Uno de los cereales más importantes para Chile, es el trigo, siendo el principal cultivo anual producido en nuestro país, con una producción de más de 18 millones de quintales métricos y una superficie cultivada de más de 420.000 hectáreas en la temporada agrícola 2001/2002 (Fuente: Instituto Nacional de Estadísticas, INE, [www.ine.cl](http://www.ine.cl)). Las zonas donde se cultiva este cereal, van desde la séptima a la décima región, cuyos suelos tienen un origen volcánico, lo cual hace muy difícil el crecimiento de algunos cultivos. Uno de los problemas más severos a los que se enfrentan los agricultores de estas zonas son la acidez, la presencia de altas concentraciones de aluminio, y el bajo fósforo disponible en los suelos.

Chile es un país con alto contenido de fósforo total en sus suelos agrícolas, incluyendo suelos no fertilizados. La razón por la cual la mayoría de las plantas no pueden adquirirlo es porque no se encuentra biodisponible. Esto sucede al encontrarse asociado a algunos metales, tales como el hierro y el aluminio en forma de inositol penta- y hexa fosfatos (Borie *et al.*, 2003). La unión a dichos metales, hace que las concentraciones de fósforo en la rizósfera se mantengan en el orden micromolar.

El fósforo es uno de los nutrientes más importantes para la célula vegetal, participa en la fotosíntesis, respiración celular, regulación enzimática, metabolismo energético, biosíntesis de macromoléculas como por ejemplo ácidos nucleicos, fosfolípidos de membranas, etc. Se considera al fósforo uno de los nutrientes menos disponibles en los suelos a nivel mundial y uno de los más utilizados a la hora de enriquecer los suelos para cultivos.

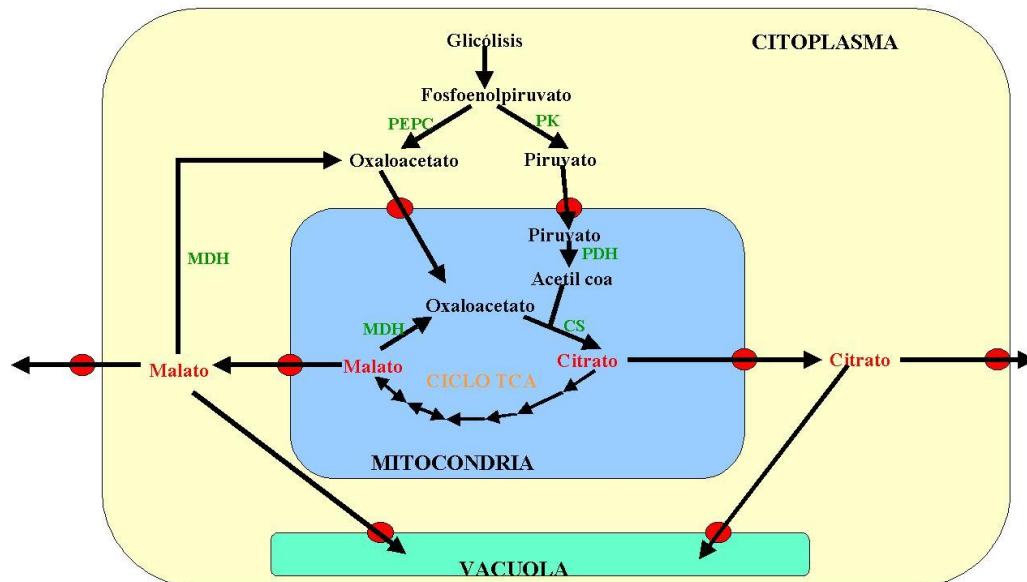
Para aumentar la presencia de fósforo a nivel de cultivos, la solución que entrega la agricultura es la aplicación de fertilizantes fosfatados, con el propósito de enriquecer los suelos. Este tipo de tratamiento repercute directamente en el precio final del producto. Alrededor de un 1% del fósforo que se aplica en el suelo es usado por las plantas. La fuente de fósforo para este tipo de fertilizantes proviene en su mayoría de rocas fosfóricas. Estimaciones afirman que se producirá un agotamiento de esta fuente en los próximos 90 años (Raghothama, 1999). Chile, al ser un país con alta retención de fósforo en sus suelos, utiliza un promedio de 80 kilos de fertilizantes fosfatados por hectárea cultivada de trigo, siendo casi el doble que la mayoría de los países de alta producción de este cereal (Fuente: International Fertilizer Industry Association, IFA, [www.fertilizer.org/](http://www.fertilizer.org/) ). La utilización de fertilizantes fosfatados derivados de rocas fosfóricas, produce una acumulación de elementos traza metálicos (ETM) en el suelo, entre ellos el cadmio, acumulado como impureza en su proceso de elaboración (Gavi *et al.*, 1997). La acumulación de ETM, produce efectos nocivos en la salud humana. El cadmio, por ejemplo, es un ETM que, al ingresar en la malla trófica, produce fenómenos de bioacumulación y biomagnificación. La principal fuente de internalización de cadmio son los alimentos de origen vegetal (Norvell *et al.*, 2000). Una manera de controlar los índices de cadmio artificialmente acumulado en el suelo es disminuir la utilización de fertilizantes fosfatados. Una manera interesante para abordar el problema es observar la adaptación de vegetales a suelos no fertilizados, es decir, estudiar las diferentes formas que tienen las plantas para obtener el fósforo.

Las plantas han desarrollado estrategias para acceder al fósforo, cuando se encuentra retenido o en poca cantidad. Estas adaptaciones evolutivas varían según la especie. Entre estas estrategias se encuentra: 1) la asociación con hongos micorríticos (Harrison *et al.*, 1999), 2) la variación en la arquitectura radical (López-Bucio *et al.*, 2002), 3) la síntesis de transportadores de alta afinidad (Muchhal *et al.*, 1996), 4) la exudación de fosfatasas ácidas (Haran *et al.*, 2000) y 5) la exudación de ácidos orgánicos (Ryan *et al.*, 2001).

Una de las especies vegetales que ha sido mayormente estudiada por su notable adaptación a condiciones de carencia de fósforo, es el Lupino blanco (*Lupinus albus*), perteneciente a la familia Proteaceae. Esta planta, puede sobrevivir en suelos con un alto contenido de fósforo retenido, como por ejemplo los de origen volcánico. Para esto, cambia su arquitectura radical, generando estructuras denominadas raíces proteoideas, las cuales permiten aumentar la superficie de interacción con el suelo. Además presenta una abundante acumulación y exudación del anión orgánico citrato. Otras especies de plantas exudan otros aniones orgánicos tricarbónicos, como por ejemplo malato y oxaloacetato (Grierson *et al.*, 1992). La razón por la cual algunas plantas realizan esta liberación en la rizósfera es que este tipo de aniones orgánicos, especialmente el citrato, poseen una alta afinidad por los metales que acompañan al fósforo. Por lo tanto, su exudación produce una competencia entre el fósforo y el anión por los metales, con lo cual, se produce una liberación localizada de fósforo en forma de fosfato, la cual es aprovechada por la planta para internalizarlo. Al observar la adaptación de algunas especies a la carencia de fósforo, es razonable tratar de aprovechar estas cualidades para mejorar genéticamente especies de interés productivo.

Se han hecho esfuerzos tendientes a generar plantas transgénicas sobreproductoras de ácidos orgánicos. La estrategia que se ha seguido es la sobreexpresión de alguna enzima río arriba de la síntesis de ácidos orgánicos. En trabajos publicados recientemente, se ha observado una sobreproducción y excreción de citrato en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y papaya (*Carica papaya*) transformadas con un gen que codifica para la enzima citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*, fusionado al promotor constitutivo 35S (De la Fuente *et al.*, 1997). Estas plantas presentaron una mayor tolerancia a concentraciones normalmente tóxicas de aluminio, característica que normalmente se produce en el mismo tipo de suelos en que ocurre una carencia de fósforo (Nian *et al.*, 2003).

La enzima en la cual se centró este trabajo, la citrato sintasa (CS) es una enzima que produce citrato directamente desde oxaloacetato. Una estrategia alternativa podría ser la sobreexpresión de otras enzimas que participan en la síntesis de aniones orgánicos importantes, como la malato deshidrogenasa, o la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). Una sobreproducción de la PEPC podría traducirse en una mayor producción de oxaloacetato, teniendo, de esta manera, una mayor presencia del precursor de malato y citrato (Figura 1). Una expresión aumentada de PEPC y CS también podría ser una estrategia atractiva, dado que esto facilitaría la acumulación de citrato por sobre la de malato, este último con una menor afinidad a hierro y aluminio.



**Figura 1: Esquema de la formación de citrato y malato.** Enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), están involucradas en el metabolismo y exudación de ácidos orgánicos. Los círculos rojos denotan transportadores. PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa; PK: piruvato kinasa; PDH: piruvato deshidrogenasa; MDH: malato deshidrogenasa; CS: citrato sintasa.

Si bien la producción de citrato y malato se da a nivel mitocondrial, la acumulación de ellos se produce en el citoplasma. La salida de este tipo de aniones orgánicos está dada por transportadores tanto generales para ácidos tricarbónicos, como específicos para un anión en particular (Picault, 2002). Recientemente se ha descrito, por ejemplo, un transportador mitocondrial de citrato en maíz (Genchi *et al.*, 1999).

La generación de plantas transgénicas sobreproductoras de ácidos orgánicos, se ha realizado utilizando promotores constitutivos, lo que significa que la expresión del gen introducido se produce en todo momento y tejido. Esto podría significar un gran costo energético para la planta, el cual se hace importante especialmente en especies de interés agronómico, como es el trigo. Una solución para este problema es dirigir la expresión del gen introducido, en el momento y en el tejido que se desee.

En general, las estrategias utilizadas por las plantas para acceder al fósforo, se manifiestan en regiones determinadas de la planta, y con una intensidad controlada. Para sobreexpresar un gen de interés, y de esta manera emular alguna estrategia para acceder al fósforo, se debería restringir la expresión génica a condiciones de carencia de fósforo, y en las zonas donde se produce su adquisición, las raíces, mas que inducirse de manera sistémica. Para encontrar promotores que dirijan la expresión génica de una manera en particular, un primer paso consiste en buscar genes que se expresen de esa misma forma. La información disponible hoy en día, con la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* y arroz (*Oryza sativa*), además de los diferentes experimentos de genómica funcional presentes en la literatura, han brindado información importante acerca de la expresión de algunos genes (Hammond *et al.*, 2003).

Si bien, ante una situación de estrés como es el caso de una carencia de fósforo, se produce una regulación concertada de más de setenta genes, algunos de ellos de respuesta general a estrés, se han encontrado algunos con respuesta más específica (Raghothama, 1999). Se han clonado y caracterizado algunos de ellos, y se ha visto que se relacionan con distintas funciones, como por ejemplo, genes de respuesta a estrés (Ma

*et al.*, 2003), fosfatasas ácidas (Haran *et al.*, 2000), RNAsas (Bartola *et al.*, 1994) y transportadores de fosfato de alta afinidad (Wu *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis thaliana* se han descrito hasta ahora nueve miembros de transportadores de fosfato de alta afinidad, conocidos como PHT1 (Smith *et al.*, 1997; Karthikeyan *et al.*, 2002; Mudge *et al.*, 2002). Existen también transportadores de fosfato de baja afinidad (PHT2), encargados del transporte de fósforo basal, en condiciones de suficiencia (Daram *et al.*, 1999; Bucher *et al.*, 2001). Los transportadores de fosfato de alta afinidad son proteínas que poseen doce segmentos transmembrana, con un loop hidrofílico en su parte central. Esta conformación ha sido bastante conservada entre transportadores de otras especies (Muchhal *et al.*, 1999), como es el caso del transportador PHO84 de levadura, cuyas mutantes defectivas en él, se utilizan para estudios de complementación (Muchhal *et al.*, 1996). Este tipo de proteínas se ha relacionado con la adquisición y tráfico de fósforo por parte de la célula.

Cuando existe una carencia de fósforo, se produce una sobreexpresión de los transportadores de fosfato de alta afinidad, con el propósito de captar más eficientemente las bajas concentraciones disponibles. Se ha descrito que algunos de estos transportadores, además de ser específicos ante una carencia de este nutriente, se expresan solo en raíces. Esta característica los hace un modelo muy atractivo para el aislamiento de sus promotores en especies con su genoma secuenciado, como es el caso de *Arabidopsis thaliana*. En esta especie, por lo tanto, se cuenta con la información completa de la secuencia de los promotores de transportadores de fosfato de alta afinidad.

Recientemente en *Arabidopsis thaliana* se han construido fusiones entre los promotores de miembros de PHT1 con genes reporteros, como por ejemplo el que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP), la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), y el gen que codifica para la enzima luciferasa, con lo que se ha determinado que PHT1;2 y PHT1;4 tienen una expresión específica de raíz y modulada por la disponibilidad de fósforo (Karthikeyan,

2002; Mudge *et al.*, 2002). Para el caso del trigo, se ha realizado una búsqueda en la base de datos de Genbank, encontrándose 2 transportadores de fosfato: TaPT1, del cual se tiene solo una secuencia parcial interna, y TaPT2, del cual se encuentra la secuencia completa del ADNc.

Un alto porcentaje de las secuencias de trigo disponibles en Genbank, provienen de proyectos de secuenciación de ESTs, incluyendo las secuencias de TaPT1 y TaPT2. Las secuencias no codificantes, como por ejemplo regiones intergénicas, intrones, o regiones no traducidas, no son tan comunes para esta especie.

Los promotores de transportadores como TaPT1 y TaPT2 podrían compartir algunas características en general, en cuanto a la presencia de elementos cis regulatorios. En *Arabidopsis* ya se han encontrado algunos motivos conservados con promotores de levadura (Mukatira *et al.*, 2001). Estos elementos, son sitios de unión para factores de transcripción, los cuales son responsables directos de la regulación pre-transcripcional. La interrogante que aparece es acerca de la presencia y conservación de este tipo de motivos a través de especies vegetales no muy relacionadas entre si.

En la actualidad, ya se conocen algunas zonas del genoma de plantas como *Arabidopsis thaliana*, las cuales corresponden a secuencias regulatorias para genes expresados ante una carencia de fósforo en raíces. Esta información ha permitido encontrar experimentalmente e *in silico* secuencias que sirven como sitios de unión para factores de transcripción. Recientemente se ha descrito en *Arabidopsis thaliana*, un gen que codifica para un factor de transcripción de tipo MYB, el cual está involucrado en la regulación de genes expresados en carencia de fósforo en la totalidad de las plantas observadas, es decir, sin especificidad de tejido (Rubio *et al.*, 2001). La putativa secuencia promotora permitirá generar información para entender la regulación de este tipo de genes en trigo, una especie de la cual se conoce poco acerca de regiones no codificantes. Se buscarán también posibles sitios de unión para factores de transcripción, de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas mas estudiadas, como por ejemplo arroz y maíz.



Una obtención y posterior evaluación funcional de los promotores, podría permitir regular diferencialmente un gen de interés para optimizar la obtención de fosfato a nivel radical. Genes blanco para este tipo de regulación, son los que codifican para proteínas pertenecientes a la vía metabólica responsable de la formación de ácidos orgánicos, como por ejemplo la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la malato deshidrogenasa o la citrato sintasa.

En el presente trabajo de tesis, se evaluará 1) si alguno de los transportadores de fosfato de trigo estudiados (TaPT1 y/o TaPT2) cumple con las características de ser expresado en raíz, ante una carencia de fosfato. Con esta información 2) se clonarán sus putativos promotores, para luego 3) generar constructos entre el promotor y un gen reportero y ver si mantienen una relación funcional en la regulación que producen sobre el gen.

Los promotores de trigo están llamados a cumplir un importante papel en la optimización de cultivos de cereales, al poder controlar la expresión de genes de interés en el momento y el tejido que se desee. La secuencia río arriba del gen TaPT2 obtenida en este trabajo sería un primer paso para generar este tipo de plantas. El proyecto FIA en el cual está inserto este trabajo, contempla la utilización de el promotor de TaPT2, como regulador de la expresión de una enzima involucrada en la biosíntesis de ácidos orgánicos.

## 2.- HIPÓTESIS

- Los putativos transportadores de fosfato de alta afinidad de trigo (TaPT1 y TaPT2) se expresan de manera específica en raíz y están regulados negativamente por disponibilidad de fósforo en *Triticum aestivum*.

## 3.- OBJETIVOS

### 3.1.- Objetivo General

- Estudiar la estructura y función de los putativos promotores de transportadores de fosfato de alta afinidad de trigo *in vivo*.

### 3.2.- Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión de los genes TaPT1 y TaPT2 bajo condiciones de carencia y suficiencia de fósforo.
2. Aislar el o los promotores más promisorios de los genes TaPT1 y TaPT2.
3. Subclonar el promotor río arriba del gen reportero *gus*.
4. Transformar *Arabidopsis thaliana* y *Triticum aestivum* con el vector obtenido, para un estudiar la actividad del promotor.
5. Realizar un análisis de secuencias *in silico*, para localizar elementos cis regulatorios de promotores en plantas mono y dicotiledóneas.

## **4.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1.- Material vegetal y condiciones de crecimiento**

#### **4.1.1.- Crecimiento de *Arabidopsis thaliana* en tierra**

Para el presente trabajo de tesis se utilizó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se sembraron en vasos de 20 mL, en tierra de hoja de litre (Anasac) y vermiculita en relación 3:2, respectivamente, previamente esterilizada en autoclave durante 90 minutos a 125°C. Los vasos con la mezcla y las semillas se mantienen por un período de 48 horas a 4°C, con el propósito de sincronizar su germinación. Las semillas se germinaron en una cámara de crecimiento controlado, a 23°C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz a 104  $\mu$ einstein y 8 horas de oscuridad. La germinación se produjo a la segunda semana, y posteriormente se mantuvieron con un régimen de riego de dos veces por semana.

#### **4.1.2.- Crecimiento de *Arabidopsis thaliana* en condiciones estériles**

Se realizó un lavado de las semillas por 5 minutos con etanol 70 %, un segundo lavado de 15 a 20 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % y SDS al 1 %, con una agitación constante en ambos casos. Luego se realizaron 5 lavados con H<sub>2</sub>O estéril. Las semillas esterilizadas se sembraron en una placa de medio MS agar (Murashige y Skoog, 1962): 4,31 g/L de mezcla de sales Murashige y Skoog y 0,8 % agar (pH 5,8), suplementado con 1% sacarosa. Para seleccionar plantas transformadas, se suplementó el medio con 50  $\mu$ g/ $\mu$ L Kanamicina. Las placas se mantuvieron en oscuridad por un período de 48 horas, a 4°C, para luego traspasarlas a una cámara de crecimiento a 23°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz por 7 a 10 días. Luego, las plantas se traspasaron a la mezcla descrita en la sección anterior.

#### **4.2.- Material microbiológico, medios y condiciones de cultivo**

Las bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$ , se crecieron en medio LB líquido (1% triptona; 0,5% extracto de levadura; 1% NaCl; en agua destilada) y en LB sólido 1,5% agar. La incubación se realizó a 37°C por 16 horas para *E. coli*. Para *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, se utilizó una temperatura de incubación de 28°C por 16 horas en medio LB. La velocidad de agitación para ambas bacterias fue de 250 rpm. Los antibióticos de selección utilizados para *E. coli* se escogieron según el gen de resistencia que posea el DNA plasmidial a utilizar, y en este trabajo de tesis fueron: ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y kanamicina (50  $\mu$ g/mL). Para *A. tumefaciens*, se utiliza rifampicina (10 $\mu$ g/mL) y gentamicina (100  $\mu$ g/mL). Para seleccionar los *Agrobacterium* que portan un vector binario, se utiliza, además de los antibióticos mencionados, kanamicina (50  $\mu$ g/mL).

#### **4.3.- Preparación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ competentes**

Las células se prepararon según Inoue *et al.* (1990). A partir de una colonia individual de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se inocularon 3 mL de medio LB y se incubaron a 37°C por 16 horas con agitación de 250 rpm. Se agregó 1 mL de este cultivo a un volumen de 250 mL de medio LB, el cual se creció a 25°C hasta D.O.<sub>-600</sub> de 0,6. Se incubó por 10 minutos en hielo, y se traspasó a un tubo de centrifuga previamente frío. Se centrifugó a 2.500 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 20 mL de tampón TB previamente frío (preparado con una solución 10 mM PIPES; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl ajustando a pH 6,7 con 5N KOH y agregando MnCl<sub>2</sub> hasta una concentración de 55 mM ). Se centrifugó nuevamente a 2.500 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en tampón TB preenfriado. Se adicionó DMSO hasta una concentración del 7% y se separaron alícuotas de 200  $\mu$ L en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL, previamente fríos. Se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C.

#### **4.4.- Transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ por estrés térmico**

El procedimiento se realizó según Inoue *et al.* (1990). Se incubaron en hielo 50  $\mu$ L de células competentes con aproximadamente 10 ng de ADN plasmidial (en volumen de 1  $\mu$ L) por 30 minutos. Se traspasó a 37°C por 5 minutos, para producir el estrés térmico. Se enfrió en hielo, por 1 minuto. Se agregó 1 mL de medio LB, y se dejó a 37°C con agitación de 250 rpm, por 1 hora. Terminado este tiempo, se colectaron las células por centrifugación por un período de 20 segundos a 10.000 g, y se descartó el sobrenadante mediante inversión suave del tubo, lo cual deja un remanente de aproximadamente 100  $\mu$ L. Las células se resuspendieron por pipeteo suave, y se plaquearon en LB-agar, suplementado con el antibiótico correspondiente a la resistencia del ADN plasmidial.

#### **4.5.- Extracción de ADN plasmidial desde *E. coli* DH5 $\alpha$**

El procedimiento se realizó según Berger *et al.*, 1994. Se creció *E. coli*, la cual portaba el plásmido de interés en 4 mL de medio LB, suplementado con el antibiótico apropiado, a 37°C por 16 horas, con agitación de 250 rpm. Se traspasaron 1,5 mL del cultivo a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 10.000g por 20 segundos. Se descartó todo el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100  $\mu$ L de GTE (50 mM glucosa; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0) mediante una mezcla por vortex. Se añadieron 200  $\mu$ L de tampón de lisis (0,2 M NaOH; 1% SDS) y se invirtió el tubo dos veces para mezclar. Luego se adicionaron 150  $\mu$ L de solución 5M acetato de potasio (se preparó mezclando 60 mL de 5M acetato de potasio; 11,5 mL de ácido acético glacial y 28,5 mL de H<sub>2</sub>O) y se agitó vigorosamente con la mano. Esta mezcla se centrifugó por 10 minutos a 10.000g. El sobrenadante se recuperó cuidadosamente con una micropipeta, evitando remover el precipitado, y se depositó en un tubo nuevo. Los ácidos nucleicos se precipitaron utilizando 1 mL de etanol 95% y se mezcló invirtiendo un par de veces el tubo. Se centrifugó durante 1 minuto para obtener el precipitado que corresponde a ADN plasmidial

y ARN. El sobrenadante fue descartado y el pellet se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió en un volumen de H<sub>2</sub>O variable (de 50 a 200 µL), conteniendo 10 µg/mL RNAsa A. El ADN obtenido en este punto puede ser rutinariamente usado en reacciones de PCR y digestión por endonucleasas.

#### **4.6.- Crecimiento de trigo en condiciones de carencia y suficiencia de fósforo**

El crecimiento de las plantas se realizó según Peñaloza *et al.*, 2002. Para obtener ARN de trigo, con el propósito de estudiar la expresión de los genes de interés, en suficiencia y carencia de fósforo se crecieron plantas de trigo, en las condiciones que se describen a continuación: semillas de trigo fueron germinadas en papel filtro húmedo. Luego, plántulas de 5 días, fueron trasplantadas a un contenedor lleno con solución nutritiva aireada sin fósforo, compuesta de 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 3 mM KNO<sub>3</sub>; 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>); 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,07 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>; 22 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,6 mM ZnSO<sub>4</sub>; 0,4 mM CuSO<sub>4</sub>; 2,0 mM MnSO<sub>4</sub> y 20 mM Fe EDTA. La solución nutritiva se cambió cada 7 días, y el pH se ajustó diariamente a 5,8 con 1M KOH. Para los casos con suficiencia de fósforo, las plantas fueron mantenidas con un aporte de 0,1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

#### **4.7.- Extracción de ARN desde plantas de trigo**

Hojas o raíces de trigo (100 mg) fueron pulverizadas utilizando un motor "Kontes pestle", con nitrógeno líquido. Luego se agregó 1 mL de reactivo Trizol de Invitrogen, una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Chomczynski, 1987). El homogeneizado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se le añadieron 0,2 mL de cloroformo, y se agitó vigorosamente. La muestra se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugó a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. La mezcla se separó en tres fases, siendo la superior (acuosa) la que contiene el ARN. Esta fase se transfirió a un nuevo tubo y se agregaron 0,5 mL de isopropanol. Posteriormente se incubó durante 10 minutos a

temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se obtuvo el pellet de ARN, el cual se lavó con 1 mL de etanol 70%, en H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. La resuspensión se mezcló en un vortex y se centrifugó a 4°C por 5 minutos a 7.500 g. El sobrenadante se descartó y se secó el pellet a temperatura ambiente por 10 minutos. El pellet fue disuelto en agua DEPC y se incubó durante 10 minutos a 60°C. El ARN se cuantificó espectrofotométricamente, utilizando un equipo Perkin Elmer Lambda EZ201, obteniendo el valor de la absorbancia a 260 nm, multiplicándolo por el factor de dilución y por 50, lo cual entrega la concentración en µg/µL.

#### **4.8.- Extracción de ADN desde hojas de trigo.**

Cien a 300 mg de tejido joven de hojas de trigo de aproximadamente 3 semanas, se depositaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Se pulverizó con un motor "Kontes pestle" el tejido enfriado con nitrógeno líquido. Se le añadieron 500 µL de tampón de extracción precalentado a 65°C (preparado con una solución 500 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 0,84% SDS, la cual se llevó hasta un 90% del volumen, se equilibró a 65°C, y se le añadieron 0,38 g de bisulfito de sodio por cada 100 mL de tampón, el cual se ajustó a pH 7,8 aún tibio). Se agitó con vortex hasta resuspensión y se incubó a 65°C por 45 minutos, mezclando suavemente en un vortex cada 10 minutos. Se dejó enfriar levemente y se le agregaron 500 µL de solución de cloroformo-álcohol isoamílico en proporción 24:1. Se agitó vigorosamente con vortex hasta homogeneidad. El tubo se centrifugó a 10.000g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperaron 400 µL de sobrenadante y se depositaron en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, conteniendo 1 mL de etanol 95%. La mezcla se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se invirtió varias veces suavemente. Luego se centrifugó brevemente 10 segundos a 10.000 g, y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol 70%

hasta que quedó limpio y blanco, y luego se centrifugó nuevamente por 10 segundos a 10.000 g. Luego se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O con 10  $\mu$ g/mL RNAsa A.

#### **4.9.- “Genome Walker” o Caminata Genómica**

##### **4.9.1.- Generación de librerías genómicas**

Para amplificar y clonar promotores de trigo, se utilizó el ensayo de “Genome Walker” (Siebert, 1995), para esto se debe disponer de librerías genómicas, las cuales consisten en una fusión entre un adaptador y un segmento de ADN genómico, lo cual representa el genoma completo del organismo en cuestión. Se construyeron 10 librerías genómicas diferentes. Para realizarlo, se digirió con una enzima de restricción de corte romo, veinticinco microlitros de ADN genómico de trigo, a una concentración de 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ L (las enzimas utilizadas fueron: Dral, EcoRV, PvuII, StuI, SspI, SmaI, MscI, ScaI, Eco105I y HpaI, las que generaron las librerías DL1 a DL10, respectivamente). El ADN que fue digerido se purificó mediante una extracción orgánica con 1 volumen de fenol, luego una extracción con 1 volumen de cloroformo, y se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 95%, 0,1 volumen de 3M NaOAc (pH 4,5) y 20  $\mu$ g de glicógeno, luego el pellet se lavó con 100  $\mu$ L de etanol 80%. El pellet fue resuspendido en 20  $\mu$ L de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA, pH 8,0; se lleva a pH 7,5). El ADN cortado y purificado se ligó al adaptador para las reacciones de PCR sucesivas.



#### 4.9.2.-Amplificación de putativas secuencias promotoras o Caminata

##### Genómica

Para amplificar la secuencia 5' río arriba del sitio de inicio de la traducción para TaPT1, se diseñaron los partidores PT1-GSP1 (5'-TGTGCCGCAGAAG GCGACGCCGTTGA-3') y PT1-GSP2 (5'-GTCCGCCCTTCCC GGTAGTAGTAGAT-3'), y para TaPT2, PT2-GSP1 (5'-AGCCGAAGAAGAG CTGGCCGGCAAGTGT-3') y PT2-GSP2 (5'-CTCGTTGAGGGC AGGGTCGGTGTAGTA-3'). Con las librerías genómicas, se realizaron reacciones sucesivas de PCR. La primera de ellas se realizó con 1  $\mu$ L de la librería, y utilizando la enzima "Synergy DNA polymerase" de Genecraft, haciendo "hot start" manualmente. Se le llama "hot-start" al inicio de la reacción de PCR, por adición de la polimerasa o activación de ella, en el momento en que se alcanza el primer pico de temperatura, normalmente a un promedio de 90°C. Las condiciones para esta amplificación fueron: 1 ciclo a 93°C por 30 segundos, seguido de 5 ciclos a 72°C por 15 minutos y 93°C por 30 segundos, luego, 25 ciclos a 67°C por 15 minutos y 93°C por 30 segundos. La segunda amplificación se llevó a cabo usando la mezcla de enzimas "Advantage Genome Polymerase Mix" de Clontech, la cual posee actividad de "hot start" automática. El primer PCR se realiza utilizando los partidores GSP1 y AP1 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), este último destinado a unirse al adaptador. Las condiciones para la segunda amplificación fueron: 1 ciclo a 93°C por 30 segundos, seguido de 5 ciclos a 72°C por 3 minutos y 94°C por 3 segundos, luego, 25 ciclos a 67°C por 3 minutos y 94°C por 3 segundos. El segundo PCR se realiza utilizando los partidores GSP2 y AP2 (5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'). En los casos señalados, los amplificados se clonaron en el vector pGEM-T de Promega y se secuenciaron.

#### **4.10.- Análisis de expresión génica mediante Northern**

El procedimiento se realizó según Silva *et al.*, 1999. Veinte microgramos de ARN total por muestra fueron denaturados por 10 minutos a 70°C, mezclado con 15 µL de tampón para carga (65% Formamida; 22% Formaldehído; 13 % MOPS 10X, pH 8,0), separados por electroforesis en un gel 1,5% agarosa y 3% formaldehído y transferidos a una membrana de nylon Hybond (Amersham Biosciences). El ARN unido a la membrana, fue inmovilizado por luz ultravioleta en un transiluminador Spectroline TS-312A de 312 nm. La membrana fue prehibridizada por 2 horas en solución de prehibridización, la cual contiene 5X SSC (1X SSC es 0,15 M NaCl y 0,015 M de citrato de Sodio), 50 mM fosfato de sodio (pH 6,8), solución de 5X Denhart (1X solución de Denhart: 0,02% Ficoll; 0,02% PVP y 0,02% BSA), 1 mM EDTA (pH 8,0); 1% SDS y 10 µg/mL de ADN de espermio de salmón. La hibridización se realizó por 16 horas en solución de hibridización, la que posee los mismos componentes que la solución de prehibridización, con la diferencia que el SDS está a una concentración de 0.1%. Luego se añadió una sonda de ADN denaturado y marcado con <sup>32</sup>P-dCTP, usando el kit Hexalabel de Fermentas. Luego de esto, la membrana fue lavada a 65°C en 5X SSC con 0.1% SDS por 15 minutos, y luego en 2X SSC con 0.1% SDS por 30 minutos, lo cual es un lavado con estrictez media. La radioactividad fue detectada por autorradiografía.

#### **4.11.- Análisis de transcripción reversa con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

Se utilizaron 2,5 µg de ARN total extraído desde raíz y hojas de trigo en condiciones de carencia o suficiencia de fósforo, como templado para reacciones de transcripción reversa. Se utilizó “RevertAid H Minus M-MuLV reverse transcriptase” de Fermentas para realizar los ensayos, según instrucciones del fabricante. Para generar el ADN

complementario, se utilizaron oligonucleótidos de secuencias poli T. Los partidores usados para amplificar los segmentos internos de TaPT1 fueron:

449F-TaPT1 (5'-TCGTCACGCTCATCGTC-3') y 776R-TaPT1 (5'-GAAGAGCCCGAACGAGT-3'), generando un fragmento amplificado de 327 pares de bases, y para TaPT2 95F-PT2 (5'-ACAGCTCAACGTGTTG-3') y 612R-PT2 (5'-TGATCGTGACAATAGT-3'), generando un amplificado de 526 pares de bases. Estos partidores también fueron utilizados para amplificar las sondas utilizadas en el análisis por "Northern".

#### **4.12.- Electroforesis en geles de agarosa para análisis de ADN**

Para el trabajo de tesis, se utilizaron geles de agarosa desde 0.8% a 2.5%, según cada caso, en tampón TAE 1X (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA pH 8,0) con bromuro de etidio. Como estándar de peso molecular se utilizó "1kb DNA ladder" o "100 pb DNA ladder" de Invitrogen, a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L según el tamaño del fragmento de ADN a visualizar. Los geles fueron corridos en una cámara BioRad Minisub Cell G1, con una fuente de poder BioRad Powerpac 300 a 90 V de potencia.

#### **4.13.- Digestión de ADN con endonucleasas de restricción**

Las digestiones se realizaron utilizando 2 unidades de enzima por cada 0.5  $\mu$ g de ADN, en un volumen variable, con 10  $\mu$ L como mínimo, e incubando a lo menos por 1 hora a la temperatura recomendada para la enzima. Una unidad de enzima digiere aproximadamente 1  $\mu$ g de ADN del fago  $\lambda$ , en 1 hora (definido según estándares Invitrogen).

#### **4.14.- Ligación de ADN utilizando T4 ADN ligasa**

Las ligaciones de insertos de ADN con un vector, previamente preparado por digestión con endonucleasas, se realizaron con proporciones variables entre ellos, siendo la más usual 1:3, utilizando 2,5 unidades de "T4 DNA ligase" de Fermentas, en un volumen de 20  $\mu$ L, a 16°C por 16 horas.

#### **4.15.- Reacción en cadena de la Polimerasa.**

Se utilizaron como templado 10 a 100 ng de ADN (genómico o plasmidial), los cuales se agregan a una solución con 10 picomoles de partidores previamente diseñados y 0,2 mM dNTPs. Al usar "Pfu DNA polimerasa", la solución contenía 2 mM  $MgSO_4$ , y al utilizar "Taq DNA polimerasa", contenía 2 mM  $MgCl_2$ , además del tampón correspondiente a la enzima en uso en concentración 1X. Las amplificaciones se realizaron en termocicladores MJ Research modelos PTC-100 y Minicycler.

#### **4.16.- Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101**

El procedimiento se realizó según Chen *et al.* (1994). Se crece un cultivo bacteriano de 3 mL, a partir de una colonia individual por aproximadamente 16 horas, a 28°C en medio LB con agitación a 250 rpm. Se inoculan 2 mL de este cultivo en 50 mL de medio LB, y se deja a 28°C con la misma agitación hasta una  $D.O_{600}$  de 0,5. Luego, las bacterias se enfrían en hielo por 10 minutos y se centrifugan a 3.000 g por 5 minutos. El pellet se resuspende en 1 mL de 20 mM  $CaCl_2$  y se preparan alícuotas de 200  $\mu$ L en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL previamente enfriados a -20°C. Los tubos se almacenan a -80°C hasta su uso.

#### **4.17.- Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101**

El procedimiento se realizó según Chen *et al.* (1994). Se mezclan 100  $\mu$ L de células competentes de *Agrobacterium* con 1  $\mu$ L del vector de interés, a una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. Se congela con nitrógeno líquido por 5 minutos y luego se incuba a 37°C por 25 minutos. Se agrega 1 mL de LB y se incuba durante 3 horas a 28°C con agitación constante. Luego, se colectan las células por centrifugación a 10.000g por 20 segundos, para posteriormente descartar el sobrenadante mediante una inversión del tubo, lo cual deja un remanente de aproximadamente 100  $\mu$ L. Se resuspenden suavemente las células mediante pipeteo y se plaquean en LB agar suplementado con los antibióticos Rifampicina, Gentamicina y Kanamicina, a las concentraciones descritas en la sección “Material microbiológico, medios y condiciones de cultivo”.

#### **4.18.- Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión floral**

El procedimiento se realizó según Clough y Bent (1998). Se utilizan plantas de *Arabidopsis thaliana* de 6 semanas de edad, con inflorescencias de 10 centímetros de largo, a las cuales se les cortaron las silicuas ya formadas. Se transformó con *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, el cual porta el vector binario de interés. El cultivo de *Agrobacterium* se inicia con un preinóculo, a partir de una colonia individual, crecido por 48 horas a 25°C con una agitación de 250 rpm en medio LB suplementado con gentamicina, rifampicina y kanamicina. Se transfieren 100  $\mu$ L de este cultivo a 250 mL de medio LB con los mismos antibióticos, el cual se incubó a 25°C con agitación de 250 rpm, hasta D.O.<sub>600</sub> de 0,8. Se centrifugó por 10 minutos a 6.000 g a 4 °C, para obtener las células, las cuales se resuspendieron en 250 mL de H<sub>2</sub>O con sacarosa 5% p/v y Silwett L-77 0,05% v/v. Se sumergieron las inflorescencias de las plantas en esta solución, durante 15 segundos, para luego ser llevadas a oscuridad por 16 horas. Las plantas se

transfirieron a una cámara con las condiciones de crecimiento de luz y temperatura ya descritas para *Arabidopsis*, a la espera de la recolección de semillas, lo cual sucede al secarse las silicuas formadas por las flores tratadas con la solución de *Agrobacterium*. Las semillas obtenidas se sembraron en condiciones estériles, en medio MS, suplementado con kanamicina (50 µg/mL), para seleccionar las transformantes. Las plántulas que crecieron, se traspararon a la mezcla de tierra de hojas, para continuar su crecimiento y obtener semillas.

#### **4.19.- Análisis de secuencias “*in silico*”**

Para predecir los segmentos transmembrana, se utilizó la herramienta Tmpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)).

Para encontrar posibles sitios de unión a factores de transcripción, se utilizaron las herramientas PLANTCARE (<http://oberon.fvms.ugent.be:8080/PlantCARE/>), PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>), y TRANSFAC (<http://transfac.gbf.de/>).

## 5.- RESULTADOS

### 5.1.- Análisis de las secuencias de transportadores de fosfato

Para encontrar secuencias de genes de trigo que posiblemente tuvieran funciones similares a aquellos que codifican para transportadores de fosfato de alta afinidad de otras especies, se realizó una búsqueda en la base de datos de Genbank. El resultado fue una secuencia de ADNc parcial que codifica para un transportador de fosfato (TaPT1), número de acceso AF110180, además de una secuencia completa de ADNc que codifica para un transportador de fosfato inorgánico (TaPT2), número de acceso AJ344240. Las secuencias aminoacídicas entregadas por la base de datos para TaPT1 y TaPT2, se compararon con las secuencias de transportadores de fosfato de alta afinidad de *Arabidopsis thaliana*, PHT1;2 y PHT1;4, las cuales, se expresan específicamente en raíces, ante una carencia de fósforo (Mudge *et al.*, 2002). La comparación entre las secuencias aminoacídicas de los dos transportadores de fosfato de *Arabidopsis* y los dos de trigo, muestra una conservación general entre ellas. El alineamiento muestra zonas en las cuales las secuencias son idénticas, y algunas zonas de menor longitud en que las secuencias difieren casi totalmente (Figura 2). El porcentaje de homología promedio entre estas secuencias es de casi un 83%. Esta información, sumada a la entregada por la comparación de los patrones de hidrofobicidad (Figura 3), hacen suponer que las características de tipo estructural para estos transportadores se mantienen. La predicción de la topología por medio este tipo de perfiles, arroja una disposición de doce segmentos transmembrana, los seis primeros, unidos a los segundos mediante una zona hidrofílica.

### 5.2.- Análisis de la expresión de los transportadores de fosfato de trigo.

*Northern Blot*

Con el propósito de analizar la presencia de transcritos, producto de los genes que codifican para transportadores de fosfato de alta afinidad en trigo, se realizó un análisis de tipo Northern. Se extrajo ARN total desde hojas y raíces de trigo en plantas mantenidas sin fósforo durante 5 y 7 días. Este tipo de análisis requiere que las sondas de ADN amplificadas y posteriormente utilizadas para hibridar el ARN total, difieran entre sí. De esta forma no se produce un reconocimiento cruzado o inespecífico. La expresión diferencial se comparó con una hibridación con una sonda para ARN ribosomal 18S de *Arabidopsis thaliana*, presente en el laboratorio. También se generó una sonda correspondiente al gen de actina de trigo (ver anexo). Aunque los partidores usados para amplificar las sondas (449F-TaPT1, 776R-TaPT1 y 95F-PT2, 612R-PT2) fueron diseñados desde zonas en las cuales no había homología entre ambas secuencias, los amplificadores resultaron ser casi idénticos, con una identidad de un 93%. Debido a esto, no se pudo discriminar por esta técnica entre la expresión de TaPT1 y TaPT2. Sin embargo, las sondas permitieron dar cuenta que los transcritos de TaPT1 y TaPT2 en conjunto son expresados diferencialmente (Figura 4). En condiciones de carencia de fósforo, se aprecia un aumento en la expresión de los genes que codifican para transportadores de fosfato, tanto a 5 como a 7 días después de la privación. En el caso de las hojas, no se aprecia una acumulación de ARN mensajero tanto en presencia como en ausencia de fósforo. Estos resultados sugieren una expresión específica de raíz para los genes TaPT1 y TaPT2 por separado o en conjunto.

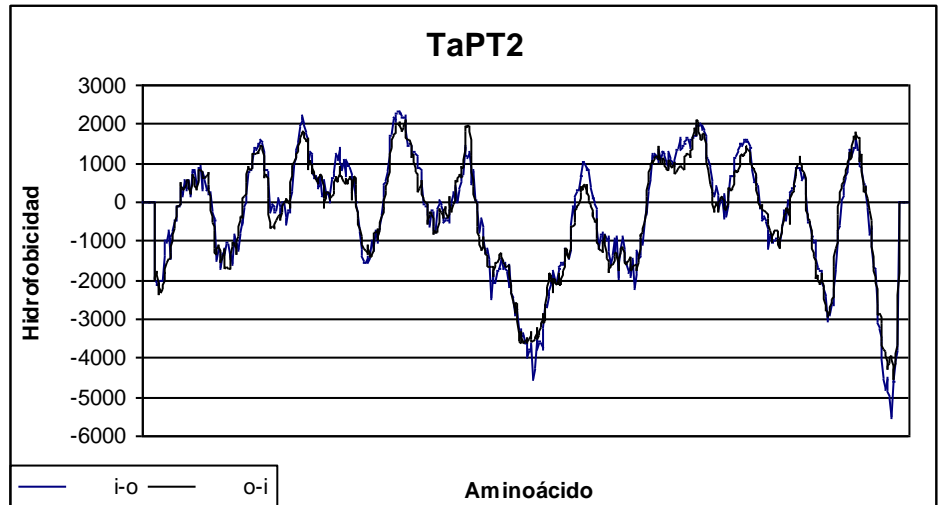
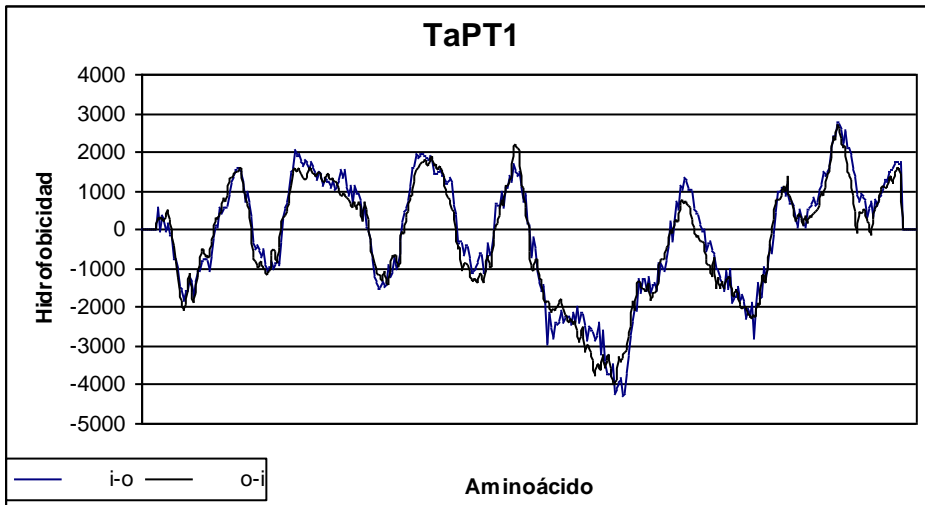
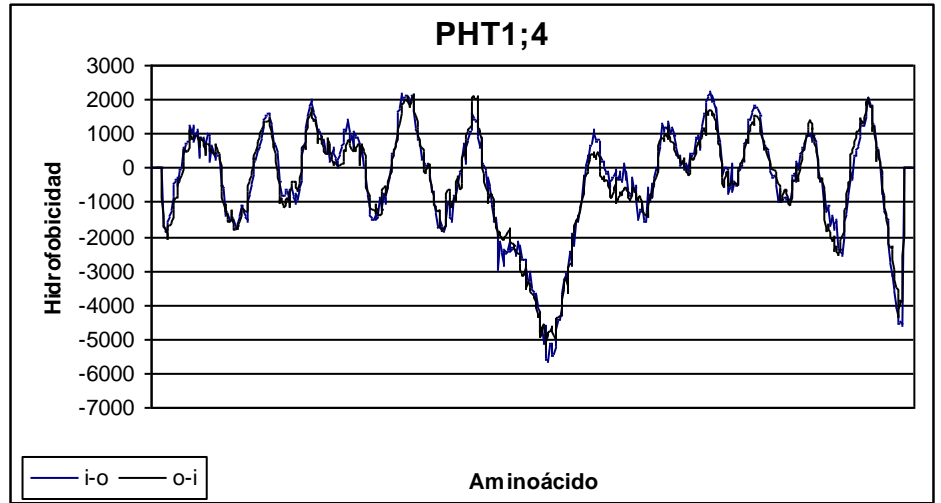
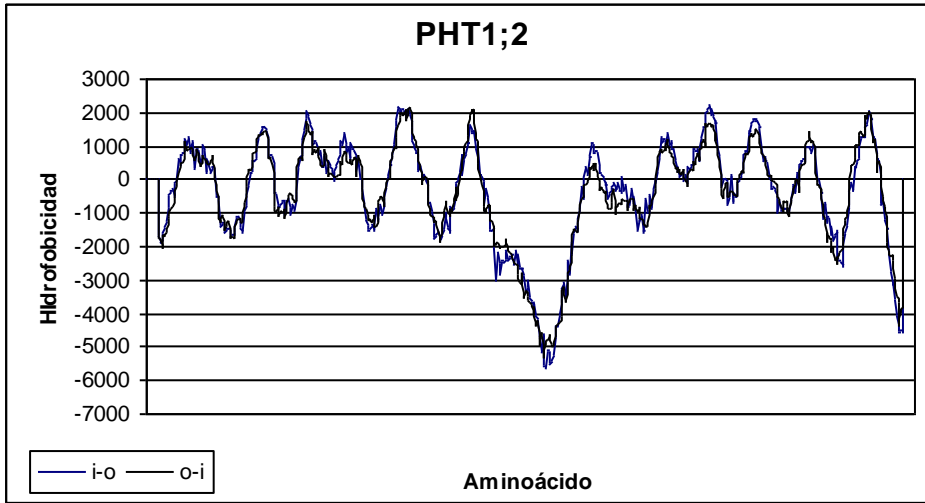
#### *RT-PCR*

Debido a que el ensayo Northern no permitió discriminar entre la expresión de TaPT1 y TaPT2, por la similitud de las sondas utilizadas para cada uno, se requirió el uso de una técnica que proporcionara la especificidad necesaria. Para determinar exactamente a que gen correspondía la expresión diferencial en estas condiciones, se realizó un ensayo de RT-PCR. Se comenzó utilizando ARN total, extraído desde raíces y hojas, con una

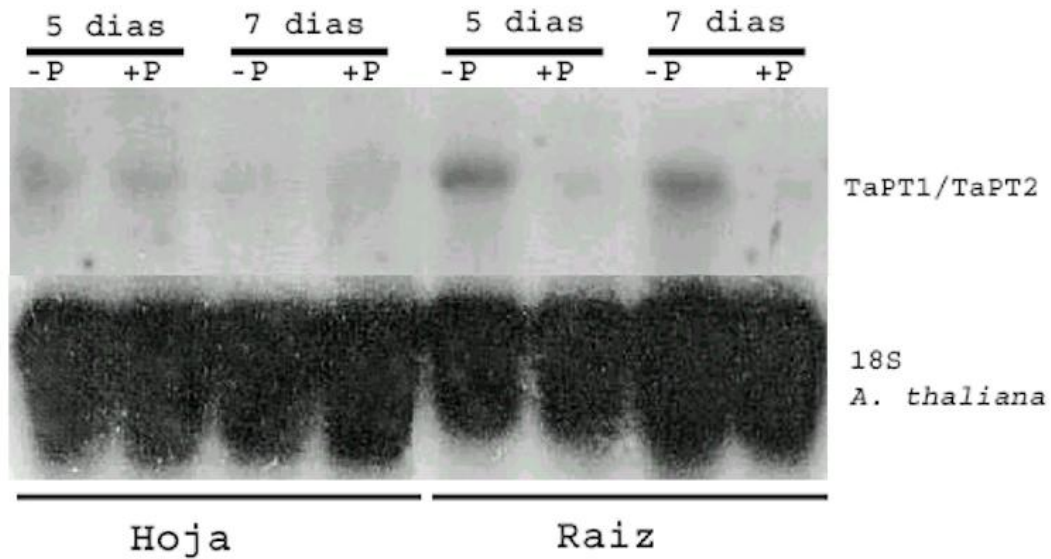


carencia de fósforo de 7 días, y se generó ADNc, el que sirvió como templado para una reacción de PCR. Para el ensayo de Northern Blot, la hibridización de las sondas no resulta específica, sin embargo, para la reacción de RT-PCR, la zona de unión de los partidores es distinta, por lo cual, el evento de amplificación permite discriminar entre TaPT1 y TaPT2 (Figura 5). Para el caso de TaPT2, se puede apreciar una amplificación específica en raíces, ante una carencia de fósforo, sin haber amplificación desde el ADNc obtenido desde ARN total de hojas. En presencia de fósforo casi no se aprecia amplificación en raíces. Para el caso de TaPT1, si bien es apreciable una especificidad de expresión ante una carencia de fósforo, ésta no resulta específica de raíces. Los tamaños aproximados de los amplificados para TaPT1 y TaPT2, se correlacionan con los esperados, 327 pb y 517 pb, respectivamente.





**Figura 3: Perfiles de hidrofobicidad de los transportadores de fosfato de *Arabidopsis thaliana* (PHT1;2 y PHT1;4), y de trigo (TaPT1 y TaPT2).** Comparación de los perfiles de hidrofobicidad de los transportadores de fosfato de alta afinidad de *Arabidopsis*, PHT1;2 ( gráfica superior izquierda), PHT1;4 ( gráfica superior derecha); y trigo, TaPT1 ( gráfica inferior izquierda), y TaPT2 ( gráfica inferior derecha). Un número mayor en la ordenada, indica mayor hidrofobicidad. Los perfiles se realizaron utilizando la herramienta Tmpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)).



**Figura 4: Análisis de la expresión de TaPT1 y TaPT2 mediante Northern.** Se cargaron veinte microgramos de ARN total en un gel de agarosa formaldehído y se transfirió a una membrana de nylon, en la cual fue fijado e hibridado con sondas marcadas con  $^{32}\text{P}$ , con especificidad para los transportadores de fosfato 1 y 2 de trigo (ver sección correspondiente en resultados); Como controles de carga, se utilizaron sondas de una putativa actina de trigo y ARN ribosomal 18S de *Arabidopsis*.



```

Triticum aestivum high-affinity phosphate transporter PT1 mRNA,
partial cds.
ACCESSION AF110180
ORIGIN
  1 ttcttcacag atgcatacga cctctttctgc atctccctcg tcaccaagct gctcggccgc
  61 atctactact accgggaagg ggcggacgcg cccggctcgc tgccgcccaa cctcggccgc
 121 gccgtcaacg gcgtgcctt ctgcggcaca ctctcggcc agctcttctt cgggtggtc
 181 ggcgaccgca tgggcccga ggcggtctac ggcgatgacg tcatgtcat ggtgctctgc
 241 tccatcgctt cgggctctc ctctgggtcc acccccggct ccgtcatggc cacgctgtgc
 301 ttcttcgctt tctggcttgg gttcggcctc ggcggcgact acccgtctc cgcaccatc
 361 atgtccgagt acgccaacaa gaagacgagg ggcggcttca tcgcccgcgt gtttgctatg
 421 cagggtctcg gcatectcac cggcgggctc gtcacgctca tegtctccgc cgccttccgc
 481 gccgccttcc ccaccaggc ctaccaggac gccccctcgc cctccacgcc ggcgcaggcc
 541 gacttcgtgt ggcgttcat cctcatgttc ggcgcctcc cggccctcat gacctactac
 601 tggcgggatg agatgccca gacggcgccg tacacggcgc tcgtcgccaa gaacgccaa
 661 caggcggccg cggacatgtc caaggtgctc caggtggaca tcggcgccga ggaagaggac
 721 cccaaggcga acgacggcgt tggagccgcc gacgaccgca actcgttcgg gctcttctc
 781 ggcgagtccc tgcgcggca cgggctgcac ctctcggca cggccactc ctgggtctc
 841 ctcgacatcg ccttctactc gcagaaactg ttccagaagg acatcttcc acatgatcaac
 901 tggatcccca aggccaaagc gatgagcgc ctcgaggagg tgcaccgat cgcgcgcgcg
 961 cagacgctca tcgcgtctg cggcacgggt cggggtact ggttcacggt ggcgctgatc
1021 gaccggatcg ggcggttctg gatccagctc ggcggttct tcttcatggc cgtgttcatg
1081 ctggggctcg ccttcccgtc ccaccactgg acgacgcggg ggaaccacat cgggttcgta

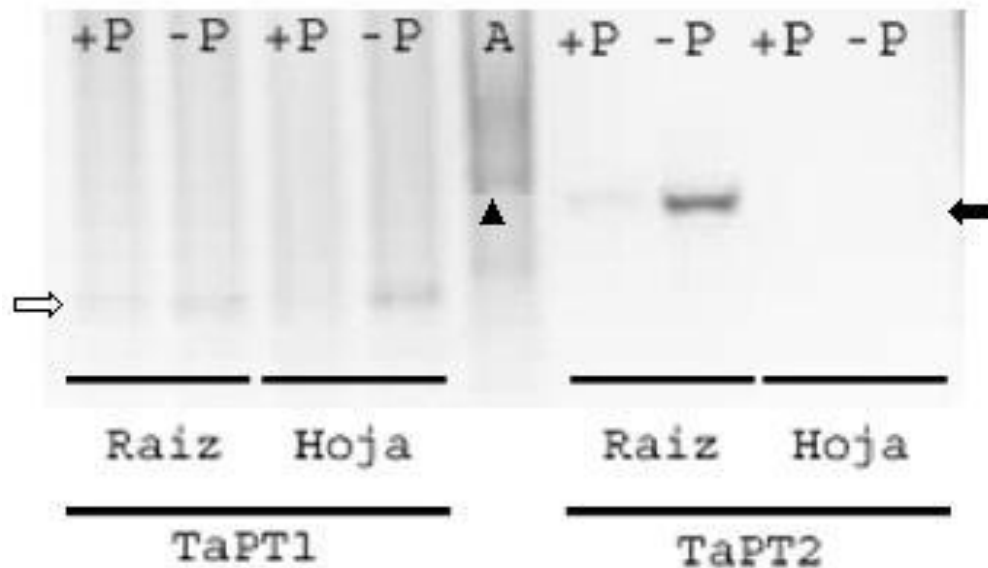
```

```

Triticum aestivum mRNA for inorganic phosphate transporter (pt2
gene).
Homología con PT1
ACCESSION AJ344240
ORIGIN
  1 gggggggggg gggacacaaa caagagagaa ccagaagaag tacagaaggg ggcagaagtc
  61 tagttgagag atcgccggcg gccatggcga ctgaacagct caacgtgttg aaagcactcg
 121 atgttgccaa gacgcaactg taccatttca aggcggctcg gategcggc atgggcttct
 181 tcacggacgc ctacgacctc ttctgcatcg cctctgtcac caagctgctg gggcgcactc
 241 actacaccga ccttgccctc aacgagcccg gccacctccc ggcaaacgtg tcggccgcgc
 301 tgaacggcgt ggcctgtgct ggcacacttg ccggccagct cttcttcggc tggctcggtg
 361 acaagctcgg ccgcaagagc gtctacggct tcacgctcat cctcatggct ctctgctcca
 421 tcgcgtccgg gctctcgtt ggacacgagg ccaagggcgt aatggggacg ctatgtttct
 481 tccgcttctg gcttggcttc ggcgtcggcg gcgactatcc tctgagcgc accatcatgt
 541 cggaatatgc taacaagaag acccgcggca cctttatcgc cgctgtgttt gccatgcagg
 601 ggtttggcat cctatttggc actatgtcga ccatcctcgt ctcgtccgca ttcgacatg
 661 catccctcgc accgccattc tacattgacg ccggggcgtc cattggcccg gaggccgact
 721 acgtgtggcg catcatcgtc atgttcggca ccattcccgc cgcctgacc tactactggc
 781 gtatgaagat gcccgaact gcgcgttaca cagcactcat cgcggcaac acgaagcaag
 841 ccacatcaga catgtccaag gtgctcaaca aggagatctc agaggagaat gtgcagggtg
 901 agcgtgccac tgggtgatact tggggcctct tctcggcaca gttcatgaag cggccagggg
 961 tgcacttgct agcgaccaca agcacttggc tctgctcga tgtggccttc tacagccaga

```

**Figura 5: Secuencia de los transportadores de fosfato de alta afinidad de trigo (TaPT1 y TaPT2).** Para TaPT1, desde la secuencia resaltada en celeste hasta la gris (llave verde), se muestra la zona amplificada como sonda para el ensayo de tipo Northern. Para TaPT2, la sonda corresponde a la secuencia que se encuentra entre las que están resaltadas en negro y rosado (llave verde). Las secuencias de color rojo corresponden a las que resultan idénticas entre TaPT1 y TaPT2.

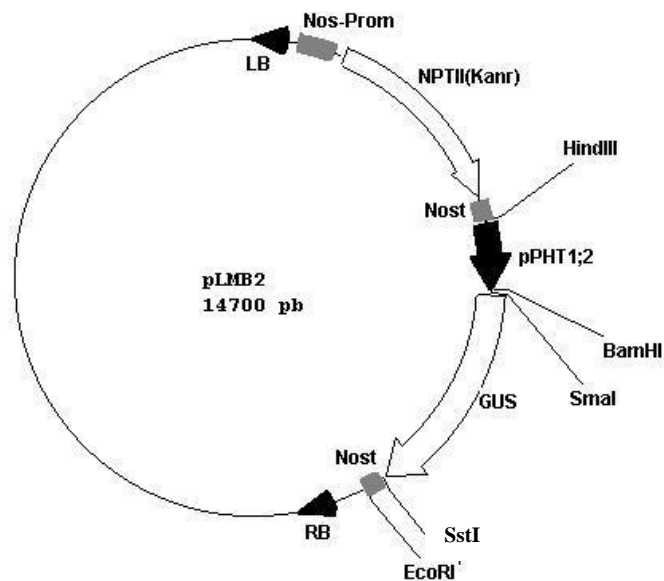


**Figura 6: Análisis de la expresión de TaPT1 y TaPT2 mediante RT-PCR:** Se utilizó ARN total extraído desde diferentes tejidos de plantas de trigo en condiciones de carencia o suficiencia de fósforo, los partidores son específicos para segmentos de los genes de transportadores de fosfato 1 y 2 de trigo y actina (de *A. thaliana*). +P: Plantas a 7 días con 0.1mM Pi en la solución nutritiva; -P: Plantas a 7 días con carencia de fósforo en la solución nutritiva; A: Actina. Se aprecian bandas secundarias en el carril de actina, pues las condiciones de PCR fueron optimizadas para los cDNAs de los transportadores de fosfato. Flecha blanca: 0.3 kb (tamaño TaPT1), Flecha negra; 0.5 kb (tamaño TaPT2), Punta de flecha: banda actina.3

### 5.3.- Clonamiento de la secuencia promotora de PHT1;2

El patrón de expresión del gen que codifica para el transportador de fosfato TaPT2 de trigo, esto es, en raíces ante una carencia de fósforo, se ha encontrado en genes con la misma función en otras especies (Mukatira *et al.*, 2001). Un ejemplo de esto es el gen PHT1;2 de la planta *Arabidopsis thaliana*. Esta planta, al tener su genoma completamente secuenciado, permite obtener la secuencia reguladora de este gen de una manera directa, partiendo desde ADN genómico. Para aislarlo, se diseñaron partidores para amplificar una sección de 2,1 kb río arriba del sitio de inicio de la traducción, teniendo en cuenta la posición del próximo gen en el cromosoma. Este tamaño de secuencia, en trabajos anteriores, ha garantizado la obtención de promotores funcionales (Karthikeyan, 2002). Los partidores diseñados introdujeron los sitios de restricción HindIII y BamHI en la

secuencia amplificada. El producto de PCR obtenido, amplificado utilizando la ADN polimerasa termoestable con actividad correctora *Pfu*, se subclonó en el plásmido pBluescript, en el sitio EcoRV, obteniéndose el vector pLMB1. La secuencia se subclonó en el vector pBI101.1, previamente digerido con las enzimas HindIII y BamHI. El vector pBI101.1 es un vector de tipo binario, es decir, puede replicarse en dos sistemas procariontes distintos: *A. tumefaciens* y *E. coli*. Este vector posee una región flanqueada por secuencias utilizadas por *Agrobacterium* para insertar el ADN que se encuentra entre ellas en el genoma de una planta destino. La estrategia utilizada para insertar la secuencia en el vector binario permitió, por una parte eliminar el sitio ATG endógeno de PHT1;2, así como conservar la distancia de separación con el sitio ATG del gen reportero (*gus*), presente en pBI101.1. El vector resultante es pLMB2 (Figura 6), el cual puede utilizarse tanto para obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis* (una dicotiledónea), como también de trigo (una monocotiledónea), con las cuales, mediante tinción histoquímica puede revelarse el patrón de expresión *in vivo*.



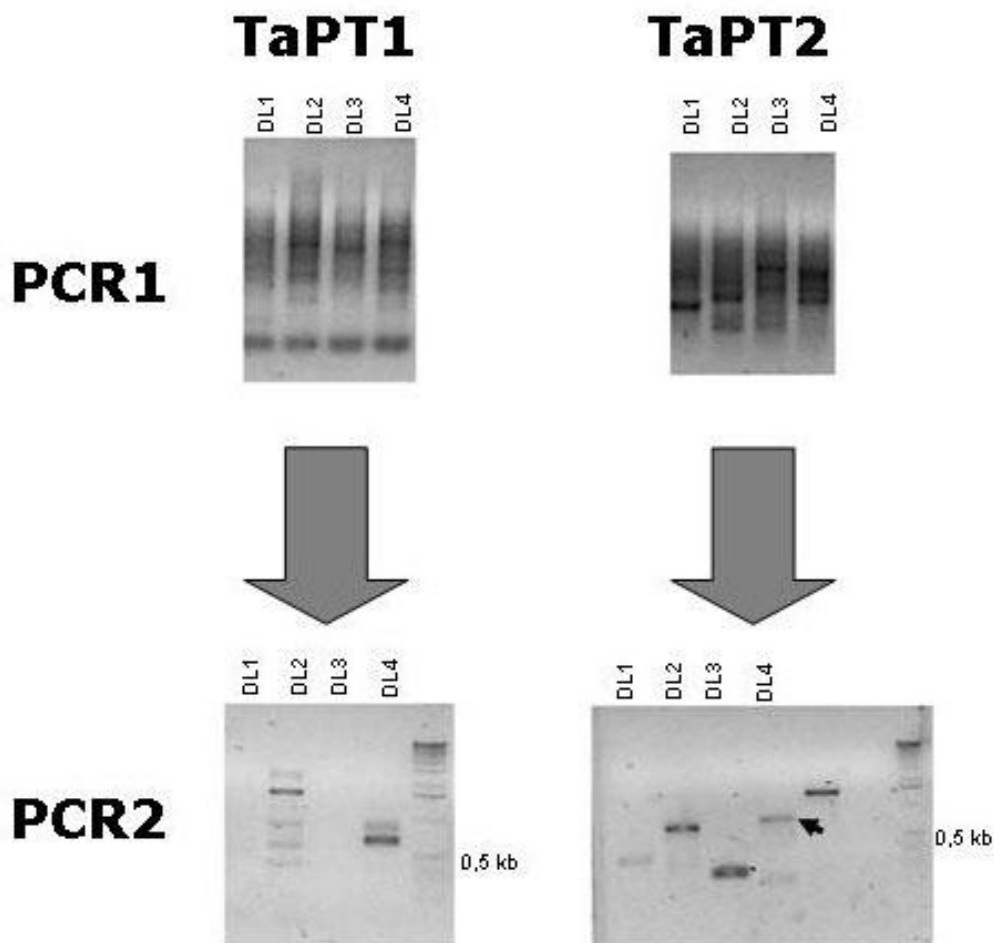
**Figura 7: Mapa del vector pLMB2**, el cual contiene el promotor del transportador de fosfato de alta afinidad de *Arabidopsis* PHT1;2, fusionado al gen reportero *gus*. Nos-Prom y Nost: Promotor y terminador del gen de nopalina sintasa, respectivamente; NPTII: gen que codifica para neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a kanamicina

#### **5.4.- Clonamiento de secuencias 5' río arriba a genes que codifican para transportadores de fosfato de alta afinidad**

Para la obtención de putativos promotores de las secuencias que codifican para transportadores de fosfato en trigo, se debió utilizar la técnica de "Genome Walker", la cual permite aislar un fragmento desconocido de ADN genómico, adyacente a una zona conocida, en este caso, la secuencia de ADNc de TaPT1 y TaPT2. Se extrajo ADN desde hojas de trigo, con el propósito de construir librerías genómicas. Estas se generan digiriendo el ADN con enzimas de restricción que dan como resultado fragmentos con extremos romos, para luego realizar una ligación con una secuencia adaptadora. La secuencia adaptadora presenta sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Sall y SmaI, además de sitios de unión a partidores para realizar PCR. Se generaron 10 librerías genómicas diferentes (ver sección materiales y métodos). Una vez que se cuenta con las librerías genómicas, el siguiente paso es aislar el putativo promotor utilizando 2 reacciones sucesivas de PCR. La primera reacción se realiza utilizando un partidor específico de la secuencia adaptadora (AP1), y un partidor específico de la secuencia de ADNc (GSP1). La segunda reacción se realiza utilizando partidores más internos, el primero en la secuencia adaptadora (AP2) y otro en la secuencia conocida de ADNc. Estas reacciones sucesivas producen un amplificado cuyo tamaño varía según la frecuencia de corte de la enzima de restricción con la cual fue creada la librería. Estas secuencias además contienen una parte de la sección 5' del gen, la cual sirve para reconocer el amplificado correcto en la secuenciación, y se les denomina secuencias marcadoras. Para el caso de TaPT2 se logró amplificar como máximo una secuencia de tamaño aproximado 0,6 kb la cual se clonó y secuenció, encontrándose las secuencias conocidas que sirven como marcadores, estas son: parte de la secuencia del adaptador y



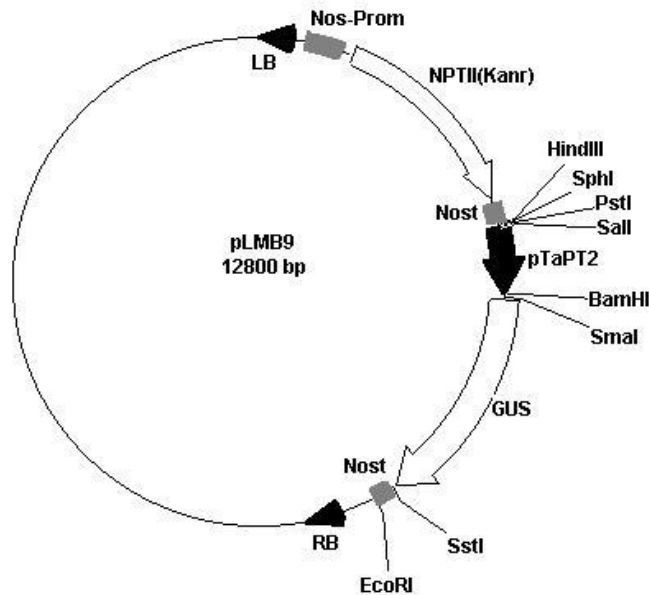
la parte de la secuencia marcadora conocida. La amplificación utilizada para aislar la putativa secuencia regulatoria, fue la resultante de la librería creada a partir de la enzima *StuI* (DL4) (Figura 7). Para el caso de TaPT1, se logró amplificar fragmentos de un tamaño mayor a partir de otras librerías, sin embargo, la secuenciación no permitió encontrar el marcador correspondiente a la secuencia conocida para TaPT1 (datos no mostrados).



**Figura 8: Genome Walker.** Amplificación utilizando cuatro de las 10 librerías genómicas creadas, en el primer PCR se aprecia un patrón de amplificación inespecífico, el cual, sirve como templado para una segunda reacción de PCR, la cual produce como resultado normalmente bandas únicas debido a la mayor estrictez de las reacciones (ver materiales y métodos). La flecha indica la banda de producto de PCR que se utilizaría para obtener y aislar el ADN de la secuencia 5' a TaPT2.

### **5.5.- Subclonamiento de la putativa secuencia promotora de TaPT2 en un vector binario**

La secuencia amplificada en la segunda reacción de PCR de "Genome Walker", se realizó utilizando un mix de polimerasas, "Advantage Genomic Polymerase Mix", de Clontech, el cual contiene una fusión entre la Taq polimerasa de *Thermus aquaticus*, y la polimerasa termoestable de *Thermus thermophilus*. Esta polimerasa, posee una actividad correctora, además de generar extremos con terminaciones con el nucleótido adenina libre en el amplificado. Esto último permite un clonamiento mas directo en vectores de destino. En este caso el vector utilizado fue pGEM-T, el cual permite un clonamiento mas eficiente de este tipo de secuencias. La unión de la secuencia de 0,557 kb río arriba de TaPT2 y pGEM-T generó el vector pLMB6, el cual permitió obtener su secuencia. Se diseñaron partidores para amplificar la secuencia clonada en pLMB6 y al mismo tiempo agregarle en sus extremos sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Sall y BamHI, para su posterior subclonamiento en pBI101.1. La amplificación se llevó a cabo con la polimerasa termoestable *Pfu*, esta reacción generó un producto con extremos romos, al cual se le agregaron las terminaciones de adenina con una reacción de incubación utilizando la polimerasa Taq. El fragmento obtenido se clonó nuevamente en el vector pGEM-T (pLMB8), para luego liberar la secuencia definitiva a ser ligada en pBI101.1, la liberación desde pLMB8, con las endonucleasas antes mencionadas, elimina el sitio ATG endógeno de TaPT2 y respeta el marco de lectura del ATG presente en el gen *gus*. El vector generado es pLMB9. Tanto PLMB2 como pLMB9 se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis* (ver anexo).



**Figura 9: Mapa del vector pLMB9**, el cual contiene la secuencia del putativo promotor de TaPT2, fusionado al gen reportero *gus*. Nos-Prom y Nost: Promotor y terminador del gen de nopalina sintasa, respectivamente; NPTII: gen que codifica para neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a kanamicina

```

CGGCCCGGGCTGGTCCTTGTTTGGTTCATAAGTCCTAAGACTTTTTTTAGTCCCAACTTATAAGTCCC
AAGTCCCTAAAAAGTCCCTACATGTTTGGTTCCCGAGACTTATAAGTCTCTATAAGGCCATATTACAA
CTATAAGTCCCTATAAGTCCCTCCTTGAGAGTCTTATTCCATAAGTCACAAATGTCCACTTTAAGTCC
TTATAAGTCCCTCCTGTTTGGTTTAGATGAGACTTATAGGGACTTATTTAAGTCCCTAGACCAATAAA
TCTCTGGAAACAAACACCCTCTTAATCCTTCTAATAATAGAAATGTACCATCCGTTGACTCTGCGTAT
ATTTTTGTAAGAACTATCGTGATAATGTACAATCCGTTGTATTTACAAGCGATGCCGTGCATATGATA
TTCTATAGTTGCAACTAGCAATGTTAGATTGGCATAACCACAAATATATCCTTACCTGTATGTTTTACC
CGGAATTATGCCTATATATACGTCTAGAAAGCGTGGAGCACAGCACACAACAAGAGAGAAACGAGAAGA
AGTACAGAA GTTTAGCCGAGAGATCGCCGGCGGCCATG

```

**Figura 9. Secuencia de la región río arriba del sitio de inicio de la traducción para el gen TaPT2.** La secuencia tiene un tamaño total de 0.557 kb. Con letras rojas se muestra el sitio de inicio de la traducción. Destacado en rojo, en letras blancas se encuentra la caja TATA predicha. El sitio de inicio de la traducción se indica con letras rojas. En amarillo se encuentran los motivos de expresión en raíz. En verde se encuentra uno de los sitios de unión a factores de transcripción de tipo MYB (Rubio *et al.*, 2001).

## 5.6.- Análisis de la secuencia 5' río arriba a TaPT2

Al obtener la secuencia de la región clonada 5' al gen TaPT2, el próximo paso fue determinar qué elementos conocidos de regulación se encontraban en ella. Para esto se utilizaron bases de datos de sitios de unión a factores de transcripción (SUFT) conocidos. Algunas bases de datos contienen información específica de regulación en modelos vegetales, como por ejemplo PLANTCARE (<http://oberon.fvms.ugent.be:8080/PlantCARE/>), y PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>), y otros contienen información de regulación en general, como por ejemplo TRANSFAC (<http://transfac.gbf.de/>). Estas bases de datos, especialmente las dos primeras, también contienen información acerca de SUFT específicos de especies monocotiledóneas, como por ejemplo arroz y maíz.

Para eliminar la posibilidad de que la secuencia se tratase de una región 5' no traducida, y que no fuera parte del promotor, la primera región a encontrar es la caja TATA. Se encontró una putativa caja TATA de arroz en la región -27 a la -33, marcada en rojo en la figura 9. Luego de esto, se intentó encontrar SUFT relacionados con promotores de genes de expresión tejido específica. Se encontró un motivo repetido 4 veces, identificado en genes expresados diferencialmente en raíz en tabaco (*Nicotiana tabacum*). Un segundo interés fue buscar SUFT que estén relacionados con respuesta a estrés. Motivos relacionados con una respuesta a estrés en específico contra carencia de fósforo no se encontraron en la base de datos, sin embargo fueron hallados SUFT relacionados a estrés en general. Entre estos motivos se encuentran algunos relacionados a daño mecánico, y de respuesta a ácido salicílico. Esta molécula está involucrada, entre otras funciones, con mecanismos de respuesta ante fitopatógenos y estrés oxidativo.

Recientemente se ha descrito en *Arabidopsis thaliana* un gen que codifica para un factor de transcripción de tipo MYB, el cual estaría involucrado en la regulación general de genes que son expresados ante una carencia de fósforo, expresado en todos los tejidos de la planta (Rubio *et al.*, 2001). La determinación de las vías de regulación específicas

para cada tipo de gen expresado diferencialmente por fósforo está aun en evaluación, pero el descubrimiento de este factor de transcripción sienta las bases para una aproximación experimental mas cercana. Basando el análisis en que un factor de transcripción de tipo MYB podría estar interactuando con el ADN de la secuencia obtenida, se buscaron en las bases de datos SUFT para proteínas de este tipo. El resultado arrojó tres sitios de reconocimiento de proteínas MYB, una de las cuales es general para proteínas animales, esto podría sugerir una conservación de este motivo entre variadas especies, alejadas evolutivamente entre si.

Los sitios de reconocimiento encontrados han sido comprobados experimentalmente en otros modelos vegetales. Específicamente para trigo casi no hay SUFT en la literatura, por lo que los motivos generales de plantas entregan información valiosa. Los sitios de interacción con factores de transcripción mostrados aquí sugieren que la secuencia encontrada podría corresponder a una secuencia promotora con las características buscadas, sin embargo un ensayo experimental con el vector pLMB9 es necesario para la comprobación de su función.

**Tabla1: Sitios de unión a factores de transcripción encontradas en la secuencia 5' al gen TaPT2 aislada de trigo.**

<b>Elemento encontrado (Número de veces)</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
HV~CCAAT-box (2)	Sitio de unión de factor de transcripción de tipo MYB ( <i>Hordeum vulgare</i> )	Plant J. 1993 4:411-22.
TCA (1)	Elemento de respuesta a ácido salicílico ( <i>Brassica oleracea</i> )	Plant Cell. 1997 9:49-60.
WUN (4)	Elemento de respuesta a daño ( <i>Brassica oleracea</i> )	
MRE (3)	Sitio de reconocimiento de proteínas de tipo MYB ( <i>Petroselinum crispum</i> )	Plant J. 1997 11:1079-93.
MYBPLANT (2)	Sitio de reconocimiento de proteínas de tipo MYB ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Plant Cell. 1998 10:135-54. EMBO J. 1994 13:128-37.
MYBCORE (2)	Sitio de reconocimiento de proteínas de tipo MYB ( <i>Petunia hybrida</i> y MYB animales)	Genes Dev. 1990 4:2235-41. Plant Cell. 1993 5:1529-39. EMBO J. 1995 14:1773-84.
ROOTMOTIFTAPOX1 (4)	Motivo encontrado en promotores de genes expresados en raíz	Transgenic Res. 1995 4:388-96.

## 6.- DISCUSIÓN

Las plantas, ante una carencia de fósforo, producen una expresión diferencial de genes, los cuales pueden generar una respuesta de tipo general, o una respuesta de tipo específica. La respuesta general, se produce por una expresión de genes de respuesta inespecífica, los cuales pueden ser activados por diferentes estímulos, produciendo una respuesta similar para cada uno de ellos. Un ejemplo de esto son los genes de respuesta a estrés en general. La respuesta específica en este caso, en cambio, tiene que ver con la expresión de genes regulados únicamente por fósforo.

Entre los genes de *Arabidopsis thaliana* que se han considerado de respuesta específica, se encuentran los que codifican para transportadores de fosfato de alta afinidad, agrupados en la familia de los genes PHT1, que actualmente cuenta con nueve miembros (Mudge *et al.*, 2002). Este tipo de proteínas consta de doce segmentos transmembrana, los seis primeros unidos a los seis segundos mediante un loop hidrofílico, el cual puede apreciarse tanto en la comparación de secuencias como en los patrones de hidrofobicidad. La información de conservación estructural, sin embargo, no da cuenta de una regulación similar, por ejemplo, los nueve transportadores de fosfato de alta afinidad de *Arabidopsis thaliana* tienen patrones de expresión con diferencias significativas (Mudge *et al.*, 2002). Tampoco se ha elucidado la función para cada miembro de esta familia. La expresión divergente entre algunos de ellos sugiere que su función es bastante variada. Las funciones propuestas van desde la captación de fosfato desde el suelo, hasta la redistribución de fosfato entre diferentes tejidos de la planta, sin embargo, se cree que están relacionados con otros procesos celulares además de la captación de fósforo, o de otros nutrientes.

Se ha descubierto recientemente que el transportador de fosfato de levaduras PHO84 también responde ante una carencia de manganeso, y aún se está por evaluar la acción de otros metales (Jensen *et al.*, 2003). Levaduras deficientes en la función de PHO84 se

utilizan para realizar estudios de complementación con transportadores de fosfato de la familia de PHT1. Si el transportador PHO84 responde a otros nutrientes y ha servido como blanco de complementación, una pregunta que aun sigue abierta es si los transportadores de fosfato de alta afinidad de plantas pueden transportar otros nutrientes aparte de fosfato.

Además de *Arabidopsis*, entre las plantas que se utilizan comúnmente como modelo de estudio, entre ellas, tomate, papa y alfalfa, se han encontrado transportadores de fosfato de alta afinidad, los cuales responden a un patrón de expresión bastante similar hasta el nivel de análisis que se les ha dado en los estudios, esto es, su expresión es dirigida a la raíz ante una carencia de fósforo (Mukatira *et al.*, 2001; Muchhal *et al.*, 1999; Leggewie *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998 ). Esta observación lleva a la pregunta de si la regulación génica tiene algún nivel de conservación, dado que las funciones que se postulan para este tipo de transportadores pueden mantenerse o variar de acuerdo a la especie. Las funciones que se han postulado van desde la captación de fosfato desde la rizósfera, hasta su redistribución intercelular para su reutilización desde células senescentes (Mudge *et al.*, 2002).

En este trabajo, se han escogido dos putativos transportadores de fosfato de trigo: TaPT1 y TaPT2. La expresión de TaPT2 resultó ser específica de raíces, en carencia de fósforo, y TaPT1 se presentó en hojas y raíces también en ausencia de fósforo. La expresión de estos transportadores indica que estarían involucrados con la captación de fosfato desde las raíces. Dado que la expresión de ambos ARN mensajeros es regulada por la disponibilidad de fósforo, principalmente en raíces, se hace difícil proponer una función alternativa, como por ejemplo la distribución de fósforo en diferentes tejidos.

Dada la regulación encontrada para los transportadores de fosfato de trigo, se podría realizar una analogía con los transportadores de fosfato de *Arabidopsis* PHT1;2 y PHT1;4 (Mudge *et al.*, 2002). La razón de esto es que TaPT1 tiene una regulación cercana a PHT1;1, y TaPT2 a PHT1;4. Este paralelo está delimitado por supuesto, por el alcance de



nuestros experimentos, es decir, al observar solamente raíces y hojas. Para acotar aún más esta relación, se deberían observar otros tejidos, además de realizar una visión más exhaustiva en capas celulares dentro de la raíz o en hojas. Esta comparación puede extenderse hasta su uso por parte de la célula. La utilización que se piensa tienen PHT1;2 y PHT1;4 es la captación de fosfato desde la rizósfera, cuando se encuentra en concentraciones del orden micromolar, función que se debería mantener entre especies evolutivamente distanciadas. Es por lo tanto, posible que TaPT1 y TaPT2 se utilicen con este objetivo en trigo. La comparación que se ha realizado entre los transportadores de fosfato de trigo y de *Arabidopsis* la hemos establecido suponiendo que su regulación es un proceso que se puede haber conservado y que ambas plantas tienen una distribución similar para este tipo de transportadores en las mismas regiones. Para los transportadores de las plantas modelo que se han mencionado, la función que se predice es similar. Si la regulación a la cual se ven afectadas plantas tan alejadas filogenéticamente es comparable, sería probable encontrar elementos regulatorios de tipo cis que se hayan mantenido en la evolución. Se sabe que las regiones no codificantes, esto es, intrones, regiones intergénicas y regiones no codificantes, no son tan conservadas evolutivamente como lo son las regiones codificantes. Se han hallado numerosas regiones consenso en zonas no codificantes que tienen en su secuencia sitios de unión a factores de transcripción, comprobados experimentalmente. Esto quiere decir que se pueden predecir los motivos de las proteínas que regulan la expresión de este tipo de transportadores, por lo tanto, se las puede clasificar según lo encontrado. Las bases de datos específicas para secuencias regulatorias de plantas, como por ejemplo PLACE y PlantCare, pueden brindarnos este tipo de información. Al analizar la secuencia correspondiente al promotor de TaPT2, en estas bases de datos, se han encontrado algunos motivos correspondientes a sitios de unión a factores de transcripción, tanto de monocotiledóneas, como de dicotiledóneas, comprobados experimentalmente. Hemos intentado relacionar este tipo de secuencias a partir de otras especies, con las de trigo,

dado que la información correspondiente a sitios de unión a factores de transcripción específicos de trigo, es muy escasa, o se encuentra protegida por derechos de patentes. Se ha puesto especial interés en las secuencias de unión a factores de transcripción de tipo MYB, secuencias relacionadas con respuesta a estrés y secuencias relacionadas con especificidad de transcripción hacia algún tejido en especial. Estudios recientes (Rubio *et al.*, 2001), han relacionado a un factor de transcripción de tipo MYB, con la expresión diferencial de genes ante una carencia de fósforo. Esta información permite poner un punto de partida para lograr la comprensión de las vías regulatorias ante una respuesta por privación de fósforo, dado que se cree que este factor estaría actuando como una pieza clave en la regulación mediada por fósforo. Otra evidencia de un factor de transcripción de tipo MYB, es la proteína nuclear PSR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*, la cual se une a un sitio de unión en el ADN denominado CCA1. En la secuencia obtenida, se encuentran presentes motivos diferentes en un nucleótido al sitio de unión a MYB descrito por Rubio *et al.* (2001) y a CCA1 (Wykoff *et al.*, 1999). Esta ligera diferencia podría atribuirse a la distancia evolutiva entre estas especies (un alga verde unicelular y una planta dicotiledónea) y trigo (una monocotiledónea). También se han encontrado en la secuencia obtenida, sitios de unión a factores de transcripción idénticos a algunos descritos, responsables de expresión raíz específica y de respuesta a estrés de varios tipos. Toda esta información en conjunto sugiere que esta putativa secuencia regulatoria tiene elementos para dirigir la expresión ante un estrés de fósforo en raíces. Para comprobar esta afirmación, es necesario comprobar la funcionalidad de la putativa secuencia promotora.

Una pregunta que ha estado siempre presente en el transcurso de esta tesis, es si los motivos de unión a factores de transcripción de una planta dicotiledónea son funcionales en una monocotiledónea, y viceversa. Para esto, se cuenta con la posibilidad de transformar, y obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y trigo. Se construyeron vectores, utilizando promotores de ambas especies dirigiendo la expresión

del gen reportero GUS. Hasta ahora se han obtenido plantas de trigo transformantes, las cuales expresan GUS débilmente (datos no mostrados). Este hecho estaría demostrando que la funcionalidad se mantiene entre el promotor de *Arabidopsis* y una especie como trigo.

Al determinar el patrón de expresión en trigo, utilizando el promotor endógeno obtenido, se podrá saber si nuestra secuencia es capaz de dirigir la expresión génica. El promotor se probará primero con un gen reportero, y luego con genes que permitan adquirir más eficientemente el fósforo en condiciones de carencia, en raíces. Este procedimiento puede ser utilizado como herramienta molecular en trigo. En esta planta, la información disponible está normalmente protegida por derechos de patentes, por lo cual, un promotor de este tipo, resulta relevante.

El aislamiento de promotores específicos proporcionará herramientas para dirigir la expresión de genes de interés, en todo tipo de organismos. En especies importantes como modelo de investigación, como *Arabidopsis*, se han realizado numerosos experimentos de genómica funcional bajo diferentes condiciones, en diferentes tejidos. Recientemente se ha logrado evaluar la expresión de genes regulados por carencia de fósforo en hojas y raíces a gran escala. La interpretación de esta gran cantidad de información permitirá conocer mejor los cambios celulares involucrados con la ausencia de fósforo. Los autores de este trabajo han acuñado el término de “smart plants” o “plantas inteligentes”, para plantas transgénicas más eficientes, mediante la utilización de secuencias regulatorias (Hammond *et al.*, 2003). Al obtener plantas de trigo con expresión controlada se estará dando un paso importante en esa dirección.

La potencialidad de generar “plantas inteligentes” en el caso de *Arabidopsis*, es una meta que no se ve muy lejana, pues su genoma ya se encuentra totalmente secuenciado. En plantas de interés agronómico, como el trigo, las secuencias no codificantes son aún escasas, y no existen proyectos de secuenciación a gran escala por el momento.

Los proyectos de secuenciación, a nivel de ESTs, pueden brindar una gran cantidad de información acerca de la regulación génica. Este objetivo se puede alcanzar al ser complementado con otras técnicas, como por ejemplo microarreglos, y el aislamiento de promotores, con métodos como los descritos en esta tesis, a un costo mucho menor que una secuenciación completa del genoma.

## 7.- REFERENCIAS

Bariola, P.A., Howard, C.J., Taylor, C.B., Verburg, M.T., Jaglan, V.D. and Green, P.J. 1994. The *arabidopsis* ribonuclease gene *rns1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *The Plant Journal* **6**: 673-685.

Borie, F. and Rubio, R. 2003. Total and organic phosphorus in chilean volcanic soils. *Gayana Bot.* **60**: 69-78.

Bucher, M; Rausch, C. and Daram, P. 2001. Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants. *Journal Of Plant Nutrition And Soil Science* **2**: 209-217.

Chen, H., Nelson, R.S. and Sherwood, J.L. 1994. Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotechniques* **16**: 664-668.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156.

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

Daram, P., Brunner, S., Rausch, C., Steiner, C., Amrhein, N. and Bucher, M. 1999. Pht2;1 encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **11**: 2153-2166.

De la Fuente J.M., Ramírez-Rodríguez V., Cabrera-Ponce J.L. and Herrera-Estrella L. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**: 1566-1568.

Gavi, F., Basta, N.T. and Raun, W.R. 1997. Wheat grain cadmium as affected by long-term fertilization and soil acidity. *Journal of Environmental Quality* **26** (1): 265.

Genchi, G., Spagnoletta, A., De Santis, A., Stefanizzi, L. and Palmieri, F. 1999. Purification and characterization of the reconstitutively active citrate carrier from maize mitochondria. *Plant Physiology* **120**: 841–847.

Grierson, P.F. 1992. Organic acids in the rhizosphere of *Banksia interifolia*. *Plant Soil* **44**: 259–65.

Hammond, J.P., Bennett, M.J., Bowen, H.C., Broadley, M.R., Eastwood, D.C., May, S.T., Rahn, C., Swarup, R., Woolaway, K.E. and White P.J. 2003. Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiology* **132**: 578–596.

Haran, S., Logendra, S., Seskar, M., Bratanova, M. and Raskin, I. 2000. Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiology* **124**: 615–626.

Harrison, M.J. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 361–389.

Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.

Jensen, L.T., Aja-Alemanji, M., and Culotta, V. C. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by *PHO84* also functions in manganese homeostasis. *The Journal Of Biological Chemistry* **278**: 42036-42040

Karthikeyan, A.S., Varadarajan, D.K., Mukatira, U.T., D'Urzo, M.P., Damsz, B. and Raghothama K.G. 2002. Regulated expression of arabidopsis phosphate transporters. *Plant Physiology* **130**: 221–233.

Leggewie, G., Willmitzer, L., Riesmeier, J.W. 1997. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *The Plant Cell* **9**: 381-392

Liu, H., Trieu, A.T., Blaylock, L.A., Harrison, M.J. 1998. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 14-22.

López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M.F., Simpson, J. and Herrera-Estrella L. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* **129**: 244–256.

Ma, Z., Baskin, T.I., Brown, K.M. and Lynch J.P. 2003. Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. *Plant Physiology* **131**: 1381–1390.

Martín, A. C., del Pozo, J. C., Iglesias, J., Rubio, V., Solano, R., De La Peña, A., Leyva, A., and Paz-Ares, J. 2000. Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **24**:1 –11.

Muchhal, U.S., Pardo, J.M. and Raghothama, K.G. 1996. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10519–10523.

Muchhal, U.S. and Raghothama, K.G. 1999. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5868–5872.

Mudge, S.R., Rae, A. L., Diatloff, E. and Smith, F.W. 2002. Expression analysis suggests novel roles for members of the pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **31**: 341-353.

Mukatira, U.T., Liu, C., Varadarajan, D.K. and Raghothama K.G. 2001. Negative regulation of phosphate starvation-induced genes. *Plant Physiology* **127**: 1854–1862.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-essays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.

Nian, H., Ahn, S.J., Yang, Z.M. and Matsumoto H. 2003. Effect of phosphorus deficiency on aluminium-induced citrate exudation in soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* **117**: 229–236.



Norvell, W.A., Wu, J., Hopkins, D.G. and Welch, R. 2000. Association of cadmium in durum wheat grain with soil chlorine and chelate-extractable soil cadmium. *Soil Science Society of America* **64**(6): 2162-2168.

Peñaloza, E., Gutierrez, A., Martínez, J., Muñoz, G., Bravo, L.A. and Corcuera L.J. 2002. Differential gene expression in proteoid root clusters of white lupin (*Lupinus albus*). *Physiologia Plantarum* **116**: 28-36.

Picault, N., Palmieri, L., Pisano, I., Hodges, M. and Palmieri, F. 2002. Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. *The Journal Of Biological Chemistry* **277**: 24204–24211.

Raghothama, K.G. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 665–693.

Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A.C., Iglesias, J., Leyva, A., and Paz-Ares, J.A. 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development* **15**: 2122 –2133.

Ryan, P.R., Delhaize, E. and Jones, D.L. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 527–560.

Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K. A. and Lukyanov S. A. 1995. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1087–1088.

.Silva, H., Yoshioka, K., Dooner, H.K. and Klessig, D.F. 1999. Characterization of a new *Arabidopsis* mutant exhibiting enhanced disease resistance. *Mol Plant Microbe Interact.* **12**: 1053-1063.

Smith, F.W., Ealing, P.M., Dong, B. and Delhaize, E. 1997. The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *The Plant Journal* **11**: 83-92.

Wu, P., Ma, L., Hou, X., Wang, M., Wu, Y., Liu, F. and Deng, X.W. 2003. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiology* **132**: 1260–1271.

Wykoff, D.D., Grossman, A.R., Weeks, D.P., Usuda, H., Shimogawara, K. 1999. Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15336-1534.

## 8.- ANEXO

### 8.1.- Obtención de una secuencia tipo actina de trigo

En el transcurso de esta tesis, también se ha podido determinar parte de la secuencia codificante de un gen de trigo, el cual guarda alta homología con el gen de actina de otras especies.

Para obtener la secuencia de actina de trigo, se amplificó una sección de ADNc con partidores de actina de *Arabidopsis thaliana*. Se sabe que este gen tiene una secuencia muy conservada en la naturaleza, por esta razón se utilizaron partidores, diseñados a partir de información de secuencias conocidas de ADN de actinas de *Arabidopsis thaliana*, para amplificar actina de trigo. Con el resultado de la amplificación, se procedió a clonar esta secuencia en el vector pGEM-T, dando como resultado el vector pLMB3. La secuencia obtenida (tipo-actina de trigo) se ingresó en la base de datos de Genbank y se puede encontrar bajo el código de acceso AY423548.

La información que se producirá, partiendo de la generada por este trabajo, permitirá obtener la primera secuencia de ADNc de actina de trigo, así como también su secuencia promotora. Este tipo de secuencias regulatorias en otras especies han sido utilizadas como promotor constitutivo, es decir, dirige la expresión génica en todos los tejidos y en todos los estadios de la planta de una manera fuerte. Se podría obtener por tanto, el primer promotor constitutivo específico para trigo.

### 8.2.- Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Con el propósito de realizar una evaluación funcional de las secuencias promotoras obtenidas, los vectores pLMB2 y pLMB9, conteniendo secuencias promotoras de *Arabidopsis* y trigo, respectivamente, fueron transformados en *Agrobacterium tumefaciens*. Luego se transformó *Arabidopsis thaliana* mediante el método de “inmersión floral”. Para pLMB2 se obtuvieron 11 plantas putativas transformantes (T1) y 2 plantas para pLMB9. Esta denominación se entregó al apreciarse un crecimiento normal ante una

selección con Kanamicina. Para realizar el ensayo de la inducción de la expresión génica de GUS con el crecimiento en carencia de fósforo, se utilizarán plantas T2, al encontrarse en mayor número. Al momento de la entrega de la tesis, las plantas T1 se estaban creciendo a la espera de obtención de semillas.

