

VCH-FC
Biotecnología
F 475
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

“Caracterización funcional del producto génico ITRG7 de *Arabidopsis thaliana*”

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

por

Aliosha Iván Figueroa Valdés

Directora del Seminario de Título:

Dra. Lorena Norambuena Morales

Centro de Biología Molecular Vegetal

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

Santiago - Chile

Julio, 2016





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

ALIOSHA IVÁN FIGUEROA VALDÉS

“Caracterización funcional del producto génico ITRG7 de *Arabidopsis thaliana*”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Lorena Norambuena Morales
Directora del Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Claudia Stange Klein
Presidenta

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

Dr. Elías Utreras Puratich
Evaluador

Santiago de Chile, julio de 2016

BIOGRAFÍA

Nací en Rancagua, VI Región, en el año en que se votó el supuesto retorno a la democracia (1989). De padre minero rol B y de mamá dueña de casa, me esperaban también dos queridas hermanas, numerosos tíos y tías, primos y primas, abuelos y tíos abuelos de origen campesino (de por ahí por Los Andes y otros de Cunaco/Chépica), que luego emigraron a centros mineros como Taltal, Potrerillos, Copiapó y la misma Rancagua. Algunos se transformaron en pequeños comerciantes y otros pertenecían a la suboficialidad de la FACH.



Los Icaritos de La Tercera que me juntaban mis tías, los libros y revistas con más de alguna nota científica o de ciencia ficción que encontraba mi papá en la feria de los cachureos, y las vacaciones familiares acampando en medio de la naturaleza son factores que —creo— despertaron en mí el interés por la ciencia.

Mis estudios básicos estuvieron marcados por la educación subvencionada, aquella en la que a falta de profesor no dudaban en colocarnos alguna película de Disney para pasar el rato y cuya lista de útiles escolares incorporaba hasta el papel “confort”. Aquella en el que el Rector del colegio —estando en recreo— te llamaba a un lado, preguntándote por qué no tenías el uniforme oficial del colegio e informándote que la insignia estaba con *copyright*. En esta etapa conocí a mi grupo de amigos cuyas amistades perduran —desde *kínder*— hasta hoy, pese a las distancias que nos separan.

En la media ingresé al Instituto O’Higgins de Rancagua, en donde tuve a excelentes profesores: Alicia Cortés (química), Jorge Castillo (biología), Ismael Valencia (deportes), Raúl Rivera y Katia Rosas (inglés). En esta etapa mis compañeros de curso depositaron en mí la confianza y fui Tesorero vitalicio de 1ero a 4to medio, pese a los cambios de Presidentes y Secretarios. Inolvidables son las actividades organizadas y propiciadas por el mismo Instituto, como compartir una conversación, té y pan en el Hogar de Cristo o vivir la vida del campo en el secoano costero —aunque fuese por una semana— en la llamada “experiencia rural”. En definitiva, oportunidades de acompañar o ayudar al otro de manera sincera, sin esperar algo a cambio. La revolución pingüina la viví en el colegio, en un ameno ambiente de conversación entre alumnos y profesores, incluyendo la exposición de antecedentes para entender el origen de la crisis educacional.

Obligado a irme de Rancagua por la carencia de Ues, con un buen puntaje en mano, descartando el plan común de Ingeniería por la falta de biología, y confiando en que la Universidad de Chile constituía el espacio en donde realizar mi formación profesional —con una asistencia previa al curso Biotecnología de la Escuela de Verano FCFM— ingresé a la Facultad de Ciencias.

Asimilación de conocimiento, inolvidables tardes de estudio con nuevas amistades, gratos momentos en la piscina y pista atlética con el quipo de la “oficina” de deportes de la facultad, así también con los integrantes de los Laboratorios de Bioquímica y Biología Oral (Odontología, UCH), Laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada (USACH) y Laboratorio de Biología Molecular Vegetal (Ciencias, UCH), son los recuerdos que me quedan de esta etapa de formación profesional.

...A mi familia...

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su constante apoyo, esfuerzo y dedicación a la familia. Por la enseñanza y el traspaso de valores y principios.

A mis hermanas y cuñados, por los gratos momentos vividos cada fin de semana que podía viajar a Rancagua y quitarme el estrés capitalino.

Al profesor Oscar Muñoz, coordinador de la Unidad de Deportes y Actividad Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por asistirme en el entrenamiento del deporte justo y necesario para mantener una vida equilibrada, así como apoyarme en la creación del “*Running Team Cs*” y las respectivas poleras.

A la Dra. Blanca Urzúa y a la T.M. Anita Plaza de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, por enseñarme los primeros PCR en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral y permitirme ejercer como ayudante del curso de Microbiología de la Escuela de Verano, motivando a escolares en el mundo de la ciencia.

A la Dra. Marcela Wilkens de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, por permitirme acercarme al trabajo experimental con bacterias y aportar mis ideas para el tratamiento de relaves mineros en el Laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile: Dra. Liliana Cardemil y su equipo LCO; Dra. Claudia Stange y miembros CSK; Dr. Michael Handford y equipo MH. En particular, agradecimientos a la Dra. Lorena Norambuena y los integrantes del grupo LNM. Se agradece la discusión apasionada del trabajo científico que ahí se realiza. Mención especial a la Ange y al Seba, por mantener el orden y la limpieza del lab.

A la gente con la que compartí departamentos: Víctor, Carissa, Gonzalo.

Y finalmente, agradezco al cosmos por las amistades que conocí a lo largo de la carrera/lab: Fran, Romina, Marlene, Hita, Pato Pérez, Caro Rosas, Bea Vásquez, Joel, Rolo, Ariel, Juanjo, Talo y Mati.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Sales minerales y agricultura	1
1.2. Mecanismos para hacer frente al estrés salino	4
1.3. Biotecnología de cultivos tolerantes	6
1.4. Relacionando genes de función desconocida al estrés iónico	6
1.5. Genética reversa y expresión heteróloga	9
1.6. Hipótesis	12
1.7. Objetivos	12
1.7.1. Objetivo general	12
1.7.2. Objetivos específicos	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Bases de datos y programas informáticos utilizados	13
2.2. Medios y condiciones de cultivo	15
2.2.1. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
2.2.2. Cultivo de bacterias	16
2.2.3. Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.2.4. Ensayos de estrés iónico	17
2.3. Material biológico empleado en el seminario de título	17
2.3.1. Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.3.2. Esterilización y estratificación de semillas	17
2.3.3. Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.3.3.1. Genotipificación de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
2.3.3.2. Extracción de ARN de tejido vegetal y síntesis de ADNc de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2.3.3.3. Amplificación y aislamiento del ADNc de <i>ITRG7</i>	23
2.3.4. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	23
2.3.4.1. Preparación de células quimicompetentes de <i>E. coli</i>	24
2.3.4.2. Transformación de <i>E. coli</i>	24
2.3.5. Cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.3.5.1. Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	25
2.3.5.2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	25
2.3.6. Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.3.6.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>S. cerevisiae</i>	26
2.3.6.2. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> por electroporación	27
2.3.6.3. Extracción de ARN de levaduras y síntesis de ADNc	27
2.3.6.4. Extracción de proteínas desde levaduras y análisis de Western Blot	28
2.4. Vectores utilizados	29

2.5.	Extracción de ADN plasmidial	30
2.6.	Partidores, reacciones de PCR y visualización de los amplificados	31
2.7.	Cuantificación de los niveles de transcrito mediante PCR cuantitativo	33
2.8.	Análisis del fenotipo en estrés iónico de las plantas de <i>A. thaliana</i>	34
2.9.	Análisis del fenotipo en estrés iónico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.10.	Microscopía de epifluorescencia de levaduras transformadas	34
3.	RESULTADOS	35
3.1.	Análisis informático de <i>ITRG7</i>	35
3.1.1.	<i>ITRG7</i> es una proteína transmembrana con péptido señal	36
3.1.2.	<i>ITRG7</i> se destina a la ruta secretoria	37
3.1.3.	<i>ITRG7</i> se expresa preferentemente en semilla y en raíz de <i>Arabidopsis</i>	39
3.1.4.	La expresión de <i>ITRG7</i> cambia ante estrés salino y osmótico	39
3.2.	Evaluación de los niveles de transcrito de <i>ITRG7</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> tipo silvestre	42
3.2.1.	Los niveles de transcrito de <i>ITRG7</i> disminuyen en presencia de iones	42
3.3.	Caracterización molecular de la mutante insercional <i>itrg7-1</i>	44
3.3.1.	<i>itrg7-1</i> es una mutante insercional homocigota	45
3.3.2.	Línea mutante presenta menos niveles de transcrito de <i>ITRG7</i>	47
3.4.	Análisis comparativos de plantas tipo silvestre y mutantes <i>itrg7-1</i>	49
3.4.1.	Respuesta germinativa de <i>itrg7-1</i>	49
3.4.2.	Cuantificación de largo de raíz de plantas <i>itrg7-1</i>	51
3.4.3.	Medición de peso fresco de plantas <i>itrg7-1</i>	52
3.5.	Clonamiento del ADNc de <i>ITRG7</i> en vectores de expresión en plantas y levaduras	53
3.5.1.	Extracción de ARN y síntesis de ADNc de <i>ITRG7</i>	54
3.5.2.	Clonamiento de <i>ITRG7</i> y recombinación en vectores de expresión en levadura y planta	56
3.5.3.	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con vectores de expresión de <i>ITRG7</i>	58
3.5.4.	Transformación de levaduras con vectores de expresión de <i>ITRG7</i>	59
3.6.	Presencia de <i>ITRG7</i> recombinante en levaduras	59
3.7.	<i>ITRG7</i> limita el crecimiento de levaduras en presencia de iones	66
4.	DISCUSIÓN Y PROYECCIONES	70
4.1.	Análisis estructurales de <i>ITRG7</i>	70
4.2.	Niveles de transcrito de <i>ITRG7</i> como evidencia de su participación en estrés iónico	71
4.3.	Caracterización de la mutante <i>itrg7-1</i>	73
4.4.	Clonamiento y expresión heteróloga de <i>ITRG7</i> en levaduras	75
5.	CONCLUSIONES	81
6.	BIBLIOGRAFÍA	82
	ANEXO	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	Concentraciones de cadmio, cobre y zinc en valles chilenos de importancia agrícola	4
Tabla II	Compuestos y concentraciones utilizadas en los experimentos del presente seminario de título	17
Tabla III	Partidores empleados para la genotipificación de las líneas de <i>A. thaliana</i>	20
Tabla IV	Programa de la reacción de PCR empleado para la genotipificación de las líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Tabla V	Protocolo empleado para realizar la síntesis de ADNc	22
Tabla VI	Programa de PCR para amplificar <i>ITRG7</i>	23
Tabla VII	Resumen de los vectores empleados en el presente seminario de título	29
Tabla VIII	Criterios utilizados en el programa Oligo Analyzer para el diseño de partidores según su uso en PCR convencional o PCR cuantitativo	31
Tabla IX	Partidores empleados en el seminario de título	31
Tabla X	Programa de qPCR utilizado en los diferentes experimentos de medición de los niveles de transcrito de <i>ITRG7</i>	33
Tabla XI	Resultados arrojados por los programas de predicción de dominios transmembrana	36
Tabla XII	Resultados de la predicción de localización subcelular para <i>ITRG7</i> e <i>IRT1</i> , ambas destinadas a la vía secretoria	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema del gen <i>ITRG7</i> silvestre y el alelo mutante en la línea <i>itrG7-1</i>	20
Figura 2	Análisis de <i>ITRG7</i> con InterProScan	35
Figura 3	Topología de <i>ITRG7</i>	38
Figura 4	Patrones de expresión de <i>ITRG7</i> según interfaz eFP Browser	40
Figura 5	Cambios en la expresión de <i>ITRG7</i> luego de diversos tratamientos	41
Figura 6	Niveles de transcrito relativos de <i>ITRG7</i> en plantas tipo silvestre tratadas con distintos iones	44
Figura 7	Genotipificación de <i>itrG7-1</i>	47
Figura 8	Análisis de presencia de transcrito de <i>ITRG7</i> en hoja	48
Figura 9	Análisis de los niveles de transcrito de <i>ITRG7</i> en planta completa	48
Figura 10	Tasa de germinación de plantas <i>itrG7-1</i> en medios enriquecidos con iones	50
Figura 11	Comparación largo de raíz entre plantas tipo silvestre e <i>itrG7-1</i> en medios enriquecidos con iones	52
Figura 12	Medición peso fresco de plantas tipo silvestre e <i>itrG7-1</i> luego de tratamientos con medios enriquecidos en iones	53
Figura 13	Extracción de ARN y obtención de ADNc de <i>ITRG7</i> desde <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
Figura 14	Comprobación del clonamiento y orientación del fragmento de ADNc de <i>ITRG7</i> en vector pCR8	57
Figura 15	Verificación de transformantes de <i>A. tumefaciens</i> con vectores de expresión en plantas	58
Figura 16	Verificación de ADNc de levadura mediante amplificación de cadena liviana de clatrina	60
Figura 17	Las levaduras transformadas generan un transcrito recombinante de <i>ITRG7</i>	61
Figura 18	Las levaduras transformantes <i>ITRG7</i> -GFP producen una proteína GFP positiva	62
Figura 19	<i>ITRG7</i> -GFP presenta una distribución discreta en levaduras	64
Figura 20	La distribución de <i>ITRG7</i> -GFP en levadura es diferente a la del núcleo	65
Figura 21	<i>ITRG7</i> en levadura <i>S. cerevisiae</i> confiere sensibilidad a sal, zinc, cobre, y cadmio	68
Figura 22	Ensayos de crecimiento de levaduras transformantes en medio líquido	69
Figura 23	Fotografías de agrosomas, gotas lipídicas e <i>ITRG7</i> -GFP en levaduras	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT2	: gen actina 2, empleado como gen de referencia
ADN (DNA)	: ácido desoxirribonucleico
ADNg (gDNA)	: ADN genómico o cromosomal
ADNc (cDNA)	: ADN sintetizado a partir de ARN mensajero
ARN (RNA)	: ácido ribonucleico
ARNm (mRNA)	: ARN mensajero
DNAsa	: desoxi-ribonucleasa
dNTP	: Desoxinucleótido trifosfato (A, T, G o C)
EDTA	: ácido etilendiamintetraacético, ocupado como quelante de cationes
EtOH	: etanol
Máxima velocidad	: corresponde a 14.000 rpm
OD₆₀₀	: Densidad óptica, obtenida a un paso de luz de 600 nanómetros de longitud de onda
ORF	: Marco abierto de lectura, sección codificante de un gen sin codón terminal
PAGE	: electroforesis en geles de poliacrilamida
pb (bp)	: pares de bases
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
PP2A	: gen proteína fosfatasa 2, empleado como gen de referencia
qPCR	: PCR cuantitativo
rpm	: revoluciones por minuto
RT	: transcriptasa reversa, transcripción reversa
s	: coeficiente de sedimentación
Tm	: temperatura de desnaturalación térmica
UBQ10	: gen ubiquitina 10, empleado como gen de referencia
UTR	: región no traducida del ARNm
Wt	: línea silvestre

RESUMEN

En *Arabidopsis thaliana*, mediante análisis de coexpresión, se identificó un nuevo producto génico posiblemente involucrado en estrés iónico, al cual hemos denominado ITRG7 (*Ion Transport Related Gene 7*). Sin embargo, ITRG7 no posee función o rol biológico reportado. Mediante análisis bioinformáticos de la secuencia aminoacídica de ITRG7 se han identificado aspectos estructurales, como la presencia de 10 dominios transmembrana, un péptido señal y dos dominios que asocian a ITRG7 a la familia de exportadores multidrogas y metabolitos en plantas. Utilizando plantas de *Arabidopsis* tipo silvestre se encontró que los niveles de transcrito de *ITRG7* disminuyen cuando las plantas son crecidas en medios enriquecidos en cadmio, cobre o cloruro de sodio. Con estos antecedentes, se planteó abordar el estudio en el contexto de estrés iónico de esta proteína mediante dos aproximaciones: genética reversa en *Arabidopsis thaliana* y expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*. En la primera aproximación se empleó y caracterizó una línea mutante insercional denominada *itrg7-1*, la cual es una mutante pérdida de función, con un 60% menos de niveles de transcrito de *ITRG7*. Presenta una tasa de germinación similar a plantas tipo silvestre y es afectada por tratamientos con cadmio, cobre o sal de manera similar a plantas tipo silvestre. No obstante, posee mayor peso fresco que plantas tipo silvestre y mayor largo de raíz que plantas tipo silvestre luego de tratamientos con 150mM de NaCl. La expresión heteróloga de *ITRG7* en levadura no es perjudicial. Sin embargo, al crecer levaduras transformantes ITRG7 en medios enriquecidos con iones, éstas poseen menor tolerancia a estrés iónico que levaduras control. Por último, la proteína recombinante ITRG7-GFP se localiza en un compartimiento subcelular de identidad desconocida. La evidencia recopilada en este trabajo da luces sobre la participación de *ITRG7* en estrés iónico.

ABSTRACT

Trough coexpression analysis, a new gene product putatively related to ionic stress in *Arabidopsis thaliana* was identified, which has been named as ITRG7 (Ion Transport Related Gene 7). However, ITRG7 lacks function or biological role. By means of bioinformatic analysis of the ITRG7 amino acid sequence we have been able to identify structural aspects, like the presence of 10 transmembrane domains, a signal peptide, and two plant multidrug/metabolite exporter domains. ITRG7 transcripts are reduced in wild-type *Arabidopsis*, when treated with cadmium, copper or sodium chloride. With this evidence, it was proposed the study of ITRG7 through two strategies: reverse genetics in *Arabidopsis thaliana* and heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. A loss of function insertional mutant, named as *itrg7-1*, has 60% less ITRG7 transcripts compared to wild-type. Its germination rate is like the observed in wild-type, even under cadmium, copper or sodium chloride treatments. Nevertheless, it weighs more than wild-type and presents a longer principal root than wild-type under 150mM sodium chloride treatment. The heterologous expression of ITRG7 in yeast it is not harmful. However, ITRG7 transformant yeast present sensitivity to growth when ion enriched media are used. Finally, the recombinant ITRG7 protein localizes in an unknown subcellular compartment. The collected evidence in this work rises a putative role of *ITRG7* in ionic stress.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sales minerales y agricultura

La nutrición mineral en plantas es única ya que logra la extracción de compuestos inorgánicos desde el medio que rodea al vegetal sin necesidad de depender de otros organismos (Kochian, 2001). En agricultura, históricamente, el manejo adecuado de las sales minerales en el suelo permite la obtención de una producción óptima, tanto en cantidad como en calidad. Sin embargo, hoy en día es posible observar dos fenómenos asociados a los nutrientes inorgánicos. Por un lado, tenemos suelos con disponibilidad de nutrientes por debajo del nivel requerido (Lynch y St. Clair, 2004) y por otro, una escalada salinización de los suelos en las regiones áridas, semiáridas y templadas del globo, en donde es extensivo el uso de la irrigación (Juárez y col., 2006a). Entiéndase irrigación como *“el conjunto de dispositivos sociotécnicos que permiten aportes artificiales de agua sobre tierras para obtener una producción agrícola”* (Durand-Dastes y Haghe, 2012).

La baja disponibilidad de nutrientes no es algo nuevo, ocurre principalmente en suelos nativos, muchos de ellos inherentemente fértiles pero que presentan densas comunidades vegetales, generando una intensa competencia por los nutrientes. En cambio, en el otro extremo de la ecuación, la creciente salinización de los suelos es algo preocupante. De acuerdo con el Servicio de Manejo de las Tierras y de la Nutrición de las Plantas de la FAO, de las 230 millones de hectáreas de tierras irrigadas en el mundo, 45 millones están afectadas por salinidad (19,5%) (Munns, 2012). En Chile el panorama es similar, ya que del total de hectáreas irrigadas, un 35% se cataloga como suelo salino (Stockle, 2002).

Un ejemplo lo constituye lo que ocurre en el norte chico del país, en donde los valles de Copiapó, Huasco, Elqui, Limarí y Choapa presentan altos niveles de salinidad

(Sierra, 2008). Estos valles —de incuestionable importancia agrícola— utilizan las aguas de sus ríos mediante sistemas de irrigación; su salinización se explica por el uso de aguas con alta conductividad eléctrica, altas tasas de evaporación y transpiración de los suelos y escasas precipitaciones, factores que en conjunto impiden el lavado natural de las sales del suelo (Sierra y cols., 2008). En particular, en el valle de Copiapó un 50% de los suelos contienen concentraciones sobre 30mM de sodio y cloruro, concentraciones que “*ocasionan severos problemas de toxicidad para muchas especies vegetales*” (Sierra y cols., 2008).

En general, las fuentes de sales inorgánicas se pueden reducir a cuatro (adaptado de Juárez y col., 2006a):

- 1-. *Lluvia*: La lluvia deposita sales que son arrastradas por el viento. Es observable principalmente en zonas costeras o con alta actividad industrial.
- 2-. *Meteorización de minerales*: La descomposición de las rocas permite, por medio de la erosión, el transporte de detritos mediante viento o lluvia. Observable en los nacimientos de las cuencas hídricas de los Andes.
- 3-. *Sales fósiles*: Son sales remanentes de masas marinas aisladas o desecación de lagos salados cuya incorporación al suelo puede ser por causas naturales o antropogénicas. Un buen ejemplo lo constituye el desierto de Atacama.
- 4-. *Actividad humana*: La polución de la atmósfera debido a actividad industrial, el vertido y transporte de residuos industriales líquidos, la obtención de aguas subterráneas a través de estratos salinos, uso de agua muy salina para el riego y la deforestación son causantes de salinidad de suelos. Esto no ocurre tan solo en los alrededores de la intervención humana, ya que a través de la percolación, disolución y transporte en el sustrato, estas sales pueden finalmente terminar en zonas sin problemas de salinidad.

Todas las aguas naturales contienen cantidades variables de sales disueltas, siendo los cloruros y sulfatos de los cationes Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ las sales mayoritarias, al ser las más solubles. No obstante, la utilización frecuente de fertilizantes y plaguicidas en la agricultura ha gatillado una acumulación pasiva de metales pesados en los suelos. Estos metales provienen de impurezas de las materias primas utilizadas para la confección de estos compuestos (Juárez y col., 2006b).

Entre los principales metales contaminantes se encuentran el cadmio, el cobre, el zinc y el plomo. El problema se agrava aún más cuando estos metales se encuentran en un suelo salino, pues pueden formar complejos con los cloruros y sulfatos presentes, aumentando la solubilidad y movilidad de estos elementos en el sustrato, lo que favorece su absorción por parte de los vegetales (Norvell y col., 2000).

Entre los años 1981 y 1990, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) llevó a cabo dos estudios del contenido total de cadmio, cobre y zinc (entre otros metales) en suelos aluviales ubicados entre los ríos Huasco (III Región) y Simpson (XI Región), encontrándose altos niveles de estos elementos en varios valles de significancia agrícola para Chile (INIA, 1986; INIA, 1990). En la Tabla I se muestra un resumen con los valles que presentaron sitios con altos contenido de cadmio, cobre y zinc, los cuales abarcan las regiones cuarta, quinta, metropolitana y sexta; indicándose los valores mínimos, máximos y promedios de contenido de cadmio, cobre y zinc por valle y su clasificación según el grado de contaminación de acuerdo a los índices de Kelly aplicados por la Unión Europea (*Society of the Chemical Industry*, 1980), que considera de menor a mayor grado de contaminación la siguiente escala: "sin contaminar", "contaminación ligera", "contaminación", "contaminación alta" y "contaminación alta inusual".

En un reciente estudio realizado por Hirzel y colaboradores (2015) — interesados en realizar una prospección de metales pesados en 40 sitios de cultivo de trigo y maíz ubicados entre la IV y IX Región— se reportó la presencia de cobre y zinc en un rango desde adecuado a alto para cultivos agrícolas, así como concentraciones de cadmio por debajo del límite crítico para la producción agrícola.

De esta forma, la presencia de metales pesados y salinidad en los suelos agrícolas son materias en las que Chile no queda ajeno.

Tabla I. Concentraciones de cadmio, cobre y zinc en valles chilenos de importancia agrícola. Se indican los nombres, región y las mediciones promedio, valor mínimo y valor máximo registrados en sitios ubicados en los respectivos valles y la clasificación según índices de Kelly. Adaptado de INIA (1990).

Metal	Valle	Región	mg/Kg de suelo seco			Clasificación según índices Kelly (se consideró el valor máximo)
			Promedio	Mínimo	Máximo	
Cadmio	Aconcagua	V	0,30	<0,1	4,74	Contaminación
	Puchuncaví	V	0,91	<0,1	5,13	Contaminación
	Mapocho	RM	1,02	<1,0	2,90	Contaminación ligera
	Maipo	RM	0,45	<1,0	2,84	Contaminación ligera
Cobre	Elqui	IV	87	14	160	Contaminación ligera
	Limarí	IV	65	36	100	Contaminación ligera
	Ligua	V	72	16	274	Contaminación
	Aconcagua	V	128	33	1733	Contaminación alta
	Puchuncaví	V	543	52	3833	Contaminación alta
	Mapocho	RM	197	42	856	Contaminación alta
	Maipo	RM	72	7,5	243	Contaminación
Zinc	Cachapoal	VI	427	39	1180	Contaminación alta
	Tinguiririca	VI	54	14	245	Contaminación
	Elqui	IV	179	40	320	Contaminación ligera
Zinc	Mapocho	RM	150	72	312	Contaminación ligera
	Cachapoal	VI	136	11	250	Contaminación ligera

1.2. Mecanismos para hacer frente al estrés salino

Los efectos de las sales en plantas son consecuencias de una deficiencia hídrica (estrés osmótico) y un exceso de iones en procesos bioquímicos claves, generando malfuncionamiento de enzimas, proteínas y producción de radicales libres, especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo (Zhang y Blumwald, 2001; Conde y col., 2011).

Para hacer frente al daño que causan estas sales, las plantas han desarrollado diferentes herramientas fisiológicas y bioquímicas para tolerar y adaptarse a las sales y metales pesados. Estos mecanismos son:

Senescencia y exudación en hojas: algunos vegetales han desarrollado una estrategia que les permite traslocar y acumular la sal en el tejido foliar, el que se va eliminando mediante la caída del mismo o la expulsión de un exudado con sales altamente concentradas.

Solutos compatibles: son moléculas solubles en agua que se pueden acumular en grandes cantidades en la célula, como mecanismo osmoprotector, sin interferir en las reacciones que ocurren en el citoplasma o en los organelos (Shabala y Cuin, 2006).

Proteínas de estrés térmico: se ha reportado que aumentan su presencia frente a varios tipos de estreses, incluido el salino. Generalmente actúan como chaperonas durante el plegamiento y ensamblaje de otras proteínas, no obstante, podrían participar en la protección o reparación de proteínas durante condiciones de estrés (Lewis y col., 1999).

Fitoquelatinas y metalotioneínas: son péptidos cuya propiedad es la quelación de metales, causando el secuestro de los iones (Cobbett y Goldsbrough, 2002). La diferencia entre ellas es que las primeras son producto de una reacción enzimática, mientras que las últimas se encuentran codificadas en el ADN.

Ligandos orgánicos: producen un efecto similar a los de las fitoquelatinas. Ejemplos son el ácido cítrico y el ácido oxálico (Hall, 2001).

Transportadores: son proteínas transmembrana que permiten el paso a través de la membrana de diversas moléculas, entre ellas iones, ligandos de iones, proteínas o solutos compatibles. Permiten la distribución y compartimentalización a nivel celular de los elementos necesarios para hacer frente al estrés abiótico (Haydon y Cobett, 2007;

Ward y col., 2009). Existen diferentes clases, clasificación que es dependiente del cómo se activan y/o de las sustancias que transporten.

1.3. Biotecnología de cultivos tolerantes

Se han planteado diversas estrategias, basadas en biotecnología, para generar cultivos tolerantes a salinidad. Entre las primeras encontramos un caso de un tomate transgénico capaz de crecer, florecer y producir frutas a una concentración de 200mM de NaCl (Zhang y Blumwald, 2001). Para ello, se utilizó un transportador vacuolar de *Arabidopsis thaliana* que funciona como un intercambiador Na^+/H^+ de. Este intercambiador aprovecha la fuerza protón motriz generada en la vacuola por enzimas translocadoras de H^+ para acoplar el movimiento de H^+ (a favor de su potencial electroquímico) con el movimiento de Na^+ (contra su potencial electroquímico), permitiendo la compartimentalización de Na^+ al interior de la vacuola.

Una estrategia similar se utilizó en arroz, en donde Zhao y cols (2006) utilizaron un intercambiador Na^+/H^+ de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* para modificar genéticamente plantas de arroz, observando que otorga a éstas resistencia a sal, manteniendo altos niveles de fotosíntesis y reducidos niveles de especies reactivas de oxígeno.

Otros ejemplos satisfactorios han sido obtenidos usando como modelo *Arabidopsis thaliana*, lo que abre un área interesante a desarrollar.

1.4. Relacionando genes de función desconocida al estrés iónico.

Hoy en día la cuantiosa información genómica disponible en múltiples bases de datos nos permite enfrentar un nuevo desafío: descubrir nuevos genes asociados a respuesta a estrés salino y/o por metales en los sistemas biológicos.

Empleando análisis de coexpresión —utilizando datos de perfiles de expresión global de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* que se encuentran disponibles para la comunidad académica— Alexander Vergara, durante su estadía postdoctoral en nuestro laboratorio, generó un listado con 55 genes candidatos para ser asociados al proceso biológico de transporte iónico. Estos fueron denominados *ITRG* por “*Ion Transport Related Genes*”, los cuales fueron ordenados de acuerdo al coeficiente de correlación con el fin de priorizar su estudio. De los 55 genes se seleccionaron los 12 *ITRG*'s con la mejor probabilidad de estar involucrados en estrés iónico. El estudio de estos doce genes fue abordado por un equipo compuesto por Daniela Urbina (Postdoctorado) —quién se abocó a los genes *ITRG*'s 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 y 12—, Matías Freire (Magíster) —quién estudió los *ITRG*'s 1, 2 y 3—, y, en lo que respecta a este seminario de título, correspondió el estudio del gen *ITRG 7*.

La plataforma “*The Arabidopsis Information Resource*” (TAIR) mantiene una actualizada base de datos de biología molecular y genética de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Dentro de la información disponible se cuenta con la secuencia del genoma completo, la estructura de los genes, información de los productos génicos, datos de metabolismo, datos de expresión génica, mapas del genoma y marcadores genéticos. Al consultar información sobre *ITRG7*, de acuerdo a datos de expresión obtenidos por microarreglos, es posible rescatar que corresponde a un gen que se expresa en raíces (Schmid y col., 2005). Sin embargo, no existen evidencias publicadas sobre su función molecular.

En el año 2001, dada la secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis*, Ward (2001) agrupó las proteínas de membrana de esta planta en familias de función conocida —basado en evidencia experimental y homología con otras proteínas de plantas u otros organismos— o de función desconocida. Considerando esta

clasificación, *ITRG7* se encuentra dentro de la familia de proteínas tipo Nodulina 21 de *Medicago truncatula* (*MtN21*), que posee 47 miembros. *MtN21* fue originalmente identificada por detección diferencial en una librería hecha a partir de nódulos en presencia versus ausencia de un rizobio (Gamás y col., 1996), por ello el nombre de “nodulina”.

Si bien *Arabidopsis* no realiza nodulación, la presencia en el genoma de este tipo de genes —y su expresión— hace presumir que deben cumplir otros roles claves en el desarrollo de la planta, particularmente en especies no nodulantes. Pese a esto, el conocimiento actual de genes anotados como tipo *MtN21* es limitado. Busov y colaboradores (2004), estudiando la relación entre maduración y formación de raíces adventicias en pino (*Pinus taeda*), sugieren una correspondencia entre la inducción por auxina de un homólogo de *MtN21* y la formación de raíces adventicias en esta especie arbórea. Tiempo después, Ranocha y colaboradores (2010) reportaron que una mutante pérdida de función de una proteína tipo *MtN21* en *Arabidopsis* presenta deficiencia de triptófano y auxina, carece de transporte basipetalo de esta hormona y muestra una desregulación en la expresión de varios genes auxina-dependientes, incluidos algunos involucrados en la biosíntesis de la hormona, su transporte y la respuesta a ella. A nivel morfológico la mutante presenta un detrimento en la elongación celular, así como cambios en las propiedades mecánicas y una severa reducción en el grosor de las paredes de las fibras del tallo. Recientemente este grupo ha demostrado que la proteína actúa como facilitador vacuolar del exporte de auxina en vacuolas aisladas de *Arabidopsis*, en levaduras y en oocitos de *Xenopus* (Ranocha y col., 2013).

En el año 2012 se publicó un trabajo en el que un miembro de esta familia de proteínas de *Arabidopsis* actúa como transportador de aminoácidos bidireccional,

capaz de importar glutamina, histidina y aspartato en levadura y oocitos de *Xenopus laevis* y exportar glutamina, valina, citrulina e isoleucina al medio de cultivo de levadura (Ladwig y cols, 2012). Los autores proponen que esta proteína podría estar involucrada en la liberación de aminoácidos desde el floema hacia el espacio apoplástico, haciéndolos disponibles para el importe en las células adyacentes del endosperma y el embrión.

1.5. Genética reversa y expresión heteróloga

Para abordar el estudio de *ITRG7* —en el contexto de validar su asociación al proceso biológico de transporte iónico y su implicancia en el estrés iónico— en el presente seminario de título se han utilizado dos aproximaciones: 1) genética reversa en *Arabidopsis thaliana* y 2) sistema de expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*.

La primera de ellas consiste en la utilización de una línea de *Arabidopsis* que posee una mutación insercional en el gen de interés, con el fin de caracterizar fenotípicamente los efectos que causa la modificación genética.

Es sabida la prevalencia que tiene la redundancia genética y funcional en *Arabidopsis*, fenómeno responsable de la ausencia de fenotipo en la mayoría de las mutantes pérdida de función individuales (Briggs y cols, 2006). El fenotipo a observar —en este caso ante la presencia de iones— podría enmascarse, recordemos que son 47 los miembros de la familia MtN21. Por ello resulta conveniente la complementación del estudio con otro tipo de aproximación.

La segunda estrategia se basa en el empleo de levadura como sistema de expresión heterólogo. Las levaduras son organismos eucariontes que, a diferencia de las bacterias, poseen mecanismos moleculares y celulares que son conservados en

plantas. Son de rápido crecimiento, de fácil manipulación genética y se dispone de una amplia variedad de herramientas moleculares con las que trabajar (Prelich, 2012).

La sobreexpresión de un gen de interés puede causar alteraciones en el fenotipo de levaduras transformadas, alteraciones que podrían otorgar luces acerca de la implicancia de ITRG7 en el proceso de transporte iónico.

Ambas estrategias han sido utilizadas en trabajos previos con el fin de caracterizar genes de Arabidopsis implicados en estrés u homeostasis iónica. Un claro ejemplo lo constituye el reporte de Moreno y colaboradores (2008). Con el objetivo analizar la especificidad de AtHMA1 -proteína miembro de la familia de las P_B-ATPasas, implicadas en el transporte de metales pesados- realizaron complementación funcional usando mutantes de levaduras defectivas en transporte de metales pesados. La expresión heteróloga complementó el fenotipo de la cepa mutante y en la cepa silvestre aumentó la tolerancia a Cobre, Zinc, Cobalto y Cadmio

Se puede también citar el trabajo de Arrivault (2006), el que utilizó una cepa de levadura para investigar la función celular del transportador vacuolar MTP3 (Metal Tolerance Protein 3) de Arabidopsis. La cepa empleada es una mutante sensible a Zinc que carece de dos transportadores que contribuyen al transporte de este catión hacia la vacuola. Los resultados obtenidos dan cuenta de que las levaduras que expresan MTP3 son capaces de crecer en concentraciones de hasta 5mM de zinc, mientras que las carentes de este transportador ven disminuido su crecimiento hasta en un 80% a una concentración de 0,5mM de zinc.

Otros ejemplos del uso de levaduras como sistema de expresión heterólogo lo constituyen los trabajos mencionados en páginas previas, sobre la caracterización de proteínas de Arabidopsis miembros de la familia de Nodulinas tipo MtN21.

Los escasos antecedentes reportados hacen del estudio de *ITRG7* una oportunidad puesto que, por un lado, se podría llegar a validar la asignación del proceso biológico de transporte iónico, y por otro, se establecería una conexión con el estrés ocasionado por exceso de sal y/o de metales, mostrando de esta manera un rol multipropósito de la familia de proteínas tipo nodulina en *Arabidopsis thaliana*. Paralelamente, se contaría con un gen candidato para el cual se podrían evaluar potenciales usos biotecnológico, tanto en sistemas vegetales de interés agrícola como en levaduras utilizadas en el ámbito industrial.

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados, en el presente seminario de título se evaluó y se cuantificó parámetros fenotípicos de plantas tipo silvestre y de plantas mutante en *ITRG7* —crecidas a la par— en medios con presencia de sales. Luego, se generaron las herramientas moleculares que permitirán la sobreexpresión del gen en sistemas vegetales y/o la complementación de plantas mutantes con fines tanto de estudio como de aplicación biotecnológica. Por último, se transformó levaduras con el gen *ITRG7* —expresado constitutivamente— y el efecto de los iones en su crecimiento fue analizado.

Los resultados obtenidos logran acercarse a la hipótesis planteada y dan cumplimiento a los objetivos planteados.

1.6. Hipótesis

"*ITRG7* otorga resistencia a estrés iónico en *Arabidopsis thaliana* y *Saccharomyces cerevisiae*"

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo general

-Evaluar la participación de *ITRG7* en estrés iónico en *Arabidopsis thaliana* y *Saccharomyces cerevisiae*.

1.7.2. Objetivos específicos

-Caracterización y evaluación de la mutante insercional *itrg7-1* de *Arabidopsis thaliana* frente a estrés iónico.

-Generación de las herramientas moleculares necesarias para la transformación en *Arabidopsis thaliana* con *ITRG7*.

-Evaluación de la tolerancia de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas con *ITRG7* frente a estrés salino y por metales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Bases de datos y programas informáticos utilizados

La secuencia nucleotídica y aminoacídica de *ITRG7* fue obtenida desde la base de datos *The Arabidopsis Information Resource*, TAIR (www.arabidopsis.org), mediante el código del gen en formato ATxGxxxxx (se omite por asuntos de propiedad intelectual). Para analizar en primera instancia la secuencia proteica de *ITRG7* se empleó la herramienta InterProScan (www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan). Dada la información arrojada por este programa se procedió a realizar una serie de análisis predictivos con varias herramientas disponibles. Los análisis de putativos dominios transmembrana se hicieron con los algoritmos Phobius (<http://phobius.sbc.su.se>), TmHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) y Sosui (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html). Para la determinación de presencia de péptido señal se emplearon los servidores web SignalP 3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP3.0/), PrediSi (www.predisi.de) y SosuiSignal (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html). La predicción de localización subcelular se hizo con los servidores TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), Predotar 1.03 (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) e IPSORT (<http://ipsort.hgc.jp/>). Por último, la topología de *ITRG7* fue calculada mediante los programas TOPPRED (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>) y RBDE (<http://icb.med.cornell.edu/crt/RbDe/RbDe.html>).

Con el fin de recabar información adicional acerca de ITRG7 se consultaron las siguientes herramientas integrativas de bases de datos:

The Arabidopsis thaliana Integrated Database, ATIDB (<http://atidb.org/>)

Gonuts (http://gowiki.tamu.edu/wiki/index.php/Main_Page)

AceView (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>)

RIKEN SciNetS (<https://database.riken.jp/sw/en/SciNetS/crib158s66i/>)

Aramemnon (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>)

Predict Protein (<http://www.predictprotein.org/>)

Para el análisis *in-silico* de la expresión génica de *ITRG7* se empleó la herramienta de análisis de datos de microarreglos *Arabidopsis eFP Browser* (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), en donde se comparó su expresión con tres genes de expresión constitutiva, validados y ampliamente utilizados (Czechowski y col., 2005): Actina 2 (AT3G18780), Ubiquitina 10 (AT4G05320) y Proteína Fosfatasa 2A (AT1G13320). Se analizó y comparó los niveles de transcrito tanto a nivel de las diferentes etapas de desarrollo de *Arabidopsis thaliana* como en tratamientos abióticos, ambas opciones entregadas por la interfaz gráfica.

La mutante insercional *itrg7-1* fue obtenida desde la colección SALK (SIGNAL, <http://signal.salk.edu>) que es administrada por el banco de mutantes *Arabidopsis Biological Resource Center*, ABRC (<http://abrc.osu.edu/>).

El diseño de los partidores para PCR cuantitativo y convencional fue realizado con la herramienta Oligo Analyzer, disponible en <http://www.idtdna.com> (mayores detalles en la sección 2.6).



2.2. Medios y condiciones de cultivo

2.2.1. Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Para el cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* se empleó el medio hidropónico y el medio Murashige-Skoog (MS), para cultivo en invernadero e *in-vitro*, respectivamente. La preparación y utilización de ambos medios se describe a continuación:

—*Medio hidropónico, composición solución stock 100x*: KNO_3 125 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 150 mM, MgSO_4 75 mM, KH_2PO_4 50 mM, KCl 5 mM, H_3BO_3 5 mM, MnSO_4 1 mM, ZnSO_4 200 μM , CuSO_4 150 μM , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 7,5 μM , Na_2SiO_3 10 mM y Sprint 330 7,7 mM (Fe quelado en ácido dietilentriaminopenta acético), ajustando el pH a un valor final igual a 5. Para obtener una solución 1x se diluye en agua corriente (Gibeaut y col., 1997). Las semillas fueron puestas en soporte de lana de roca embebida en medio hidropónico, las que se ajustaron a los agujeros de las cajas de cultivo. Una vez sembradas, a las cajas se les colocó una película plástica en la parte superior, manteniéndose hasta que todas las plantas presentaran roseta vegetativa, tras lo cual se procede a retirar la película plástica. Las plantas fueron mantenidas en este medio hasta que comenzaron a secarse, momento en el cual se dejó de suministrarles el medio y se les colocó un capuchón de papel, con el fin de recolectar semillas.

—*Medio MS sólido* (MS 0,216% p/v, MES 0,05% p/v, sacarosa 1% p/v, pH 5,7, fitoagar 0,8% p/v). Las placas fueron puestas de manera horizontal para el caso de los ensayos de germinación (por 7 días) y de manera vertical para los ensayos de largo de raíz (por 10 días) y biomasa (por 21 días), en condiciones de temperatura constante a 22°C, fotoperiodo de 16/8 (h luz/oscuridad) y luminosidad de 4000 lux.

2.2.2. Cultivo de bacterias

Se utilizó medio LB (NaCl 1% p/v, extracto de levadura 0,5 p/v, peptona 1% p/v). Para obtener medio sólido se adicionó agar bacteriológico al 1,5% p/v. Se dispuso de incubadores con agitación y estufas a 36°C y 28°C para los cultivos líquidos y sólidos de *E. coli* y *A. tumefaciens*, respectivamente.

2.2.3. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Para el cultivo de levaduras se utilizaron los medios descritos a continuación:

Medio YPD —del acrónimo *Yeast, Peptone, Dextrose*— compuesto por extracto de levadura 1% p/v, peptona 2% p/v y glucosa 2% p/v. Para obtener medio sólido se adicionó agar bacteriológico al 1,5% p/v. El extracto de levadura aporta todos los aminoácidos necesarios para el desarrollo.

Medio YMM —del acrónimo *Yeast Minimal Medium*— es un medio que permite la selección por auxotrofia de levaduras, ya que se le adiciona una mezcla de aminoácidos definida para el crecimiento de las levaduras de interés. Esta mezcla dependerá del genotipo de la levadura y del marcador de selección del plasmidio a utilizar. El medio es elaborado con base nitrogenada de levadura 0,17% p/v, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5% p/v, glucosa 2% p/v, mezcla de aminoácidos 1 al 0,7% p/v y mezcla de aminoácidos 2 al 0,4% p/v (detalles de las composiciones de estas mezclas de aminoácidos en el anexo 1). Para medio sólido se adicionó agar bacteriológico al 1,5% p/v.

Se dispuso de estufas e incubadores con agitación a 28°C para los cultivos sólidos y líquidos, respectivamente.

2.2.4. Ensayos de estrés iónico

Para evaluar el efecto de iones, éstos fueron añadidos luego del proceso de autoclave de los medios, momentos antes de preparar las diferentes placas. Para esto, se dispuso de soluciones stock de los distintos compuestos a una concentración de 1M, esterilizados en campana por medio de filtros con poros de 0,22 μm adosados a jeringas. En la Tabla II se listan los compuestos utilizados y la concentración empleada en cada experimento realizado en el presente seminario de título.

Tabla II. Compuestos y concentraciones utilizadas en los experimentos del presente seminario de título.

Ensayos en plantas	Compuestos y concentraciones utilizadas		
	CdCl ₂	CuSO ₄	NaCl
Evaluación del efecto en niveles de transcrito de <i>ITRG7</i>	20 y 200 μM	15 y 100 μM	100, 150 y 250mM
Germinación (wt v/s <i>itrg7-1</i>)	50 y 100 μM	50 y 100 μM	100 y 150mM
Largo de raíz (wt v/s <i>itrg7-1</i>)	50 y 75 μM	50 y 100 μM	100 y 150mM
Peso fresco (wt v/s <i>itrg7-1</i>)	20, 75 y 200 μM	15, 50 y 100 μM	100, 150 y 250mM

Ensayos con levadura	NaCl	ZnSO ₄	CuSO ₄	CdCl ₂	CoCl ₂
Crecimiento en placa	0,5 y 1M	10mM	1 y 3mM	75 μM	500 μM
Crecimiento en medio líquido	---	---	1mM	50 μM	500 μM

2.3. Material biológico empleado en el seminario de título

2.3.1. Plantas de *Arabidopsis thaliana*

Se emplearon 2 líneas de *Arabidopsis thaliana*, una correspondiente a planta tipo silvestre y otra correspondiente a la mutante insercional SALK *itrg7-1*, ambas de ecotipo Col-0.

2.3.2. Esterilización y estratificación de semillas

Se colocó la cantidad necesaria de semillas en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y bajo campana se agregó 1 mL de EtOH al 80%, se agitó y se descartó el líquido. Luego, se adicionó 1 mL de Hipoclorito al 5%, se agitó, se decantó y se

descartó. Inmediatamente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Por último, se adicionó 300 μ L de agua estéril y se almacenaron por 2 días a 4°C en oscuridad, esto con el fin de sincronizar la germinación. Pasado este tiempo las semillas están listas para ser sembradas.

2.3.3. Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

A un tubo de 1,5 mL se agregaron 100 μ L de solución tampón de extracción (Tris-HCl 0,2 M, pH 9,0, LiCl 0,4 M, EDTA 25 mM, SDS 1% p/v) y se molieron en su interior 100 mg de tejido de plantas de *Arabidopsis* con un micropistilo. El micropistilo se lavó con 300 μ L de solución tampón de extracción y se utilizó vortex para homogeneizar el contenido del tubo. Luego, se centrifugó a 13.000xg y a temperatura ambiente por 5 minutos. Concluida la centrifugación se traspasó 350 μ L de sobrenadante a un tubo con 350 μ L isopropanol, y se mezcló su contenido invirtiendo el tubo 5 a 10 veces, tras lo cual se dejó incubando por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la precipitación de los ácidos nucleicos. En seguida se centrifugó por 10 min a 13.000xg. El sobrenadante fue eliminado, se adicionó 1mL de EtOH 80% y se mezcló invirtiendo el tubo entre 5 a 10 veces. Se centrifugó nuevamente a 13.000xg por 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante, y el tubo fue puesto hacia abajo en un trozo de papel absorbente con el fin de remover el etanol restante. Posteriormente se dejó el tubo a temperatura ambiente por 1 h con el fin de evaporar el etanol residual. Por último, se adicionó 100 μ L de solución tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM), se mezcló el tubo entre 5 a 10 veces para homogeneizar y se guardó a 4°C para realizar con el DNA genómico posteriores análisis. La calidad del ADN genómico aislado fue evaluada mediante la amplificación del gen de actina.

2.3.3.1. Genotipificación de líneas de *Arabidopsis thaliana*

Las líneas de *Arabidopsis* tipo silvestre e *itrG7-1* fueron genotipificadas con el fin de comprobar la presencia ó ausencia de la inserción de T-DNA y la homocigosis de la misma. Para esto se realizaron tres análisis de PCR. Usando ADN genómico como templado se amplificó un segmento del gen que confiere resistencia al antibiótico Kanamicina, *nptII*, para confirmar la presencia del de la inserción de T-DNA en la mutante. Este gen no se encuentra en plantas tipo silvestre. Para confirmar la presencia de la inserción que interrumpe el gen *ITRG7* se realizó la amplificación de un segmento comprendido entre la región izquierda (LB, *Left Border*) de la inserción y la región promotora del gen *ITRG7*, mediante la utilización del partidor *LBb1.3* —que hibrida en el borde izquierdo de la inserción de T-DNA—, y el partidor *pITRG7R* (ver Figura 1, flechas en rojo). Para evaluar la presencia del alelo silvestre se realizó la amplificación de un segmento de 504 pares de bases, presente en el promotor del gen *ITRG7*, con los partidores denominados *pITRG7 F* y *pITRG7 R* (ver Figura 1, flechas en azul). Si existe la inserción de T-DNA, el segmento de 504 pb no debiese amplificar, ya que la inserción es de alrededor de 9.000 pb, tamaño que no puede ser abordado por la polimerasa empleada. Los detalles de cada partidor y los tamaños esperados en estas reacciones se encuentran en la Tabla III. El programa de PCR utilizado en las reacciones se encuentra en la Tabla IV, para lo cual se empleó la enzima polimerasa Paq5000 (Agilent Technologies ®). Las condiciones por reacción, de 20 µL como volumen final, fueron: 15,6 µL H₂O libre de nucleasas, 2 µL tampón de reacción 10x, 0,4 µL mix dNTP's 10mM c/u, 0,4 µL Partidor 1 10 µM, 0,4 µL Partidor 2 10 µM, 1 µL DNA templado, 0,2 µL enzima Paq5000 (5 U/µL).



Figura 1. Esquema del gen *ITRG7* silvestre y el alelo mutante en la línea *itrg7-1*. En azul se muestra la zona del promotor del gen y en verde los exones (barras) e intrones (líneas). En rojo se muestra la inserción de T-DNA, señalando el lugar en donde se encontraría, cercana a la parte media del promotor. Se señalan partidores utilizados para genotipificación y el tamaño del segmento respectivo.

Tabla III. Partidores empleados para la genotipificación de las líneas de *A. thaliana*.

Partidor	T _m (C°)	Secuencia 5' – 3'	Tamaño segmento a amplificar	Amplifica en plantas
Actina F	54	CACACTTTCTACAATGAGCT	836 pb (gDNA), 688 pb (cDNA)	Tipo silvestre y mutantes homocigotas o heterocigotas
Actina R	54	GCAGTGATCTCTTTGCTCAT		
nptII F	54	CAAGATGGATTGCACGCA	624 pb	Mutantes homocigotas o heterocigotas
nptII R	54	CTATGTCCTGATAGCGGT		
pITRG7 F	57	AGTGTGTGGTGGTGA CTTGTGAT	504 pb	Tipo silvestre
pITRG7 R	57	ATCCCCAAATGAAGAATTCA		
LBb1.3	57	ATTTTGCCGATTCGGAAC	390 pb, empleando el partidor pITRG7 R	Mutantes homocigotas o heterocigotas

Tabla IV. Programa de la reacción de PCR empleado para la genotipificación de las líneas de *Arabidopsis thaliana*.

Fase	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	1	94	10 min	1
2	1	94	30 s	30
	2	Tm partidores	1 min	
	3	72	1 min	
3	1	72	10 min	1
4	1	4	∞	1

2.3.3.2. Extracción de ARN de tejido vegetal y síntesis de ADNc de líneas de *Arabidopsis thaliana*

Las extracciones de ARN se realizaron mediante el kit *Invitrap Spin Plant RNA Mini Kit* (Invitrek®) siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. El ARN fue conservado a -80°C.

Para comprobar la calidad y concentración del ARN obtenido se empleó el equipo ND-1000 (Nanodrop®), considerando como patrones de calidad aceptables un rango de concentración entre 300 - 1600 ng/μL y un rango de OD_{260/280} 1,80 - 2,25. La integridad de los ARN se evaluó mediante electroforesis denaturante (agarosa 1,5% p/v, agua libre de nucleasas, fusión en microondas, MOPS 40mM, 3% v/v de formaldehído al 37%). Se cargó en el gel 1,5 μL de RNA conteniendo tampón de carga 1x (Winkler®), denaturado mediante tratamiento de 10 min a 70°C y enfriamiento rápido en hielo por 5 min. Posteriormente, la electroforesis se realizó por 45 min a 70V, bajo campana de extracción. Los geles fueron visualizados en un transiluminador con captura de imágenes modelo MultiGenius® SN SYDR/2082 de Syngene – Synoptics Ltd.

Uno de los pasos previos a la síntesis de ADNc corresponde a tratamiento de las muestras de ARN con DNAasa. Para ello se trató el ARN en una concentración de 0,2 μg/μL y se mezcló con 1 μL de DNAasa I (1 U/μL, Fermentas), 1μL tampón de

reacción DNAsa 1x, 0,5 μL Ribolock (40 U/ μL , Thermo Scientific, concentración final 2 U/ μL) y se completó con H_2O libre de nucleasas hasta lograr un volumen final de 10 μL . Se incubó esta reacción por 30 min a 37°C y luego por 10 min a 65°C y se agregó 1 μL EDTA a una concentración final de 2,5mM para inactivar la enzima.

Luego del tratamiento de las muestras de ARN con DNAsa, se deben hibridar los ARN con el partidor Oligo dT (ver listado de partidores de la Tabla IX). La hibridación del partidor Oligo dT a la cola de poli(A) de los ARN mensajeros permite que la enzima transcriptasa reversa sintetice la primera hebra de ADNc. Para ello, se mezclan en 2 tubos separados 0,5 μg de partidor con 5 μL de solución del tratamiento con DNAsa obtenida anteriormente, incubándose ambos a 70°C por 5 min, y luego a 4°C por otros 5 min. Se utilizan 2 tubos separados con el fin de tener un control negativo para el tratamiento con transcriptasa reversa (sin la adición de ésta). Luego, se prosiguió con la transcripción reversa, empleando 6,1 μL de H_2O libre de nucleasas, 4 μL tampón de reacción 1x ImProm-II, 2,4 μL de MgCl_2 25 mM (final 3 mM), 1 μL mezcla dNTP's 10 mM c/u (final 0,5 mM), 0,5 μL Ribolock (40 U/ μL , Thermo Scientific, final 1 U/ μL), 5 μL de tratamiento Oligo dT-ARN y 1 μL de enzima transcriptasa reversa ImProm-II (160 U/ μL , Promega®, final 8 U/ μL) o 1 μL de H_2O libre de nucleasas en el caso del control negativo. Por último, se siguió el protocolo de la Tabla V en un termociclador.

Tabla V. Protocolo empleado para realizar la síntesis de ADNc.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	25	5
2	42	90
3	70	15

2.3.3.3. Amplificación y aislamiento del ADNc de *ITRG7*

La amplificación del ADNc de *ITRG7* se realizó empleando la enzima polimerasa *Pfu* (Fermentas®), la que posee actividad correctora, permitiendo obtener amplificadas de alta fidelidad. La reacción —con un volumen final de 20 μL — se realizó como sigue: 11,8 μL de H_2O libre de nucleasas, 2 μL tampón de reacción *Pfu* 1x, 0,4 μL mezcla dNTP's 10 mM c/u (final 0,2 mM), 3,6 μL de MgSO_4 25mM (final 4,5 mM), 0,4 μL partidor *ITRG7-F*, 0,4 μL partidor *ITRG7-R*, 1 μL templado ADNc de planta tipo silvestre, 0,4 μL enzima *Pfu* 2,5 U/ μL (final 1 U/ μL). En el caso del control negativo, se agrega 0,4 μL de H_2O libre de nucleasas en vez de enzima. El programa de PCR empleado se muestra en la Tabla VI.

Se procedió a correr en gel de agarosa el producto de PCR, se visualizó en un transiluminador y se cortó la banda correspondiente al ADNc de *ITRG7* (1080pb). Luego, se purificó el ADNc de *ITRG7* mediante el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla VI. Programa de PCR para amplificar *ITRG7*.

Fase	Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
1	1	94	10 min	1
	1	94	30 s	
2	2	52	1 min	30
	3	72	2 min	
3	1	72	10 min	1
4	1	4	∞	1

2.3.4. Cepas de *Escherichia coli*

En este seminario de título se emplearon 2 cepas de *E. coli*, correspondientes a la cepa Mach1 (Invitrogen®) y a la cepa DB3.1 (resistente al marcador de selección *ccdB* empleado en los sistemas Gateway® de Invitrogen®). La primera de ellas se empleó para obtener transformantes con el vector pCR8-*ITRG7*. La segunda,

resistente al antibiótico estreptomicina (25 µg/mL), se empleó para la replicación de los vectores de expresión en levaduras y plantas, que poseen el marcador *ccdB*, cuyo producto génico ataca la DNA girasa y es letal para todas las cepas, excepto para la cepa DB3.1, la que presenta una mutación en la DNA girasa que la hace resistente a *ccdB*. Mayores detalles de los vectores utilizados se muestran en la Tabla VII.

2.3.4.1. Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*

Mach1 y *DB3.1* quimiocompetentes: Se inoculó un matraz con 250 mL de medio LB con la cepa almacenada a -80°C. Se incubó en agitación a 28°C hasta una D.O._{600nm} de 0,3. Se centrifugó a 3.000xg por 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 5 mL de tampón CCMB80 (KOAc pH 7,0 10 mM, CaCl₂·2H₂O 80 mM, MnCl₂·4H₂O 20 mM, MgCl₂·6H₂O 10 mM y glicerol 10%, esterilizado por filtración). Se resuspendieron las células con cuidado y luego se agregó CCMB80 hasta 40 mL. Se incubó esta suspensión en hielo por 20 min, luego se centrifugó a 2.000xg por 8 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron suavemente las células en 20 mL de CCMB80. Se midió la D.O._{600nm} de una mezcla de 200 µL de células resuspendidas y 800 µL de medio LB. Se agregó CCMB80 a la suspensión inicial hasta alcanzar una D.O._{600nm} entre 1 y 1,5. Por último, se incubaron en hielo durante 20 min y se alicuotó de a 100 µL para *Mach1* y de a 200 µL para *DB3.1* en tubos de 1,5 mL estériles y fríos. Las células quimiocompetentes se guardaron a -80°C.

2.3.4.2. Transformación de *E. coli*

MACH1: se siguieron las instrucciones dadas por el fabricante (número de catálogo C8620-03).

DB3.1: 200 µL de una alícuota de células quimiocompetentes fueron incubadas con el vector de interés por 45 min en hielo. Luego se dio un golpe de temperatura por

30 s a 42°C y se enfrió en hielo por 5 min. Se agregó 1 mL de medio LB y se creció en agitación por 1 h a 37°C. Se sembró 200 µL de este cultivo en una placa. Los restantes 800 µL se centrifugaron a 1.000xg por 4 min, resuspendiéndose en el mínimo de volumen, el cual fue sembrado. Las placas a usar deben contener los antibióticos respectivos para cada marcador de selección de los vectores empleados, de manera de seleccionar las bacterias que han sido transformadas con el vector de interés.

2.3.5. Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada corresponde a GV3101 y es resistente a los antibióticos gentamicina (50 µg/mL) y rifampicina (12,5 µg/mL).

2.3.5.1. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*

Las bacterias fueron crecidas hasta alcanzar la fase log (tiempo de duplicación de aproximadamente 2 h). 2 mL de este cultivo fueron transferidos a 50 ml de medio LB fresco y este cultivo se creció hasta obtener una D.O._{600nm} de 0,5. Posteriormente las células fueron enfriadas durante 10 min en hielo y sedimentadas a 3.000xg por 5 min, luego de lo cual fueron suspendidas en 1 mL de CaCl₂ 20 mM. Las células fueron alicuotadas de a 100 µL en tubos de 1,5 ml y almacenadas a -80°C hasta ser utilizadas.

2.3.5.2. Transformación de *A. tumefaciens*

100 µl de células competentes de *A. tumefaciens* fueron mezcladas con 1 µg del vector binario de interés (concentración de 1 µg/µL de vector). Dicha mezcla fue congelada con nitrógeno líquido por 5 min., posteriormente se descongeló a 37° C durante 25 min. Inmediatamente se le agregó 1 mL de medio LB y se incubó por 3 h en agitación a 28° C. Finalmente las células fueron recolectadas por centrifugación durante 1 min a máxima velocidad y el sobrenadante fue descartado, dejando

aproximadamente 100 μ L de medio para resuspender las células, las cuales fueron puestas en medio LB agar suplementado con gentamicina 100 μ g/mL, rifampicina 10 μ g/mL y el antibiótico de selección dependiendo del vector utilizado, de manera de hacer la selección del *Agrobacterium* transformado. Las placas fueron incubadas durante 2 días a 28°C para obtener colonias transformantes y realizar posteriores análisis.

2.3.6. Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleada es BY4743 (*MATa α* ; *his3 Δ 1/his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0/leu2 Δ 0*; *LYS2/lys2 Δ 0*; *met15 Δ 0/MET15*; *ura3 Δ 0/ura3 Δ 0*). Para efectos del presente seminario de título, se le considerará como tipo silvestre. Esta cepa presenta auxotrofía para los aminoácidos histidina, leucina y uracilo, es decir, sus rutas de biosíntesis se encuentran interrumpidas por lo que deben suplementarse en el medio.

2.3.6.1. Preparación de células electrocompetentes de *S. cerevisiae*

Se inoculó 100 mL de medio YPD con la cepa BY4743, y se incubó a 28°C con agitación constante hasta alcanzar una D.O._{600nm} entre 1,3 y 1,5. Los 100 mL iniciales se centrifugaron en dos tubos Falcon de 50 mL a 2.500xg por 5 min a 4°C. El sedimento obtenido se lavó 2 veces con agua estéril fría centrifugando a 2.500xg por 5 min a 4°C. Luego, cada tubo se lavó con 50 mL de agua estéril fría y se centrifugó nuevamente a 2.500xg por 5 min a 4°C. El sedimento de células de cada tubo se suspendió en 4 mL de sorbitol 1 M (estéril y frío), luego se volvió a centrifugar a 2.500xg por 5 min a 4°C y finalmente se suspendieron las células de cada tubo en 100 μ L de sorbitol 1 M, almacenándolas a 4°C hasta su uso (no más de 3 días). De esta manera se obtienen dos alícuotas de células electrocompetentes.

2.3.6.2. Transformación de *S. cerevisiae* por electroporación

Se mezcló una alícuota de células electrocompetentes con 100 ng del vector de interés en 0,1 – 5 μ L de tampón TE o agua nanopura desionizada. Esta mezcla se agregó a la cubeta de electroporación de 2 mm de paso y se incubó por 4 minutos en hielo. La electroporación se llevó a cabo en el equipo Gene Pulser Xcell Electroporation System (BIORAD®), en donde se dio un pulso de 1,5 kV, 25 μ F y 200 Ω , y por un tiempo de 4,5 – 5 m. Con el objeto de permitir la recuperación de las células se agregó 1 mL de medio YPD, traspasándose el contenido de la cubeta a un tubo de 1,5 mL, incubándose por 1 h con agitación a 28°C. Después de esto, el tubo se centrifugó a 1.000 g por 4 min y las células se lavaron con medio YMM. Se tomaron 100 μ L y se sembraron en una placa con YMM. Los 900 μ L restantes se sedimentaron y se resuspendieron en un volumen mínimo para ser también sembrados. Luego se analizó las colonias transformantes, correspondientes a una célula que adquirió, por el vector, la propiedad de vivir en un medio auxotrófico. La auxotrófia, en conjunto con un plasmidio que recupere su prototrofia y un medio mínimo adecuado, permite seleccionar las levaduras de interés.

2.3.6.3. Extracción de ARN de levaduras y síntesis de ADNc

Para la extracción de ARN de levaduras se empleó 10 mL de cultivo crecidos por 2 días. Se centrifugó a 3.000xg por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se congelaron los tubos en N₂ líquido. Se agregó 1 mL de Tri Reagent y luego 100 μ L de perlas de vidrio de 0,5 mm. Se utilizó vortex a temperatura ambiente con cada tubo, procurando realizar esto de a uno ya que el trizol se filtra. Luego del vortex se incubó cada muestra por 8 min a temperatura ambiente, tras lo cual se agregó 200 μ L de cloroformo, agitándose suavemente y centrifugando a 12.000xg por 10 min a 4°C. Se

transfirió cada fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 1 volumen de fenol ácido:cloroformo 1:1, se mezcló y se centrifugó a 12.000xg por 10 min a 4°C, tras lo cual se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo limpio. En aquellos casos en donde se obtuvo una interfase opaca blanca entre el fenol y la fase acuosa se volvió a realizar la separación con fenol ácido: cloroformo hasta obtener una interfase limpia. Posteriormente, a la fase acuosa se le agregó 1,5 volúmenes de isopropanol frío, se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 12.000xg por 10 min a 4°C, descartándose el sobrenadante. Se resuspendió en 50 µL de H₂O libre de nucleasas, se agregó 500 µL de EtOH 75% y se centrifugó a 8.000xg por 5 min a 4°C. Descartándose el sobrenadante, se secó el tubo con el fin de eliminar las trazas de EtOH y se resuspendió en 50 µL de H₂O libre de nucleasas, guardándose las muestras a -80°C. Por último, se realizaron los análisis correspondientes de calidad e integridad de ARN y síntesis de ADNc de manera similar a lo descrito en la sección 2.3.3.2.

2.3.6.4. Extracción de proteínas desde levaduras y análisis de Western Blot

Para realizar la extracción de proteínas se sedimentaron 10mL de cultivo saturado de levaduras (D.O.₆₀₀ =2,5), se descartó el sobrenadante y se suspendieron en 100 µL de agua destilada. Se agregó 200 µL de NaOH 0,1M. Se incubó por 5 minutos y se sedimentaron a 5.000xg por 3 min. El sedimento obtenido fue suspendido en 100 µL de tampón Laemmli (4% SDS, 20% Glicerol, 10% 2-β-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125M Tris-HCl) mediante vortex por 30 s. Luego, la muestra se incubó por 10 min a 80°C. Se centrifugó a 17.530xg y se guardó a -80°C hasta su utilización.

La electroforesis de las proteínas de levaduras se realizó mediante SDS-PAGE. Esto y la posterior transferencia de proteínas a una membrana fueron realizados en

condiciones estándar. El gel separador contenía de 12 a 14% de acrilamida. Se utilizó Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific®) como marcador de peso molecular. Para la transferencia se ocupó una membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos utilizados corresponden a anti-GFP —preparado en ratón— y anti-ratón IgG-peroxidasa. La detección de la señal del Western-Blot se realizó utilizando SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific®) para visualizar la actividad peroxidasa. Se utilizó una película fotográfica (Kodak) con el fin de revelar las bandas correspondientes.

2.4. Vectores utilizados

Los vectores usados poseen la tecnología Gateway® y se listan en la Tabla VII.

Tabla VII. Resumen de los vectores empleados en el presente seminario de título.

Nombre vector	Marcador de selección	Descripción
<i>Vector de clonación</i>		
pCR8	Espectinomicina 50 µg/mL (en bacteria)	Vector de ligación y clonamiento.
pCR8-ITRG7	Espectinomicina 50 µg/mL (en bacteria)	Vector de clonamiento con el inserto de cDNA de ITRG7.
<i>Vectores de expresión en levaduras</i>		
pAG426GPD-ccdB-EGFP	Sensibilidad a ccdB (en bacteria), URA+ (en levadura)	Vector de expresión constitutiva de GFP en levadura.
pAG426GPD-ITRG7-EGFP	Ampicilina 200 µg/mL (en bacteria), URA+ (en levadura)	Vector de expresión constitutiva de la fusión ITRG7-GFP en levadura.
pAG426GPD-ccdB-HA	Sensibilidad a ccdB (en bacteria), URA+ (en levadura)	Vector de expresión constitutiva de HA en levadura.
pAG426GPD-ITRG7-HA	Ampicilina 200 µg/mL (en bacteria), URA+ (en levadura)	Vector de expresión constitutiva de la fusión ITRG7-HA en levadura.
<i>Vectores de expresión en plantas</i>		
pGWB5-ccdB-GFP	Sensibilidad a ccdB y kanamicina 200 µg/mL (en bacteria)	Vector de expresión constitutiva de GFP en plantas.
pGWB5-ITRG7-GFP	Kanamicina 200 µg/mL (en bacteria)	Vector de expresión constitutiva de la fusión ITRG7-GFP en plantas.
pMDC85-ccdB-GFP	Sensibilidad a ccdB (en bacteria) y kanamicina 200 µg/mL (en bacteria)	Vector de expresión constitutiva de GFP en plantas. Presenta doble promotor 35s.

Nombre vector	Marcador de selección	Descripción
pMDC85- <i>ITRG7</i> -GFP	Kanamicina 200 µg/mL (en bacteria)	Vector de expresión constitutiva de la fusión <i>ITRG7</i> -GFP en plantas. Presenta doble promotor 35s.
pGWB8- <i>ccdB</i> -His	Sensibilidad a <i>ccdB</i> (en bacteria) y kanamicina 200 µg/mL (en bacteria)	Vector de expresión constitutiva de epítipo de 6 histidinas en plantas.
pGWB8- <i>ITRG7</i> -His	Kanamicina 200 µg/mL (en bacteria)	Vector de expresión constitutiva de la fusión <i>ITRG7</i> -6xHis (epítipo de 6 histidinas) en plantas.

El clonamiento del ADNc de *ITRG7* en cada uno de los vectores se llevó a cabo mediante recombinación homóloga con el kit Gateway LR Clonase (Invitrogen®) y siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante (número de catálogo 11791-020).

2.5. Extracción de ADN plasmidial

Con el fin de comprobar las transformaciones realizadas en las distintas bacterias, se procedió a la extracción del material plasmidial para poder utilizarlo en reacciones de PCR. Para ello, desde un cultivo de al menos 16 h de *E. coli* o 48 h de *A. tumefaciens*, transformadas con el vector de interés, se toman 1,5 mL y se sedimentan por centrifugación a 17.530xg por 10 s. El sobrenadante fue descartado dejando un volumen mínimo para resuspender las células (50 µL). Las células se resuspendieron totalmente e inmediatamente después se agregó 300 µL de solución amortiguadora TENS (TRIS pH 7,5 10 mM, EDTA pH 8,0 1 mM, NaOH 0,1 M y SDS 0,5%) y se mezcló en vortex por 2 s. Luego, se agregó 150 µL de acetato de potasio (KAc) pH 4,7 3 M y se mezcló en vortex por 2 s. La suspensión fue centrifugada por 2 min a 17.530xg para sedimentar el ADN cromosómico y los residuos celulares. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se le agregó 900 µL de EtOH 100% a temperatura ambiente, inmediatamente el ADN fue sedimentado a máxima velocidad por 2 min. El sobrenadante fue descartado y el sedimento se lavó 2 veces con 1 mL de

EtOH 80% preenfriado a -20°C . Finalmente, el ADN se dejó secar y se resuspendió en 20 μL de agua libre de nucleasas con RNAsas 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.6. Partidores, reacciones de PCR y visualización de los amplificados

Los partidores se diseñaron de acuerdo a los criterios mostrados en la Tabla VIII, según su función en PCR convencional o PCR cuantitativo. Los partidores empleados en el presente seminario de título se encuentran listados en la Tabla IX.

Tabla VIII. Criterios utilizados en el programa Oligo Analyzer para el diseño de partidores según su uso en PCR convencional o PCR cuantitativo.

	PCR convencional	qPCR
Concentración Oligo	0,2 μM	0,1 μM
Concentración Na^+	0	0
Concentración Mg^{++}	2 mM	2 mM
Concentración dNTP's	0,2 mM	0,2 mM
T_m	Entre 52° a 58°	Entre 60° a 63° , ideal 61°
Diferencia T_m entre partidores Forward y Reverse	No más de 5°	No más de 1°
Comentarios generales	---	Considerar partidor reverse en el extremo 3'UTR del mensajero. La longitud de los partidores puede ser hasta de 14 pb mínimo.
$\Delta G > -6$ Kcal/mol en homodimero y heterodimero		

Tabla IX. Partidores empleados en el seminario de título.

Partidor	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	Secuencia del partidor (5' - 3')	Descripción
Oligo dT	70	CGCCACGCGTCGACTAGTA- CTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Partidor que permite sintetizar cDNA a partir de mRNA
<i>ITRG7-F</i>	52	ATGGGGAAAGGAGTAGTATCA	Partidores que permiten amplificar el ORF de <i>ITRG7</i> , con un tamaño de 1080 pb (en cDNA)
<i>ITRG7-R</i>	52	CACTTCAGATTCAGAATTACT	
q- <i>ITRG7F</i>	61,7	CAACAAGATCCAGAGTCACTGA	Partidores que permiten amplificar 177 pb del extremo 3' UTR de <i>ITRG7</i> . Utilizados en reacciones de qPCR
q- <i>ITRG7R</i>	60,1	AATTGTATGAGAGACCCACTTG	
q- <i>ACT2-F</i>	57	GCTTCTCCATTTGTTTGTTCAT	Partidores que amplifican 105pb del gen de actina 2. Utilizado como gen de referencia en qPCR
q- <i>ACT2-R</i>	57	GGAATAAAGAGGCATCAATTCGA	
q- <i>UBQ10-F</i>	57	ACCAGCAGCGTCTCATCTT	Partidores que amplifican 127pb del gen de ubiquitina 10. Utilizado como referencia en experimentos de qPCR
q- <i>UBQ10-R</i>	57	GCATAACAGAGACGAGATTTAGAA	

Partidor	Tm (°C)	Secuencia del partidor (5' - 3')	Descripción
q-PP2A-F	57	GATACTTTGTCGTGTGTTGTCTT	Partidores que amplifican 111pb del gen de proteína fosfatasa 2. Utilizado como gen de referencia en experimentos de qPCR.
q-PP2A-R	57	CAAATACGCCCAACGAACAA	
<i>clc1-f</i>	60	ATGTCAGAGAAATTCCCTCCTTTGGA	Partidores que amplifican 702pb del gen de la cadena liviana de clatrina de levadura.
<i>clc1-r</i>	60	AGCACCGGGAGCCTTCGCGT	

Las diferentes reacciones de PCR se hicieron siguiendo el protocolo mostrado en las Tablas III y IV del numeral 2.3.3.1, variando la temperatura de hibridación según los partidores utilizados. En el caso de levaduras, se hicieron PCR de colonia, para lo cual se tomó mediante una punta de pipeta una pequeña fracción de la colonia a analizar y se diluyó en 10 μ L de H₂O. Se tomó 1 μ L de esta solución como templado para la reacción de PCR.

La visualización de los productos de los diferentes PCR del presente seminario de título se realizó mediante geles de agarosa, grado analítico, al 1,5% p/v en TAE 1X (Tris-base 40 mM pH 8,0, ácido acético glacial 19 mM y EDTA pH 8,0 1 mM). Se cargó por pocillo 12 μ L de cada muestra de PCR mezclada previamente con 3 μ L de solución de carga (glicerol 30% p/v, azul de bromofenol 0,25% p/v, xilenecianol 0,25% p/v). La electroforesis se llevo a cabo a 100 V por 45 min. En seguida, el gel se incubó en bromuro de etidio (2 mg/L) por 15 min y se observó en transiluminador SYNGENE modelo SYDR/2082. En todos los geles se empleó 10 μ L de marcador de peso molecular Gene Ruler (Fermentas®) 1kb Plus, 1kb, 100bp Plus ó 100bp (50 ng/ μ L c/u), elegidos para cada ocasión de acuerdo a los pesos esperados de las bandas de interés.

2.7. Cuantificación de los niveles de transcrito mediante PCR cuantitativo

Las reacciones de PCR cuantitativo (qPCR) se llevaron a cabo utilizando el equipo Mx3000P (Stratagene®) y el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies®) siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. Para cada ronda de reacciones se consideraron controles negativos de amplificación de ARN que no fue sometido a transcripción reversa y, además, controles negativos de reacción para cada par de partidores (sin templado de ADNc). Como genes de referencia se emplearon los genes de Actina 2 (ACT2), Ubiquitina 10 (UBQ10) y Proteína Fosfatasa 2 (PP2A). Para todas las reacciones se consideró 20,3 μ L de volumen final y se utilizaron los siguientes componentes: 5 μ L mix partidores 400 nM c/u (concentración final 100 nM), 10 μ L Solución Brilliant III 2x, 1 μ L templado ADNc a 50 ng/ μ L, 0,3 μ L ROX 2 μ M (concentración final 30 nM) y 4 μ L H₂O libre de nucleasas. En la Tabla X se muestra el programa utilizado.

Tabla X. Programa de qPCR utilizado en los diferentes experimentos de medición de los niveles de transcrito de *ITRG7*.

Fase	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	1	95	30 s	1
	2	60	20 s	
2	1	95	10 s	40
	2	60	20 s	
	3	95	1 min	
3	1	95	1 min	1
	2	60	30 s	
	3	95	30 s	

Los análisis de los resultados obtenidos de los PCR cuantitativos se hicieron mediante los programas MxPro v4.10 (Stratagene®), LinRegPCR v2012.0 (Ruijter, 2009; Tuomi, 2010) y NormFinder v20 (Andersen, 2004).

2.8. Análisis del fenotipo en estrés iónico de las plantas de *A. thaliana*

Los fenotipos a evaluar fueron la tasa de crecimiento y germinación, largo de raíz principal y biomasa, comparando los resultados obtenidos de plantas mutantes *itrg7-1* y plantas tipo silvestre en los diferentes medios conteniendo diferentes iones (ver Tabla II, numeral 2.2.4). Para el fenotipo de crecimiento y germinación se evaluó la presencia de radícula a los 7 días post-sembrado. El largo de raíz se midió utilizando fotografías y el programa tpsDig (<http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>). La cantidad de masa fresca de las plantas se midió con ayuda de una balanza analítica de 0,1 mg de precisión.

2.9. Análisis del fenotipo en estrés iónico de *Saccharomyces cerevisiae*

Se evaluó el crecimiento de levaduras transformadas con *ITRG7* en condiciones de estrés iónico, comparándolas con el control respectivo. Para ello, se crecieron cultivos líquidos de las distintas cepas de levaduras hasta alcanzar una $OD_{600} = 4$, luego se prepararon alícuotas diluidas de este cultivo (1/10, 1/100, 1/1000) y se sembró por duplicado las diferentes cepas. Las placas se incubaron a 28°C por 1 semana. La cantidad de días es variable, ya que una misma cepa presenta tasas de crecimiento diferentes frente a los distintos metales y sus concentraciones.

2.10. Microscopía de epifluorescencia de levaduras transformadas

Las levaduras transformantes con el vector de expresión pAG426GPD-ccdB-EGFP o el vector pAG426GPD-*ITRG7*-EGFP fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia IX-70, Olympus®. Se utilizó tinción DAPI para observar el núcleo. Para ello, cultivos de $OD_{600} = 0,5$ fueron incubados con 2,5 µg/mL de DAPI (concentración stock a 1 mg/mL) y visualizadas empleando el filtro óptico respectivo para obtener imágenes en el microscopio de epifluorescencia.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis informático de *ITRG7*

A la fecha, se carece de trabajos publicados con alusión directa a *ITRG7*. Considerando resultados de análisis de coexpresión obtenidos con anterioridad en el laboratorio (Dr. Alexander Vergara, manuscrito en preparación), en donde se encontró que *ITRG7* se coexpresa con proteínas involucradas en el transporte de iones, es que se decidió, a manera de recabar antecedentes, realizar una búsqueda de información de *ITRG7* con herramientas bioinformáticas. Estas diversas herramientas permiten predecir, analizar y recopilar información respecto de la estructura primaria y secundaria de la proteína, la posible localización subcelular de la misma y de los patrones de expresión del gen que la codifica.

Para analizar la presencia de dominios en la proteína se utilizó la herramienta InterProScan, cuyos resultados se observan en la Figura 2. Este primer análisis muestra que *ITRG7* corresponde a una proteína de membrana que posee diez dominios transmembrana, un péptido señal que la dirige al retículo endoplásmico y cuatro dominios asociados a la función de transporte: metabolitos/drogas y resistencia multidroga/transporte de eflujo.

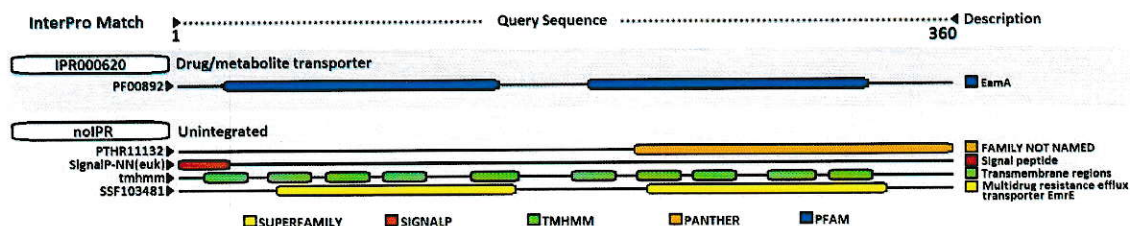


Figura 2. Análisis de *ITRG7* con InterProScan. Se identifican dos dominios asociados con transporte de metabolitos y drogas (barras azules), un dominio que no ha sido clasificado aún (barra naranja), un péptido señal a retículo endoplásmico (barra roja), diez dominios transmembrana (barras verdes) y dos dominios asociados a resistencia multidroga y transporte de eflujo (barras amarillas).

3.1.1. ITRG7 es una proteína transmembrana con péptido señal

Los análisis con los programas Phobius (Kall y col., 2004), TmHMM (Krogh y col., 2001) y Sosui (Hirokawa y col., 1998), que predicen putativos dominios transmembrana, arrojaron que ITRG7 presenta diez dominios transmembrana (Tabla XI). Este resultado nos indica que es de esperar *in-vivo* una distribución subcelular en al menos una de las membranas que se encuentran en la célula. Como control de la capacidad de predicción de estos programas se realizó el mismo análisis con el transportador IRT1, cuya primera caracterización funcional se realizó en levaduras (Eide y col., 1996). IRT1 es una proteína de alta importancia en el transporte de hierro en raíces de *A. thaliana*, que se localiza y ancla en la membrana plasmática dados sus ocho dominios transmembrana (Vert y col., 2002). Al utilizar la secuencia de IRT1, arroja la cantidad esperable de ocho dominios transmembrana (Tabla XI), con lo que la capacidad predictiva de los programas es reforzada.

Tabla XI. Resultados arrojados por los programas de predicción de dominios transmembrana. Los números indican la cantidad de dominios transmembrana que predicen en las proteínas analizadas.

Programa	ITRG7	IRT1
Phobius	10	8
TmHMM	10	8
Sosui	10	8

De los programas de predicción de péptido señal SignalP (Bendtsen y col., 2004), PrediSi (Hiller y col., 2004) y SosuiSignal (Gomi y col., 2004) se desprende que IRT1 presenta péptido señal, lo que es congruente con la destinación a membrana plasmática que presenta esta proteína (Vert y col., 2002). En el caso de ITRG7, dos de los tres programas utilizados dieron positivos para la presencia de péptido señal.

3.1.2. ITRG7 se destina a la ruta secretoria

Los resultados obtenidos con los programas de predicción de localización subcelular TargetP (Emanuelsson y col., 2000), Predotar (Small y col., 2004) e IPSORT (Bannai y col., 2002) arrojan que ITRG7 se destina a la vía secretoria y descartan su destinación a organelos como mitocondrias o cloroplastos. Lo mismo se obtiene para la proteína IRT1, demostrando que las predicciones son congruentes con lo obtenido experimentalmente (Vert y col., 2002) (ver Tabla XII). Por otro lado, en las diversas herramientas integrativas de bases de datos consultadas, se reporta a ITRG7 como una proteína de función desconocida a la que se le han asignado tres términos GO (Gene Ontology), correspondientes a: GO0003674 (función molecular desconocida), GO0016020 (componente de membrana) y GO0012505 (componente de sistema de endomembrana). Se predice la presencia de un sitio de fosforilación por proteína kinasa C (PKC) (Ser7), tres sitios de fosforilación por caseína kinasa II (CKII) (Ser245, Ser335 y Ser354) y seis sitios de miristoilación (Gly85, Gly96, Gly141, Gly174, Gly256 y Gly305). Todos estos sitios podrían constituir una vía de regulación postraduccional de la actividad de ITRG7. En la Figura 3 se aprecia la topología de ITRG7, señalándose los sitios de posibles modificaciones postraduccionales y el péptido señal. Esta imagen se construyó utilizando como base lo obtenido con los programas TOPPRED (von Heijne, 1992) y RBDE (Skrabanek y col., 2003).

Tabla XII. Resultados de la predicción de localización subcelular para ITRG7 e IRT1, ambas destinadas a la vía secretoria.

Programa	ITRG7	IRT1
TargetP 1.1	Vía secretoria	Vía secretoria
Predotar	Posiblemente ER	ER
IPSORT	No mitocondria, no cloroplasto	No mitocondria, no cloroplasto

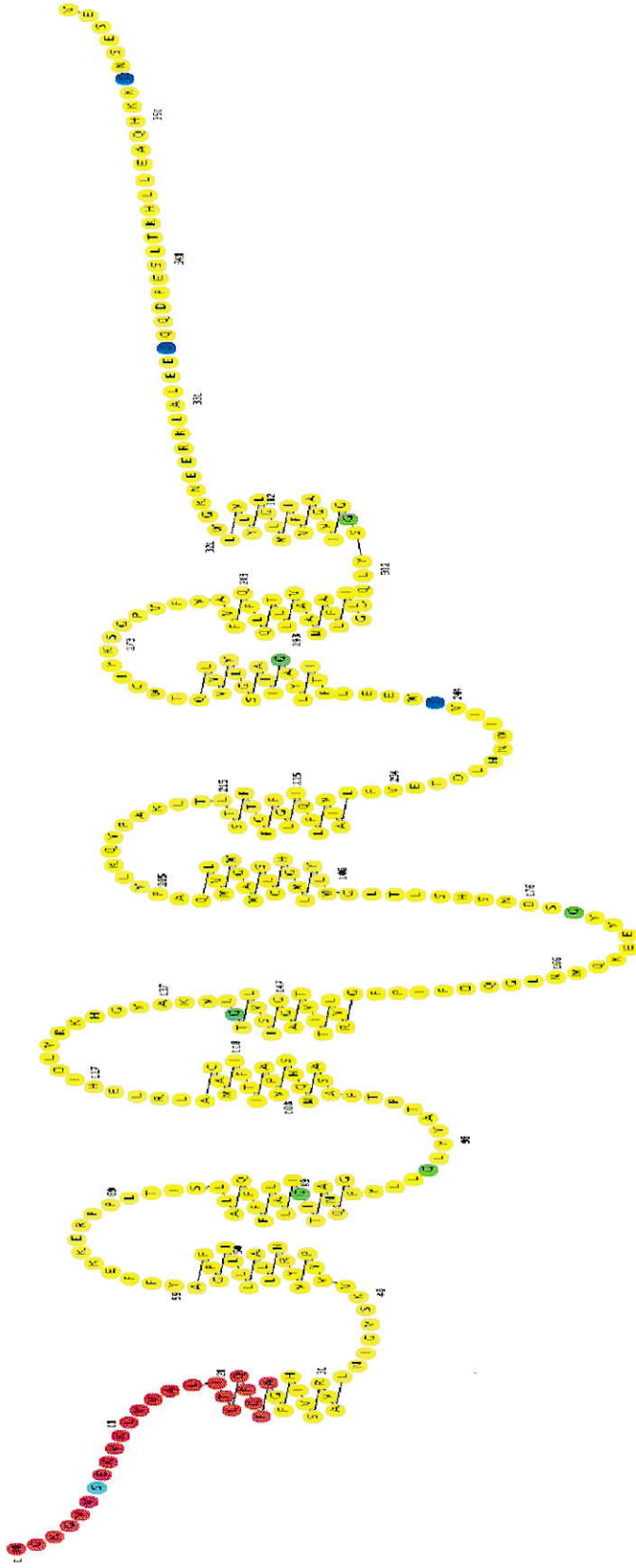


Figura 3. Topología de ITRG7. El color rojo muestra la secuencia de péptido señal, el color cian muestra el sitio de fosforilación por PKC, en colores verdes se muestran los sitios de miristilación, el color azul indica los sitios de fosforilación por CKII y en amarillo se muestran el resto de residuos de aminoácidos que conforman la proteína ITRG7.

3.1.3. *ITRG7* se expresa preferentemente en semilla y en raíz de *Arabidopsis*

Los patrones de expresión de *ITRG7* observados con la herramienta eFP Browser (Winter y col., 2007), al comparar su expresión con la de genes de expresión constitutiva como Actina 2 (Figura 4), Ubiquitina 10 (Figura suplementaria 1) o proteína fosfatasa 2A (Figura suplementaria 2), dan cuenta de que *ITRG7* presenta una expresión preferente durante el desarrollo de la semilla y, posteriormente, en la raíz de la planta. No se observan diferencias significativas entre la expresión de *ITRG7* y los genes de expresión constitutiva en los demás estadios y estructuras de la planta (ver Figuras suplementarias 3, 4 y 5).

3.1.4. La expresión de *ITRG7* cambia ante estrés salino y osmótico

eFP Browser (Winter y cols, 2007) arroja que el patrón de expresión de *ITRG7* cambia cuando se someten plántulas de 18 días de *A. thaliana* a estrés salino (150mM de NaCl) y osmótico (300mM de Manitol), según da cuenta la Figura 5. Estos cambios de niveles de transcrito muestran un comportamiento dual de la expresión de *ITRG7*, dependiendo de la estructura de la planta que se analice, ya que se tiene una represión de la expresión en raíces (color azul) y una inducción de la expresión en la roseta (color rojo). En ambos tratamientos de estrés abiótico los cambios de expresión ocurren dentro de órdenes de magnitud similares. También es posible observar un aumento de la expresión de *ITRG7* en ambos tipos de estructuras vegetales ante un estrés por calor. No se observan cambios de expresión luego de tratamientos de sequía (ver Figura 5), genotóxicos, oxidativos, de heridas o por exposición a rayos UV-b (ver Figuras suplementarias 6, 7 y 8).

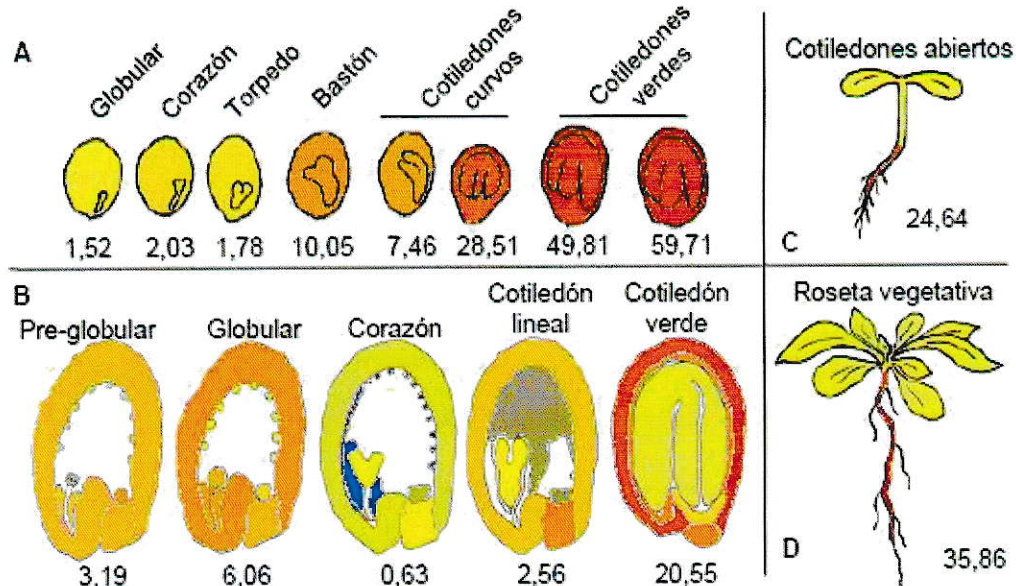


Figura 4. Patrones de expresión de *ITRG7* según interfaz eFP Browser. Los colores rojos o azules indican aumento o disminución en la expresión, respectivamente, al comparar la expresión de *ITRG7* con el gen de referencia Actina 2. Los números indican las veces de cambio en el nivel de transcrito de *ITRG7* respecto a los niveles de transcritos del gen de referencia. A: expresión de *ITRG7* durante el desarrollo de la semilla con datos de microarreglos del año 2005. B: expresión de *ITRG7* durante el desarrollo de la semilla con datos de microarreglos del año 2010, con detalle de las estructuras internas de la semilla, lo que permite visualizar que *ITRG7* presenta un aumento de su expresión en la cubierta. C y D: expresión aumentada de *ITRG7* en la raíz, tanto en el estadio de cotiledones abiertos como en aquél que presenta la estructura de roseta. Imagen adaptada de los análisis realizados en la plataforma eFP Browser.

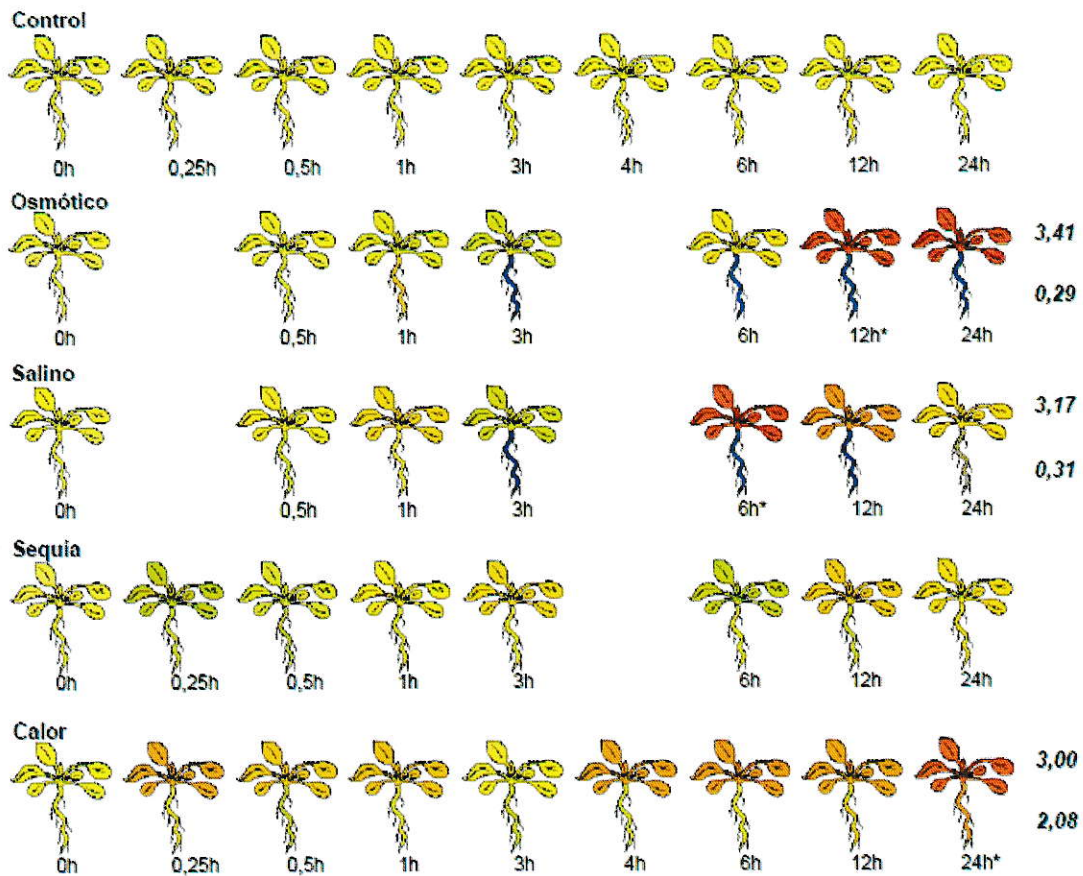


Figura 5. Cambios en la expresión de *ITRG7* luego de diversos tratamientos. Destacables son los cambios bajo tratamientos de estrés salino (150mM NaCl) y osmótico (300mM Manitol), en donde se observa disminución de la expresión en raíces (color azul) e inducción de la expresión en la parte aérea de la planta (color rojo). Lo números a la derecha indican las veces de cambio en los niveles de transcrito detectados, y corresponden al tiempo del tratamiento indicado con asterisco. Se utilizó como gen de referencia Actina 2. Imagen adaptada de los análisis realizados en la plataforma eFP Browser.

3.2. Evaluación de los niveles de transcrito de *ITRG7* en plantas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre

En vista de que los antecedentes recopilados sobre *ITRG7* corresponden a inferencias electrónicas y que no existen publicaciones asociadas a la función de este gen, es que surge la necesidad de investigar empíricamente la posible participación de *ITRG7* en la respuesta a estrés iónico.

Como un primer ensayo se planteó la medición relativa de los niveles de transcrito de *ITRG7* en plantas de *A. thaliana* tipo silvestre sometidas a tratamientos de cultivo en presencia de diferentes iones. El estudio de los niveles de transcrito de *ITRG7* nos brindará un primer acercamiento en cuanto a si existe o no una regulación del gen, pregunta que surge ya que ante este escenario de estrés iónico el organismo debe reorganizar procesos celulares y moleculares con el fin de adaptarse. De ser *ITRG7* un gen involucrado en estrés iónico, es esperable que la actividad de la proteína que codifica, la traducción del ARNm o la transcripción de su ADN se vean alterados en presencia de niveles no usuales de iones, siendo este último punto al que se apunta con este experimento.

3.2.1. Los niveles de transcrito de *ITRG7* disminuyen en presencia de iones

Con la finalidad de evaluar si existe un efecto de metales o sal a nivel de cantidad de transcrito de *ITRG7*, plantas tipo silvestres de 14 días fueron traspasadas por 10 días (protocolo estándar del laboratorio para la evaluación de genes *ITRG*) a medios adicionados con 20µM de CdCl₂, 200µM de CdCl₂, 15 µM de CuSO₄, 100µM CuSO₄, 100mM NaCl, 150mM NaCl y 250mM de NaCl, tras lo cual se realizó extracción de ARN de planta completa y fueron analizadas para evaluar los niveles de transcrito de *ITRG7* mediante el uso de RT-qPCR. Para este experimento se empleó el análisis estadístico de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una prueba

posterior de Tukey, ya que poseemos un factor (plantas de *A. thaliana* tipo silvestre) sometido a varias condiciones (concentraciones de iones) y con solo una variable respuesta (niveles de transcrito de *ITRG7*). Los resultados completos del análisis estadístico se muestran en la Tabla Anexo II.

Los resultados arrojan que en tratamientos con 20 μ M de CdCl₂ (Figura 6, segunda barra) las plantas no mostraron cambios de la expresión relativa de *ITRG7* pero sí lo hicieron a una concentración de 200 μ M (Figura 6, tercera barra), donde presentan una disminución en cincuenta veces de la expresión relativa de *ITRG7* en comparación al control (representado en la primera barra de la Figura 6). De manera similar, bajo tratamientos de 15 y 100 μ M con sulfato de cobre (Figura 6, barras cuarta y tercera, respectivamente), se revela una disminución de los niveles de transcrito en ambas condiciones, disminuyendo en aproximadamente cuatro veces la cantidad relativa de transcrito de *ITRG7* en comparación con el control. Igual comportamiento se observa en los tratamientos con cloruro de sodio (Figura 6, barras sexta, séptima y octava), en donde en 150mM se redujeron los transcritos en un 40% y en 250mM se obtuvo una disminución estadísticamente significativa en 50 veces comparado con la situación control. En la Figura Suplementaria 9 es posible observar imágenes representativas de los fenotipos de las plantas luego de los tratamientos realizados.

De los resultados obtenidos se desprende que existe un transcrito proveniente del gen *ITRG7* y que las correlaciones estadísticamente significativas obtenidas demuestran que ante la presencia de cadmio, cobre o sal los niveles del transcrito de *ITRG7* son menores a lo observado en una condición control, sin la adición de metales o sal. Los resultados con NaCl de este análisis —si bien experimentalmente no son comparables— van parcialmente en línea con lo observado luego del tratamiento salino

de la Figura 5, en donde a partir de las 3h ocurre una disminución de los niveles de transcrito de *ITRG7* en raíz.

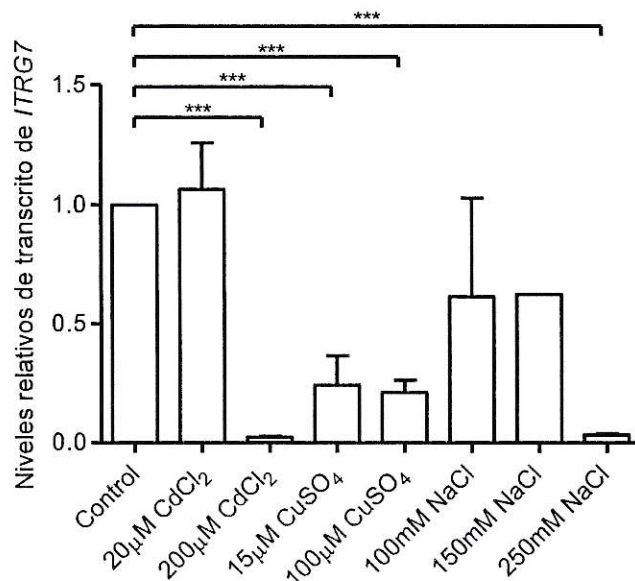


Figura 6. Niveles relativos de transcrito de *ITRG7* en plantas tipo silvestre tratadas con distintos iones. Las barras representan el promedio e incluyen la desviación estándar de dos experimentos independientes de cuatro plantas completas c/u (excepto a 150mM de NaCl, en donde se realizó un experimento). Cada ensayo de RT-qPCR consistió en tres réplicas técnicas por gen. Se empleó ANOVA de una vía con una prueba posterior de Tukey y se muestran las diferencias significativas obtenidas con $p < 0,001$ en relación al control (sin exposición a iones).

3.3. Caracterización molecular de la mutante insercional *itrg7-1*

Como una manera de investigar la función biológica de *ITRG7* se planteó la utilización de genética reversa en *Arabidopsis thaliana*. Esta estrategia, basada en la alteración de un gen de interés mediante algún tipo de mutación, nos permitirá evaluar y atribuir posibles cambios fenotípicos a la modificación del gen de *ITRG7*. Para utilizar genética reversa se recurrió a la colección de mutantes Salk, la que consiste en una colección de mutantes de *Arabidopsis thaliana* obtenidas mediante la inserción en el genoma de un fragmento de T-DNA de aproximadamente 9kb, con el fin de generar mutantes con pérdida de función (Alonso y cols, 2003). Empleando este recurso se encontró y solicitó aquella mutante disponible que presenta esta inserción en el gen de

ITRG7, la cual fue denominada *itrg7-1*, de acuerdo a las pautas de nomenclatura sugeridas para estudios de biología vegetal (Meinke y cols, 1997).

La mutante *itrg7-1* presenta la inserción de T-DNA en la zona del promotor de *ITRG7* (ver Figura 1, sección 2.3.3.1 de Materiales y Métodos), lo que podría afectar la expresión del gen, pero no constituye una modificación de la estructura primaria de la proteína. Considerando esto, surge la pregunta: ¿ocasionaran estos posibles cambios de expresión de *ITRG7* un fenotipo diferente en estrés iónico por parte de plantas *itrg7-1*, comparándolas con su contraparte tipo silvestre?

3.3.1. *itrg7-1* es una mutante insercional homocigota

Para comenzar a trabajar con *itrg7-1* es necesario comprobar el estado de homocigosis de la inserción, con el fin de evitar que exista un alelo funcional que pudiese suplir la carencia o atenuar los efectos que ocasiona el alelo deletéreo. Esta comprobación se llevó a cabo mediante la amplificación de segmentos de ADN que debiesen estar presente en plantas de la línea *itrg7-1* o en plantas de línea silvestre (Wt) ó compartidos por ambas líneas. Para ello, se extrajo ADNg de las líneas y se seleccionó la amplificación de segmentos de Actina, del gen neomicin fosfotransferasa (gen *nptII*)— que está presente en el casete de la inserción de T-DNA y le confiere a las plantas transformantes resistencia a kanamicina—, del promotor de *ITRG7* y una combinación de partidores que debiese amplificar un segmento que comprende parte de la inserción de T-DNA y parte del promotor de *ITRG7*. Los detalles de los partidores se encuentran en la Tabla III (numeral 2.3.3.1 de Materiales y Métodos). Los resultados de este análisis, que consideró la extracción de ADNg de dos plantas Wt y dos plantas *itrg7-1*, se muestran en la Figura 7. De este análisis se desprende que:

- 1) Se obtuvo ADNg de buena calidad de ambas líneas, ya que la amplificación de actina muestra una banda en el carril de cada planta y del tamaño que corresponde (836pb).
- 2) El gen de selección de las plantas transformantes en base a la resistencia a kanamicina, *nptII*, amplificó sólo en plantas mutantes (banda de 655pb), lo que se corresponde con la presencia de este gen en la inserción de T-DNA y la ausencia en plantas tipo silvestre.
- 3) Se obtuvo la amplificación de un segmento del promotor de *ITRG7* (*pITRG7*, 504pb) en plantas tipo silvestre y no en plantas *itrg7-1*, lo cual es esperable ya que los partidores usados flanquean la zona donde se encuentra la inserción, y ésta, al ser de 9kb, presenta un tamaño que no puede ser amplificado por la ADN polimerasa empleada. De paso, es el indicio de que *itrg7-1* no es una línea heterocigota, ya que se hubiese obtenido esta banda a partir de un alelo silvestre.
- 4) La combinación de partidores LbB1.3 y *pITRG7-R* resultó en la amplificación de un segmento de 390pb aproximadamente, y sólo se obtuvo en las plantas *itrg7-1*, lo que es esperable al ser LbB1.3 un partidor que hibrida sólo en la inserción de T-DNA, la cual no está presente en plantas tipo silvestre.

De éstos análisis se concluye que la línea *itrg7-1* es una línea mutante, que contiene una inserción de T-DNA en el promotor de *ITRG7* en condición homocigota. De la misma manera, se concluye que la línea tipo silvestre no presenta una inserción de T-DNA, lo que descarta la presencia de vectores que posean este gen de selección y signifiquen una alteración dentro de la línea tipo silvestre.

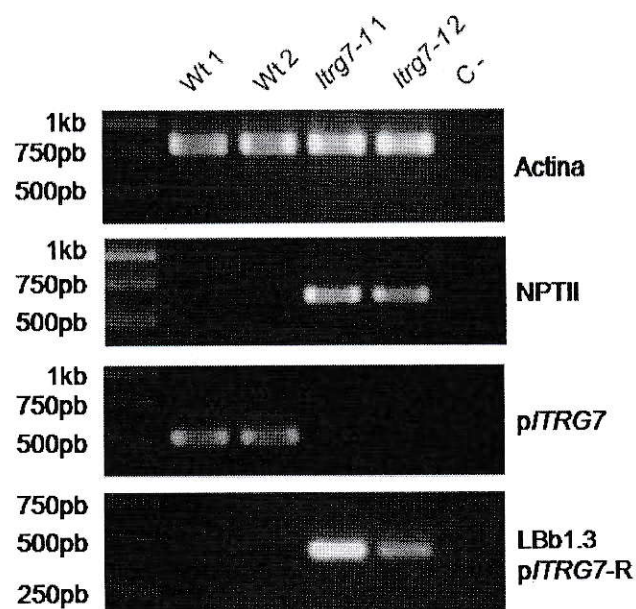


Figura 7. Genotipificación de *itrg7-1*. Se muestran las bandas obtenidas luego de la amplificación de los genes de actina, nptII, zona del promotor de ITRG7 (*pITRG7*) y una zona que abarca parte de la inserción de TDNA y parte del promotor (*LBb1.3- pITRG7-R*). Para este análisis se extrajo ADNg de 2 plantas tipo silvestres (*Wt 1* y *Wt 2*) y 2 plantas *itrg7-1* (*itrg7-1 1* e *itrg7-1 2*). El control negativo (*C-*) consistió en amplificación sin adicionar templado.

3.3.2. Línea mutante presenta menos niveles de transcrito de *ITRG7*

Dado que la inserción en *itrg7-1* se encuentra en la zona del promotor del gen, es necesario evaluar los niveles de transcrito de *ITRG7*. Antes de proceder con este análisis, se realizaron los ensayos correspondientes para la evaluación de los partidores diseñados tanto para la síntesis de ADNc como para los experimentos de PCR cuantitativo (qPCR), obteniendo en todos ellos resultados satisfactorios e idóneos (análisis no mostrados) para proseguir con su utilización. Luego, se realizó PCR semi cuantitativo y cuantitativo con tejido vegetal proveniente de plantas *itrg7-1* y plantas tipo silvestre. Se evaluó los niveles de transcrito en tejido foliar (PCR semicuantitativo) y tejido de planta completa (RT-qPCR). En ambos se evaluó plantas de 21 días. Los resultados obtenidos se encuentran en las Figuras 8 y 9, respectivamente.

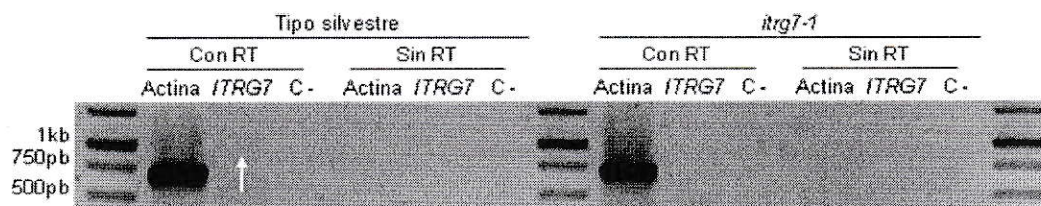


Figura 8. Análisis de presencia de transcrito de *ITRG7* en hoja. Se realizó un análisis mediante PCR semicuantitativo a partir de hojas de plantas de 21 días. Como control positivo se empleó la amplificación de ADNc de actina y se utilizaron 2 tipos de controles negativos: templado sin tratamiento de transcriptasa reversa (sin RT) y reacciones sin templado (C-).

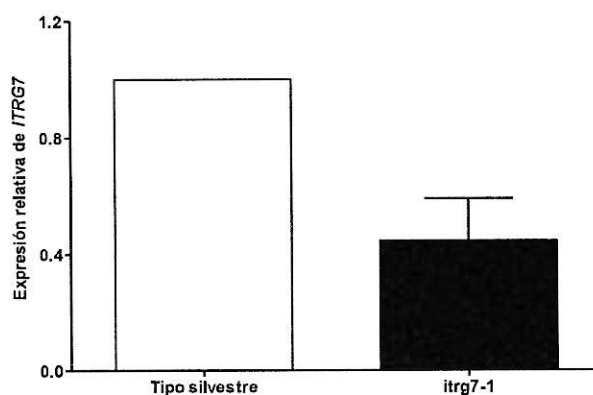


Figura 9. Análisis de los niveles de transcrito de *ITRG7* en planta completa. El análisis fue realizado mediante PCR cuantitativo (RT-qPCR). Se realizó un análisis con tres réplicas técnicas. Barra de error = desviación estándar.

De la Figura 8 se desprende que fue posible obtener ADNc de las líneas de *Arabidopsis* pues el control de actina amplificó en ambos ADN y el control negativo de síntesis de ADNc (reacción sin transcriptasa reversa, RT) no resultó en amplificación alguna. En seguida se infiere que la mutante *itr7-1* no presenta el transcrito de *ITRG7* en hoja y que la contraparte tipo silvestre sí lo presenta pero de manera tenue (Figura 8, indicado con flecha blanca), lo que se corresponde con lo evaluado con la herramienta eFP browser al comparar la expresión de actina con *ITRG7* (Figura 4 del numeral 3.1.4). A nivel de planta completa se concluye que plantas mutantes *itr7-1* de 21 días crecidas en medio MS presentan un 57% menos de transcrito *ITRG7* en comparación con su contraparte tipo silvestre (Figura 9).

3.4. Análisis comparativos de plantas tipo silvestre y mutantes *itrq7-1*

Los organismos mutantes a menudo constituyen la clave para entender la función de los genes que poseen alterados (Alberts y cols, 2002). Sin embargo, dado que las mutaciones podrían interrumpir procesos celulares que van más allá de la función directa del gen, es necesario estudiar la línea mutante *itrq7-1* y evaluar si la inserción de T-DNA acompañada con la disminución en un poco menos del 60% del transcrito de *ITRG7* posee, en primer lugar, un fenotipo intrínseco no asociado con estrés iónico, para posteriormente evaluar la aparición o exacerbación de un fenotipo en estas plantas mutantes que se pueda atribuir a los tratamientos de cultivo con iones.

Considerando lo anterior, se propuso como objetivo el estudio de aspectos fenotípicos como la tasa de germinación, el largo de raíz principal y el peso fresco de plantas tipos silvestre y mutantes *itrq7-1*, tanto en condiciones control como en las condiciones que son de nuestro interés, *i.e.* cultivo en medios con iones.

3.4.1. Respuesta germinativa de *itrq7-1*

La respuesta germinativa de la mutante *itrq7-1* en presencia de iones fue evaluada. Para ello se sembró semillas tipo silvestre y semillas mutantes *itrq7-1* y se calculó la tasa de germinación transcurridos 7 días de sembrado en medios con: 50 μ M y 100 μ M de CdCl₂; 50 μ M y 100 μ M de CuSO₄; 100mM y 150mM de NaCl; control sin adición de iones (Figura 10). Los datos presentados en la Figura 10 muestran que la germinación de la mutante insercional *itrq7-1* se comporta como planta tipo silvestre, tanto en medios con iones adicionados como en medio control.

Sin embargo, se realizaron dos análisis de ANOVA con prueba posterior de Tukey, tomando los datos de tasa de germinación de las plantas silvestres por un lado y por otro, los datos correspondientes a la tasa de germinación de las plantas mutantes, encontrándose que las tasas de germinación observadas en el gráfico de la

Figura 10 de cada grupo (tipo silvestre o mutante) entre un tratamiento y otro no son significativas en su mayoría (ver Tabla Anexo III), salvo las tasas de germinación de plantas tipo silvestre que difirieron significativamente entre el control y 50 μ M de CdCl₂, entre 100 μ M de CuSO₄ y 100mM de NaCl; así como también entre 100 μ M de CdCl₂ y 150mM de NaCl y entre 100mM de NaCl y 150mM de NaCl. De esta manera se desprende que, considerando el conjunto de iones y concentraciones de las condiciones evaluadas, la tasa de germinación de semillas tipo silvestre se ve afectada y no así la de plantas mutantes *itrg7-1* (ver Tabla Anexo III).

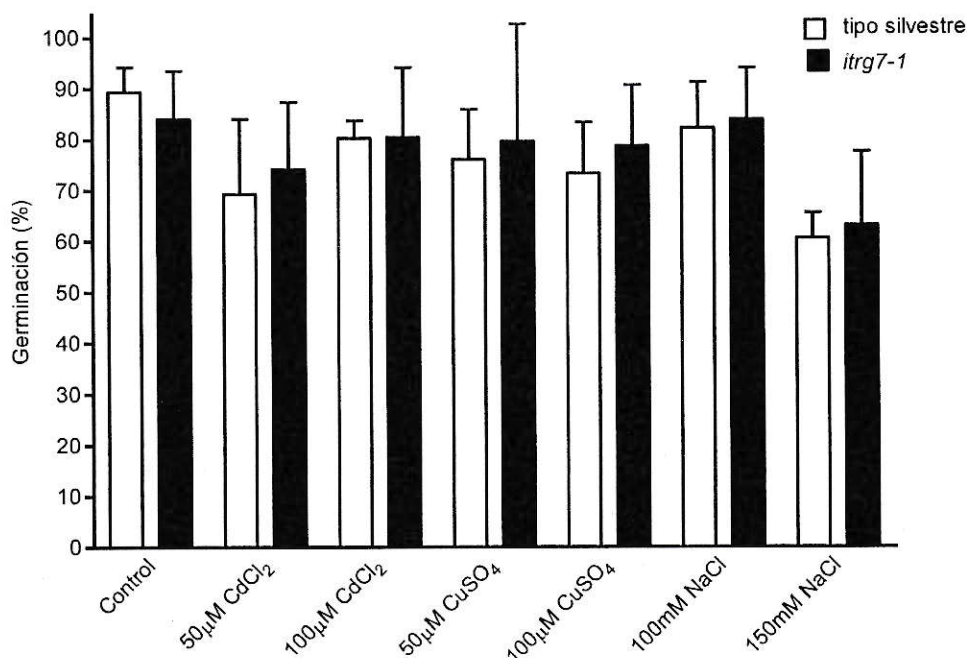


Figura 10. Tasa de germinación de plantas *itrg7-1* en medios adicionados con iones. Se cuantificó la germinación de 25 semillas tipo silvestre (barras blancas, Wt) y 25 semillas mutantes (barras negras, *itrg7-1*) a los 7 días de sembrado en medios adicionados con: 50 μ M y 100 μ M de CdCl₂, 50 μ M y 100 μ M de CuSO₄, 100mM y 150mM de NaCl y control sin adición de iones. Se ensayó dos réplicas biológicas para cada condición, con tres replicas técnicas cada una. Se comparó el porcentaje de germinación de semillas tipo silvestres con el de semillas *itrg7-1* bajo un mismo tratamiento mediante el test estadístico t-Student no pareado, con $p < 0,05$. Barra de error = desviación estándar.

3.4.2. Cuantificación de largo de raíz de plantas *itrq7-1*

La longitud de la raíz principal de plantas mutantes y tipo silvestre crecidas en medios con iones fue cuantificada. Para ello se sembraron plantas tipo silvestre y mutantes *itrq7-1* en medios suplementados con: 50 μ M y 75 μ M de CdCl₂; 50 μ M y 100 μ M de CuSO₄; 100mM y 150mM de NaCl; y medio control, midiendo el largo de raíz a los 10 días. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos. Los resultados dan cuenta de que —bajo un mismo tratamiento— el largo de la raíz principal de plantas mutantes *itrq7-1* es similar al de plantas tipo silvestre, salvo en el tratamiento a 150mM de NaCl, donde el largo de raíz de plantas mutantes *itrq7-1* es significativamente mayor en 2,45mm al de plantas tipo silvestre (Figura 11).

Por último, se realizaron dos análisis de ANOVA con prueba posterior de Tukey, analizando los datos de largo de raíz obtenidos por grupo (tipo silvestre o mutante), encontrándose que las longitudes de raíz entre un tratamiento y otro son —en general— significativamente diferentes (ver Tabla Anexo IV). La disminución observada en el crecimiento de la raíz es consecuencia de los metales evaluados y la sal, lo que ha sido previamente reportado (Marschner, 1995).

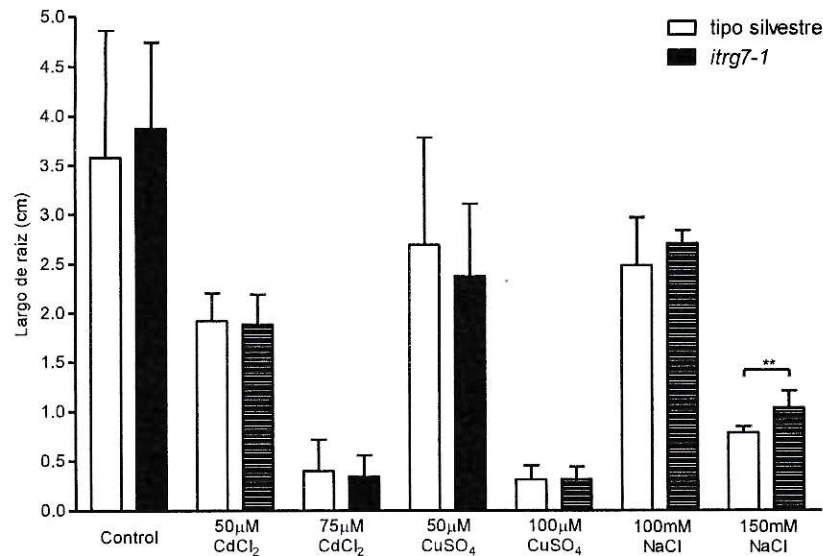


Figura 11. Comparación largo de raíz entre plantas tipo silvestre e *itrg7-1* en medios suplementados con cadmio, cobre y cloruro de sodio. Se midió el largo de raíz principal a los 10 días de sembrado en medio control y con la adición de 50µM de CdCl₂, 75µM de CdCl₂, 50µM de CuSO₄, 100µM de CuSO₄, 100mM de NaCl y 150mM de NaCl. Se comparó el promedio del largo de raíz de plantas tipo silvestres (barras blancas) con el de plantas *itrg7-1* (barras negras) bajo un mismo tratamiento. Se ensayó dos réplicas biológicas para cada condición, con tres réplicas técnicas cada una (n = 30 plantas). t-Student no pareado, p<0,01. Barra de error = desviación estándar.

3.4.3. Medición de peso fresco de plantas *itrg7-1*

Plantas tipo silvestre y mutantes *itrg7-1* de 14 días fueron trasplantadas a medios con distintas concentraciones de cadmio, cobre y cloruro de sodio y se cuantificó su peso fresco luego de 10 días de tratamiento. En promedio, plantas *itrg7-1* pesan 27,17mg más que plantas tipo silvestre en condiciones control (Figura 12). En la misma línea, una diferencia se registró luego del tratamiento con 50µM de CuSO₄, en donde plantas mutantes *itrg7-1* pesan 42,24mg más que plantas tipo silvestre, indicando que esta concentración de cobre exacerba la diferencia (Figura 12). En el resto de las condiciones evaluadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre plantas mutantes y tipo silvestre (al compararlas en un mismo tratamiento), desprendiéndose de esta manera que cobre (15µM o 100µM), cadmio (75µM o 200µM)

y cloruro de sodio (100mM, 150mM o 250mM) no afectan ni exacerban la diferencia entre plantas tipo silvestre y mutantes.

Por último, se realizaron dos análisis de ANOVA con prueba posterior de Tukey, tomando los datos de peso fresco de las plantas silvestres por un lado y por otro, los datos correspondientes al peso fresco de las plantas mutantes, encontrándose que las diferencias de peso fresco observadas en el gráfico de la Figura 12 de cada grupo (tipo silvestre o mutante) entre un tratamiento y otro son significativas (ver Tabla Anexo V). Así, los tratamientos afectan por igual a plantas tipo silvestre y mutantes *itrq7-1*.

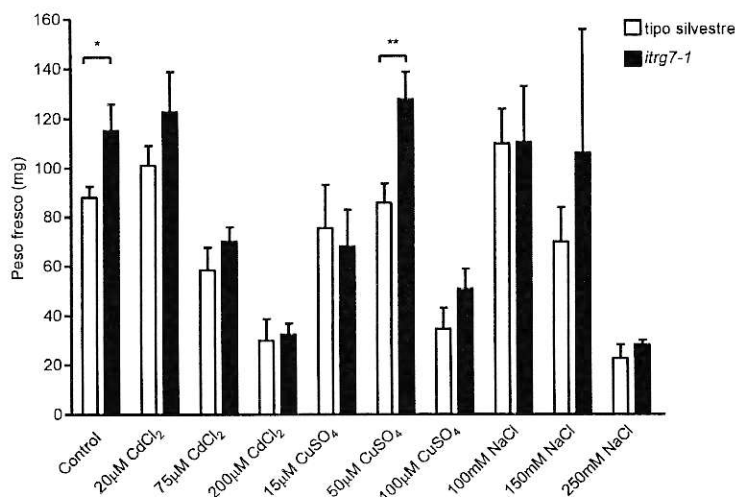


Figura 12. Medición peso fresco de plantas tipo silvestre e *itrq7-1* luego de tratamientos con medios suplementados con iones. Se evaluó el peso de plantas de 24 días (14 días postgerminación y luego tratadas por 10 días) con: 20µM, 75µM y 200µM de CdCl₂; 15µM, 50µM y 100µM de CuSO₄; 100mM, 150mM y 250mM de NaCl. Se compararon los promedios de plantas tipo silvestre (barras blancas) y mutantes *itrq7-1* (barras negras) bajo un mismo tratamiento. Se ensayó dos réplicas biológicas para cada condición, con tres réplicas técnicas cada una (n = 24 plantas). t-Student no pareado, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Barra de error = desviación estándar.

3.5. Clonamiento del ADNc de *ITRG7* en vectores de expresión en plantas y levaduras

Como segunda aproximación para abordar el estudio se planteó la expresión heteróloga de *ITRG7* utilizando levaduras como hospedero. El empleo de levaduras

como herramientas de expresión heteróloga ha sido extensamente aplicado en ciencias biológicas (Romanos et al, 1992). Por otro lado, la elaboración de constructos para la sobreexpresión de *ITRG7* en *Arabidopsis* permitirá contar con herramientas moleculares que facilitarán continuar con la investigación de este gen, tanto en una base mutante como silvestre.

Ya sea en levaduras o en plantas, la sobreexpresión de un gen de interés podría causar fenotipos mutantes (Prelich, 2012), las que al compararlas con el respectivo control, nos pueden otorgar pistas sobre la implicancia de *ITRG7* en estrés iónico.

Para lograr obtener los constructos que permitan la expresión de *ITRG7* en levaduras y en plantas, es necesario aislar su fragmento codificante desde *Arabidopsis* tipo silvestre. Teniendo esto en cuenta, se propuso como objetivo la obtención y el clonamiento del ADNc de *ITRG7* en vectores de expresión en levaduras y en vectores de expresión en plantas. Por último, se realizó la transformación de levaduras con los vectores obtenidos.

3.5.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc de *ITRG7*

De una planta completa de *Arabidopsis* tipo silvestre se extrajo ARN, obteniendo una concentración de 442,2 ng/ μ L y valores para las razones de absorbancia 260/280 y 260/230 de 2,16 y 2,04, respectivamente, indicando que el material obtenido se encuentra en condiciones adecuadas para ser utilizado. La integridad del ARN fue evaluado mediante un gel denaturante, no encontrándose signos de degradación (Figura 14A). Luego, se realizó la síntesis de ADNc mediante RT-PCR. Para descartar la presencia de ADNg se realizó un control sin la enzima transcriptasa reversa (RT). La calidad del ADNc resultante fue evaluada mediante PCR con los partidores *ITRG7-F*, *ITRG7-R* y actina. Se obtuvieron dos bandas que están

dentro del margen de tamaño esperado para *ITRG7* y actina, de 1080pb y de 688pb, respectivamente (Figura 14B, flechas blancas). En el caso del control sin RT, no se obtuvo amplificado, descartándose la presencia de ADNg (Figura 14B, carriles "Sin RT"). Empleando este ADNc como templado, se realizó un PCR utilizando la polimerasa *Pfu* para obtener ADNc de *ITRG7* —sin codón de término, para generar proteínas de fusión con GFP o etiquetadas con el epítopo HA— y con mejor fidelidad, ya que esta enzima presenta actividad exonucleasa 3'→5', que le permite corregir errores durante la síntesis de nuevas hebras. De esta manera se obtuvo el ADNc de *ITRG7* para clonarlo en un vector, de manera de generar las herramientas moleculares que permitan su posterior expresión.

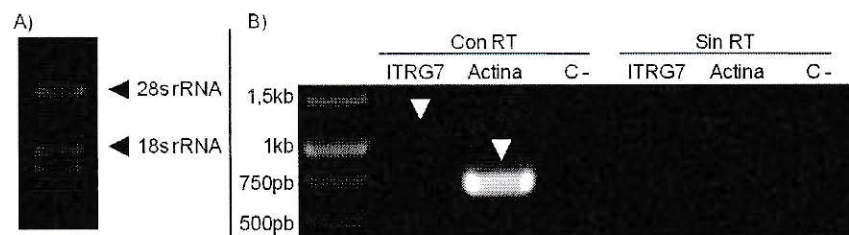


Figura 13. Extracción de ARN y obtención del ADNc de *ITRG7* desde *Arabidopsis thaliana*. A) Fotografía de un gel denaturante en donde se observa ARN obtenido de *Arabidopsis*. En flechas negras se señalan las bandas correspondientes a ARN ribosomal 28s y 18s. B) Bandas obtenidas mediante amplificación por PCR empleando como templado el ADNc sintetizado desde el ARN aislado. En carriles bajo "con RT" (RT = enzima transcriptasa reversa) se observan bandas dentro del margen de tamaño esperado, de 1080pb para *ITRG7* y de 688pb para Actina. En el control "sin RT" no se observan bandas, descartando la presencia de ADNg.

3.5.2. Clonamiento de *ITRG7* y recombinación en vectores de expresión en levadura y planta

Una vez purificado el producto de PCR amplificado con la enzima *Pfu* se procedió a realizar el clonamiento de *ITRG7* en el vector de entrada pCR8, que posee la tecnología de recombinación Gateway®. Enseguida, se transformó *E. coli* y se cultivó en medio de selección con antibiótico espectinomicina. De las colonias transformantes se seleccionaron 10, a las cuales se realizó extracción de ADN plasmidial. Mediante PCR (Figuras 15A, 15B y 15C) y digestión enzimática (Figura 15D) se comprobó la presencia y la orientación del inserto ADNc de *ITRG7*. Los criterios para definir cual plasmidio presenta el inserto de *ITRG7* en la orientación deseada para el posterior subclonamiento en los vectores de expresión son: obtención de una banda de 1080pb al utilizar los partidores ITRG7-F e ITRG7-R (Figura 15A), obtención de una banda de 1227pb al utilizar los partidores M13-F e ITRG7-R (Figura 15B), obtención de una banda de 1250pb al utilizar los partidores ITRG7-F y M13-R (Figura 15C) y obtención de dos bandas de 469pb y 3428pb, respectivamente, al utilizar en conjunto las enzimas de restricción *SacI* y *EcoRV* (Figura 15D). De las colonias 2, 4, 5, 7 y 10 —que cumplen con los requisitos antes planteados— se escogió la 4 y la 7 (Figura 15, flechas negras) y se envió a secuenciar las regiones clonadas en los vectores. Ambas secuenciaciones (datos no mostrados) demuestran que la secuencia nucleotídica del ADNc clonado de *ITRG7* es igual al de la secuencia disponible en la base de datos —salvo por la ausencia del codón de termino, según el diseño de la estrategia— y que se encuentra en la orientación correcta.

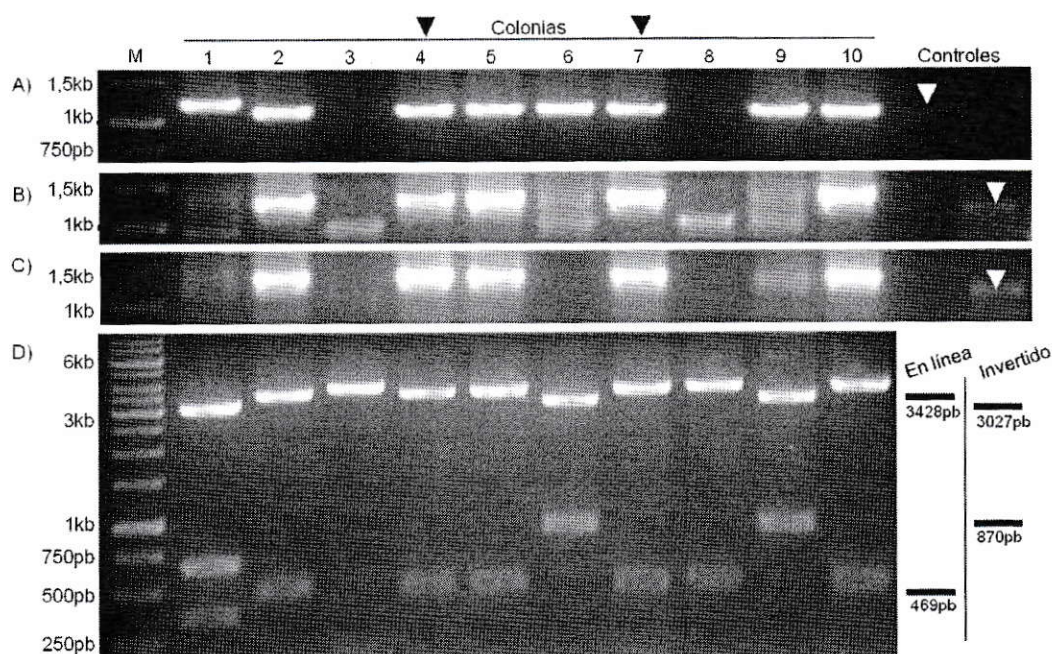


Figura 14. Comprobación del clonamiento y orientación del fragmento de ADNc de *ITRG7* en vector pCR8. Se utilizó ADN plasmidial purificado de diez colonias como templado para las reacciones. A) Productos de PCR utilizando partidores ITRG7-F e ITRG7-R, tamaño esperado: 1080pb. B) Amplificados de PCR utilizando partidores M13-F e ITRG7-R, tamaño esperado: 1227pb. C) Productos de PCR utilizando los partidores ITRG7-F y M13-R, tamaño esperado: 1250pb. D) Digestión con enzimas de restricción *Sacl* y *EcoRV*, se muestra un esquema con las bandas y tamaños esperados acorde a la orientación del inserto. Al costado izquierdo se indican los pesos moleculares del marcador de cada fotografía (carril M). En flechas negras se señalan los plasmidios escogidos para realizar la recombinación en vectores de expresión en levadura y plantas. Controles: Las flechas blancas indican el control positivo, obtenido con los partidores ITRG7-F y R, utilizando como templado ADNc; controles negativos no tienen templado.

Por último, se realizó la reacción de recombinación del vector pCR8-*ITRG7* con los vectores de expresión en levadura pAG426-*ccdB*-EGFP y pAG426-*ccdB*-HA y los vectores de expresión en plantas pGWB5-*ccdB*-GFP, pGWB8-*ccdB*-HIS y pMDC85-*ccdB*-GFP, los cuales previamente fueron analizados mediante digestión enzimática (datos no mostrados) para descartar la presencia de otro inserto o contaminación. Los productos de estas recombinaciones fueron transformados en *E. coli* y se seleccionaron colonias transformantes en base a su resistencia a antibióticos (revisar Tabla VII del numeral 2.4). Posteriormente se comprobó la presencia y la orientación

del inserto de *ITRG7* en los vectores purificados desde las colonias transformantes mediante PCR y digestión enzimática (datos no mostrados) obteniendo que, en cada vector utilizado, la presencia y orientación del inserto *ITRG7* era el correcto. Se prepararon criotubos con glicerol para almacenar las colonias a -80°C . De esta manera los vectores de expresión de *ITRG7*, tanto en plantas como en levaduras, están disponibles en *E. coli*.

3.5.3. Transformación de *A. tumefaciens* con vectores de expresión de *ITRG7*

Se transformaron *Agrobacterium tumefaciens* con los vectores de expresión en plantas (pGWB5, pGWB8 y pMDC85), tanto la versión con el inserto de *ITRG7* como también sin inserto, para ser utilizados como condición control a futuro. Se seleccionaron tres colonias obtenidas por evento de transformación y mediante PCR de colonia se analizó la amplificación del inserto de *ITRG7* en cada uno de los vectores, obteniendo los resultados de la Figura 16. Se observa la ausencia de amplificado en el caso de las transformantes sin inserto y una banda del tamaño esperado de 1080pb en los vectores con inserto, salvo en la colonia 3 de pGWB5-*ITRG7* (Figura 16C), donde no se observa amplificado.

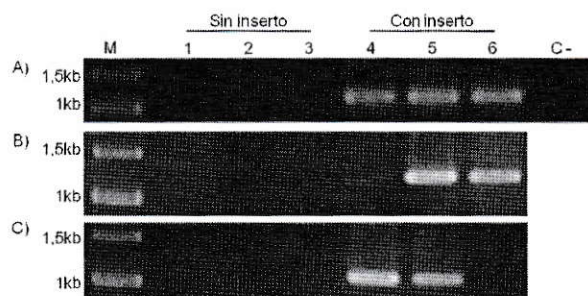


Figura 15. Verificación de transformantes de *A. tumefaciens* con vectores de expresión en plantas. Se extrajo ADN plasmidial de tres colonias obtenidas por evento de transformación y se realizó PCR para amplificar *ITRG7* (1080pb). A) Plasmidio pMDC85 sin inserto (colonias 1 a 3), con inserto (colonias 4 a 6). B) Plasmidio pGWB8 sin inserto (colonias 1 a 3), con inserto (colonias 4 a 6). C) Plasmidio pGWB5 sin inserto (colonias 1 a 3), con inserto (colonias 4 a 6). Al costado izquierdo se indican los pesos moleculares del marcador de cada gel (carril M). Se utilizó un control negativo sin templado.

3.5.4. Transformación de levaduras con vectores de expresión de *ITRG7*

Se transformaron levaduras con los vectores sin inserto —a las que denominó como HA y GFP— y con los vectores de expresión del marco de lectura abierto de *ITRG7*, denominadas *ITRG7*-HA e *ITRG7*-GFP. Se seleccionaron las transformantes creciéndolas en medio mínimo carente del nucleótido uracilo, ya que por un lado, la cepa de levadura empleada presenta auxotrofia para uracilo, y por otro, los vectores recuperan la prototrofia de síntesis de este nucleótido. Se seleccionaron dos colonias obtenidas por evento de transformación. Posteriormente, se realizó PCR de colonia para evaluar la presencia y orientación del inserto de *ITRG7* en aquellas colonias transformantes con vector con inserto. En aquellas colonias transformantes con vector sin inserto se evaluó la presencia del segmento *ccdB*, el cual debiese estar presente ya que, al no haber ocurrido un evento de recombinación, permanece en el vector.

Para cada transformante se obtuvieron los resultados esperables según el vector analizado, esto es, para los vectores con inserto, se obtuvo la presencia de *ITRG7* en la orientación correcta, y en el caso de los vectores sin inserto, se determinó que estas colonias poseen el fragmento de *ccdB* (datos no mostrados).

3.6. Presencia de *ITRG7* recombinante en levaduras

Los vectores de expresión en levaduras utilizados en el presente seminario de título permiten la identificación y visualización de una proteína recombinante que, dependiendo del vector, posee en su extremo carboxilo terminal, un epítopo HA (*ITRG7*-HA) ó la proteína fluorescente verde GFP (*ITRG7*-GFP). Estos elementos facilitan el análisis de la proteína recombinante mediante métodos inmunoquímicos (HA y GFP) y visuales (GFP), con los cuales se puede estudiar, en levaduras transformantes, la presencia de una proteína de fusión de *ITRG7* y su localización a nivel celular. En este trabajo se recurrió a técnicas de transcripción reversa, Western

Blot, y microscopía de epifluorescencia con el objetivo de evaluar la presencia de un transcrito de ARN y un producto proteico atribuible a *ITRG7*, además de su localización celular en levaduras transformantes.

Se realizó síntesis de ADNc desde ARN de levaduras transformadas con los vectores con inserto —denominadas ITRG7-HA1, ITRG7-HA2, ITRG7-GFP1 e ITRG7-GFP2— y desde una levadura sin transformar (tipo silvestre). Como control para descartar la presencia de ADNg o de ADN plasmidial se realizaron sendas reacciones en paralelo sin la enzima transcriptasa reversa (RT). La calidad del ADNc sintetizado fue analizada mediante amplificación por PCR de la cadena liviana de clatrina, gen cuyo ARN debiese estar presente tanto en levaduras transformadas como en las no transformadas, con un tamaño esperado de 702pb. En la Figura 17 se observa la obtención de una banda del tamaño esperado en todas las reacciones a partir de templado sintetizado con RT —tanto en levadura tipo silvestre como en las transformadas— (Figura 17, carriles 1, 3, 5, 7 y 9) no así en los controles sin RT, descartando la presencia de ADNg o ADN plasmidial (Figura 17, carriles 2, 4, 6, 8 y 9), por lo que se cuenta con ADNc de levaduras para realizar posteriores análisis.



Figura 16. Verificación de síntesis de ADNc de levadura mediante amplificación de cadena liviana de clatrina. En carriles 1, 3, 5, 7 y 9 se empleó templado obtenido mediante transcriptasa reversa (RT). En carriles 2, 4, 6, 8 y 10 se ocupó templado de reacciones sin RT. En todos los carriles con RT se observa una banda del tamaño esperado (702pb). Al costado izquierdo se indican los pesos moleculares del marcador (carril M). Se utilizó un control negativo sin templado.

Enseguida se realizó un PCR con los ADNc sintetizados para evaluar la presencia de transcritos de los constructos ITRG7-HA e ITRG7-GFP. En el caso de las

levaduras ITRG7-HA1 e ITRG7-HA2 se amplificó el fragmento correspondiente a *ITRG7*, de 1080pb. En el caso de las levaduras ITRG7-GFP1 e ITRG7-GFP2 se amplificó el constructo recombinante utilizando los partidores ITRG7-F y GFP-R, de un tamaño esperado aproximado de 1600pb. Los controles positivos de las reacciones fueron ADN plasmidial purificado (el mismo con el cual previamente se realizaron las transformaciones de las levaduras). En la Figura 18 se observa la obtención de los fragmentos esperados en las dos levaduras ITRG7-HA y en las dos levaduras ITRG7-GFP (no así en la levadura tipo silvestre), por lo que se cuenta con levaduras que producen transcritos de *ITRG7* y transcritos de *ITRG7-GFP*.

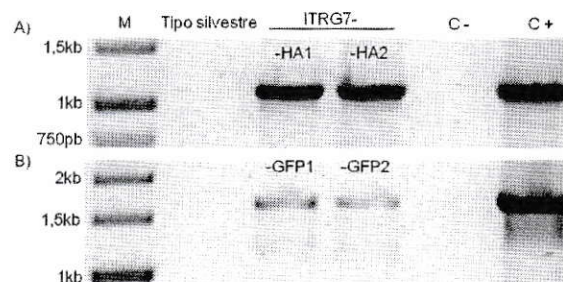


Figura 17. Las levaduras transformadas generan un transcrito recombinante de *ITRG7*. A) Se observa la amplificación de una banda esperada de 1080pb en las levaduras ITRG7-HA1 e ITRG7-HA2. B) Se observa la amplificación de una banda esperada de aproximadamente 1600pb en las levaduras ITRG7-GFP1 e ITRG7-GFP2. Al costado izquierdo se indican los pesos moleculares del marcador (carril M). Carril C-: control negativo sin templado. Carril C+: controles positivos (ADN plasmidiales pAG426-ITRG7-HA y pAG426-ITRG7-EGFP usados como templado).

Luego, se realizó extracción en condiciones denaturantes de proteínas totales de levadura transformada con el vector pAG426-ccdB-EGFP (sin inserto), de levaduras ITRG7-GFP1 e ITRG7-GFP2 y de una levadura previamente caracterizada en el laboratorio que expresa una proteína recombinante con GFP como control positivo (gentileza de la Dra. Daniela Urbina). Con estos extractos se realizó un ensayo de Western Blot, mediante detección por quimioluminiscencia y posterior revelado fotográfico, obteniendo una señal anti-GFP en la muestra de levadura con vector sin

inserto, con un peso molecular aparente de 25kDa (Figura 19, carril GFP). En las levaduras ITRG7-GFP1 e ITRG7-GFP2 se detectó al menos tres bandas de entre 25 a 30 kDa (Figura 19, carriles ITRG7-GFP1 e ITRG7-GFP2). En el caso del control positivo se obtuvo dos señales —reportadas previamente en el laboratorio— de 70 y 25 kDa, respectivamente (Figura 19, carril C+). De estos resultados se desprende que: 1) la extracción de proteínas y el posterior Western Blot permiten detectar proteínas GFP positivas; 2) la levadura con vector sin inserto genera proteína fluorescente verde ya que la señal es de tamaño aparente similar al esperado de 25 kDa y 3) las levaduras ITRG7-GFP1 e ITRG7-GFP2 contienen péptidos GFP positivos, sin embargo están alejadas del peso molecular aparente esperado de 67 kDa para la proteína recombinante ITRG7-GFP. No se realizó Western Blot con extractos de levaduras ITRG7-HA ya que el anticuerpo anti-HA no estaba disponible.

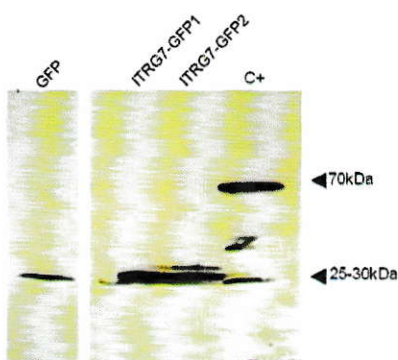


Figura 18. Las levaduras transformantes ITRG7-GFP producen una proteína GFP positiva. Imagen del revelado fotográfico de una membrana luego de realizar Western Blot. Carril GFP: corresponde a muestra proveniente de levadura transformada con el vector pAG426-ccdB-EGFP, se espera una banda de proteína con una migración electroforética correspondiente a una proteína de aproximadamente 25kDa. Carriles ITRG7-GFP1 e ITRG7-GFP2: corresponde a muestras provenientes de dos levaduras transformantes, se espera una señal correspondiente a una proteína de 67kDa. Carril C+: corresponde a una proteína fusionada a GFP caracterizada previamente en el laboratorio, cuya señal es cercana a los 70 kDa.

Posteriormente, se analizó con microscopía de fluorescencia las levaduras transformantes, tanto GFP como ITRG7-GFP. Para ello se tomó una muestra de colonia de levaduras y se dispuso en un portaobjeto con cubreobjeto. Se tomaron

imágenes en campo claro y en modo fluorescencia de GFP. En la Figura 20 se muestran imágenes representativas de las observaciones realizadas (Figura 20, filas A, B y C) a levaduras vector sin inserto (Figura 20, columna "Transformantes GFP") y levaduras ITRG7-GFP (Figura 20, columna "Transformantes ITRG7-GFP"). En las transformantes GFP se observa una distribución de la señal fluorescente en gran parte de la célula, con zonas en donde no hay fluorescencia. Este patrón encaja con una distribución citoplasmática esperada de GFP, en donde las zonas sin fluorescencia denotarían la presencia de vacuolas (indicado con flechas blancas en las imágenes, Figura 20), a las cuales la proteína GFP no ingresa. En el caso de las transformantes ITRG7-GFP se observa un patrón de distribución de la señal fluorescente distinta al control GFP, acotada, en el interior de las levaduras (indicada con flechas rojas en las imágenes, Figura 20), la que es observable en aproximadamente un 33% de la población analizada. A esta distribución particular de ITRG7-GFP la denominaremos como "*cuerpo GFP positivo*".

De la población de transformantes ITRG7-GFP que presentan fluorescencia, la mayoría denota la presencia de sólo 1 cuerpo GFP positivo. Teniendo en cuenta que sólo se encuentra 1 núcleo por célula, se realizó tinción con DAPI con el fin de evaluar si este cuerpo GFP positivo colocaliza con el núcleo de las levaduras. En la Figura 21, imágenes representativas de este ensayo se muestran en campo claro, DAPI y GFP, tanto para el control transformantes GFP (filas A y B, Figura 21) como para las transformantes ITRG7-GFP (filas C y D, Figura 21). Tanto en las transformantes GFP como en ITRG7-GFP es posible observar un cuerpo DAPI positivo (señalado con flechas blancas), indicando la presencia de ADN y por ende, del núcleo. No obstante, esta señal no colocaliza con el cuerpo GFP positivo de las transformantes ITRG7-GFP (indicando con flechas rojas), descartándose la presencia de ITRG7-GFP en el núcleo.

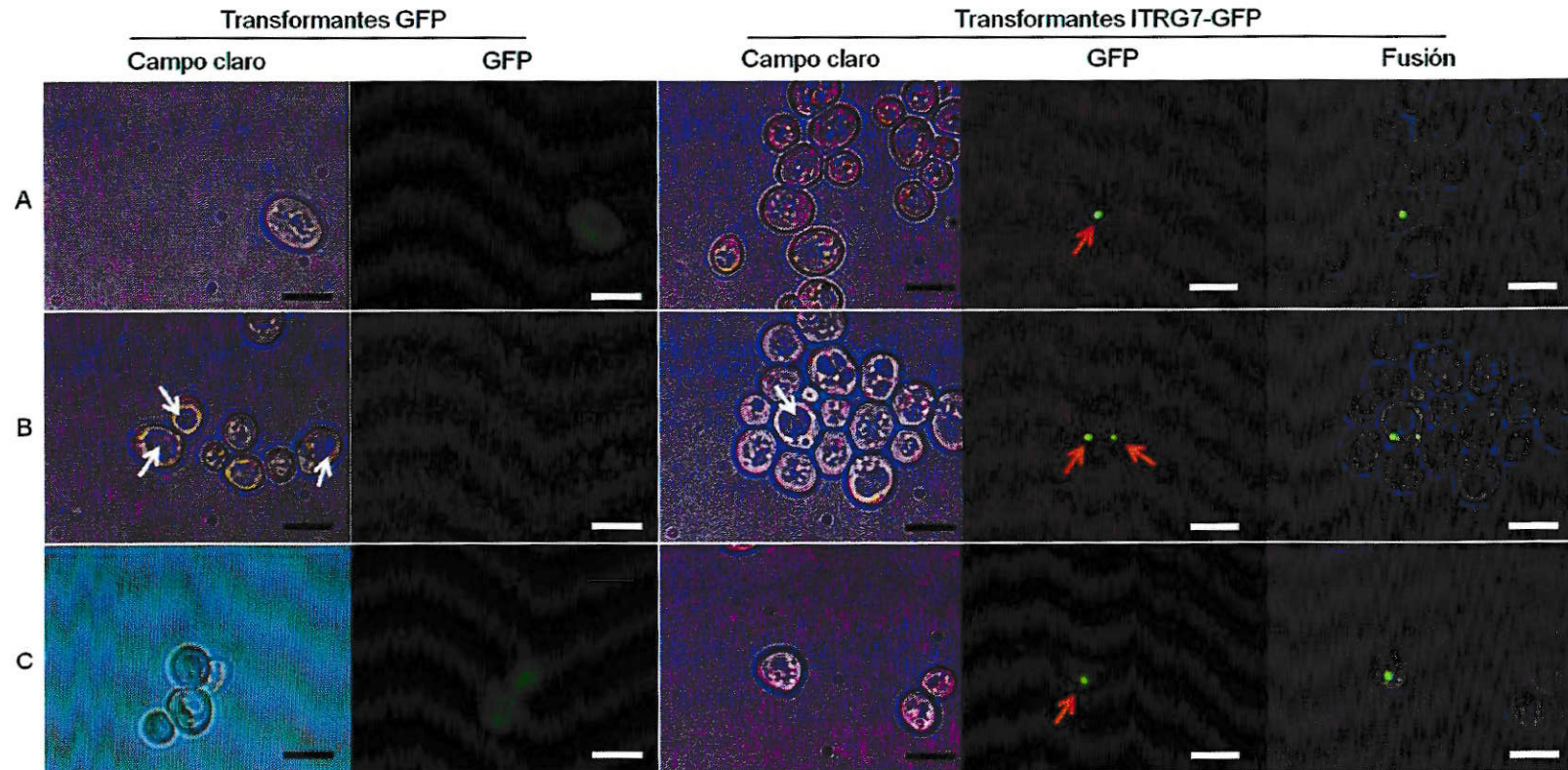


Figura 19. ITRG7-GFP presenta una distribución discreta en levaduras. Filas A, B y C: imágenes representativas de transformantes GFP e ITRG7-GFP en campo claro y GFP. Flechas blancas indican vacuola, flechas rojas indican el cuerpo GFP positivo observado en transformantes ITRG7-GFP. Barra de tamaño = 5 μ M.

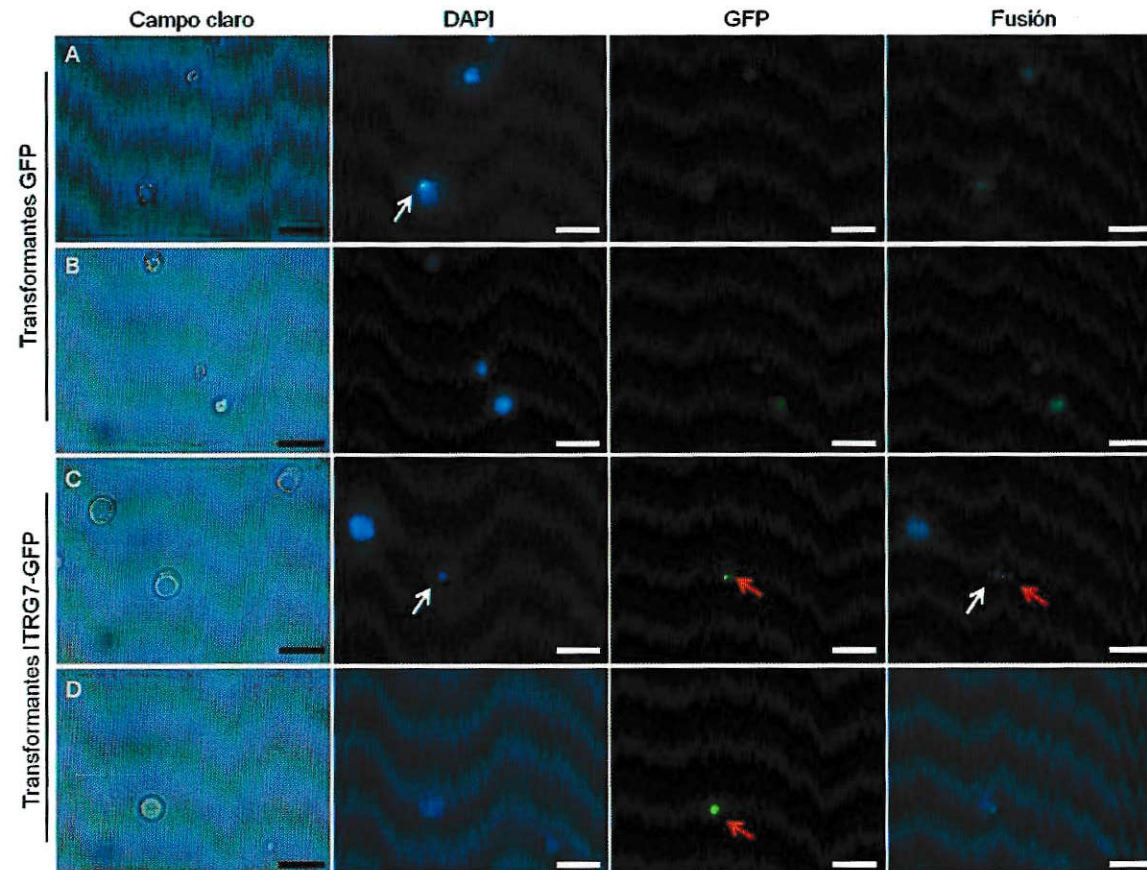


Figura 20. La distribución de ITRG7-GFP en levadura es diferente a la del núcleo. Imágenes representativas de levaduras transformantes GFP (filas A y B) e ITRG7-GFP (filas C y D) en campo claro, DAPI y GFP. Flechas blancas indican núcleo, flechas rojas indican el cuerpo GFP positivo observado en transformantes ITRG7-GFP. Barra de tamaño = 10 μ M.

3.7. ITRG7 limita el crecimiento de levaduras en presencia de iones

Ya que se obtuvieron levaduras transformantes ITRG7-HA e ITRG7-GFP y sus respectivos controles (vectores sin inserto) HA y GFP, se dio paso al estudio del crecimiento de estas levaduras en medios con iones con el objeto de evaluar posibles fenotipos asociados a la presencia de proteínas recombinantes de *ITRG7*. Para ello, se utilizó medio YMM líquido y sólido con adición de NaCl, CuSO₄, ZnSO₄, CdCl₂ ó CoCl₂. Estos tres últimos metales se evaluaron dada su característica de metales pesados que tienen efectos deletéreos en la agricultura.

En la Figura 22 se muestran fotografías representativas de colonias de transformantes crecidas en placas con sal, zinc, cobre, cadmio, cobalto y el control sin adición de iones. El experimento fue realizado en dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas cada una. Los resultados denotan que las levaduras transformantes crecen por igual en medio control, indistintamente del vector (Figura 22, filas 1 a 8 del control). Sin embargo, en medios con adición de metales se observan diferencias: colonias de levaduras transformantes ITRG7-GFP (Figura 22, filas 1 y 2) e ITRG7-HA (Figura 22, filas 5 y 6) crecen con una menor tasa que las levaduras transformantes control GFP (Figura 22, filas 3 y 4) y control HA (Figura 22, filas 7 y 8) en medios con 0,5 y 1M de NaCl, 10mM de ZnSO₄, 1 y 3mM de CuSO₄ y con 75µM de CdCl₂. En 500µM de CoCl₂ no se observaron diferencias entre transformantes ITRG7 y los controles GFP o HA. De esta manera, se desprende que ITRG7 confiere sensibilidad a las levaduras cuando son crecidas en medios enriquecidos con sal, zinc, cobre y cadmio.

Además, se realizó un ensayo de crecimiento de levaduras transformantes ITRG7-GFP, ITRG7-HA, GFP y HA en medio líquido suplementado con 1mM de CuSO₄, 500µM de CoCl₂ y 50µM CdCl₂, midiendo la OD₆₀₀ cada 24h por 4 días,

partiendo de una OD_{600} de 0,1 en cada caso. En la Figura 23 se muestra un gráfico con los resultados obtenidos. A las 24h se observa que, tanto en cobre como en cobalto, las transformantes GFP y HA han alcanzado una OD_{600} mayor que las transformantes con ITRG7. En cloruro de cadmio, transformantes ITRG7-GFP han alcanzado una OD_{600} ligeramente superior que GFP, HA o ITRG7-HA. Cuando las curvas de crecimiento están llegando a fase estacionaria (96h), se observa que en cobre, cobalto y cadmio, tanto GFP como HA han alcanzado una OD_{600} superior a sus respectivas contrapartes con ITRG7, confirmando lo observado en los ensayos en medio sólido (placas): ITRG7 limita el crecimiento de las levaduras en medios enriquecidos con iones. Más aún, este ensayo muestra que en presencia de cobalto esta limitación también está presente, lo que no fue evidente en los ensayos en medio sólido.

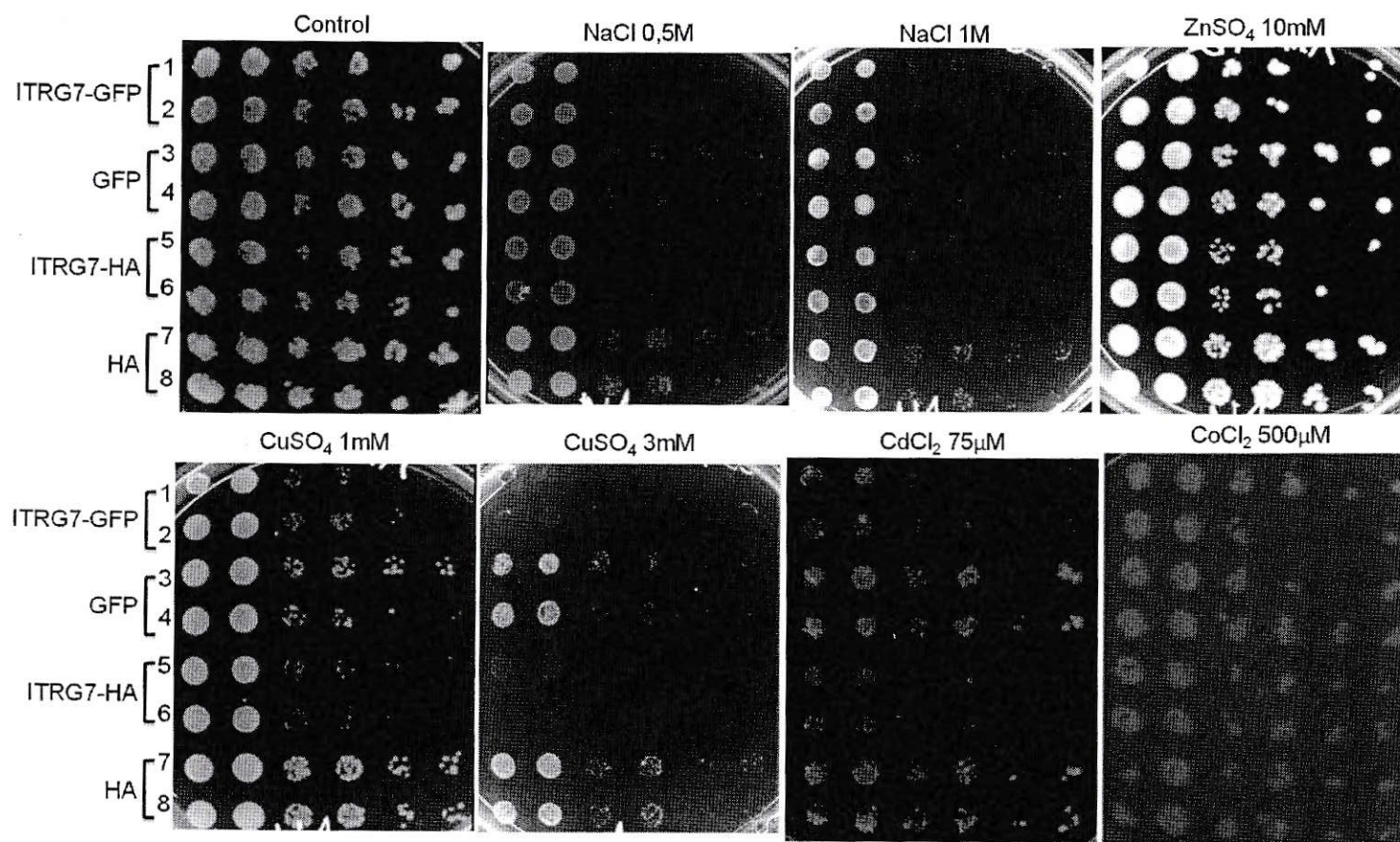


Figura 21. ITRG7 en levadura *S. cerevisiae* confiere sensibilidad a sal, zinc, cobre y cadmio. Fotografías de ensayos de crecimiento de colonias transformantes ITRG7-GFP (filas 1 y 2), GFP (filas 3 y 4), ITRG7-HA (filas 5 y 6) y HA (filas 7 y 8) en placas de YMM suplementadas con 0,5 y 1M de NaCl, 10mM de ZnSO₄, 1 y 3mM de CuSO₄, 75µM de CdCl₂, 500µM de CoCl₂ y el control en medio YMM sin iones adicionados. Cada par de columnas de colonias representa un duplicado de dilución seriada 1/10, 1/100 y 1/1000 de un cultivo inicial DO₆₀₀ igual a 4,0.

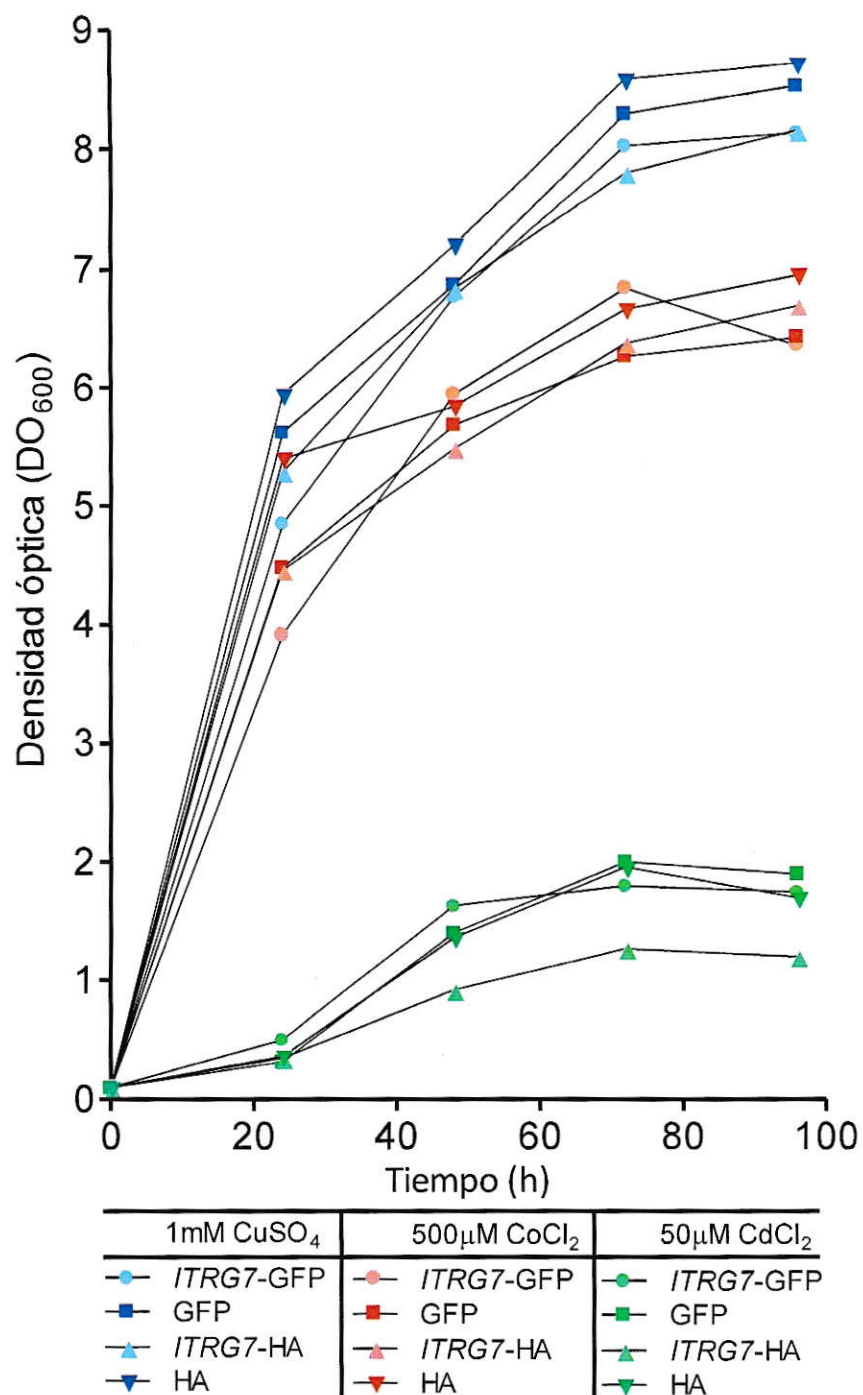


Figura 22. Ensayos de crecimiento de levaduras transformantes en medio líquido. Se evaluó el crecimiento de las levaduras transformantes ITRG7-GFP, ITRG7-HA, GFP y HA en medio líquido suplementado con 1mM de CuSO₄, 500µM de CoCl₂ o 50µM de CdCl₂. Se midió la OD₆₀₀ cada 24h por 4 días. OD₆₀₀ inicial = 0,1. Los datos corresponden a una réplica biológica sin réplicas técnicas.

4. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

4.1. Análisis estructurales de ITRG7

Los análisis realizados sobre ITRG7 con herramientas computacionales dan cuenta de una secuencia aminoacídica que posee un péptido señal y diez dominios transmembrana, componentes que indicarían —aunque sin ser suficientes por si solos— estar ante la presencia de una proteína transmembrana cuya localización subcelular está dirigida hacia un compartimiento membranosos, ya que el péptido señal detectado corresponde al de destinación a retículo endoplasmático, descartando su destinación a mitocondria o cloroplasto, según se muestra en la Tabla XII. Más aún, presenta dominios que son característicos de proteínas con función de transporte de metabolitos y/o drogas (Figura 2), lo que complementa la idea de que esta proteína transmembrana posea algún tipo de actividad de transporte.

En un principio se pensó que la detección de sitios de fosforilación por PKC (quinasas calcio-fosfolipido dependientes), de miristoilación y de fosforilación por CKII (quinasas dependiente de caseína II) podrían constituir mecanismos postraduccionales de la actividad de ITRG7 (Figura 3). Sin embargo, las plantas carecen de proteínas PKC (Munnik y Testerink, 2009) y la miristoilación de proteínas —si bien ocurre en plantas— es específica en una glicina cuya ubicación sea adyacente a la metionina del extremo amino terminal (Farazi y col., 2001), por lo que es altamente probable que los sitios detectados en ITRG7 sean falsos positivos. Los falsos positivos (y también falsos negativos) no constituyen un hecho aislado para este tipo de modificación postraduccional y la comunidad científica ha puesto el tema en discusión desde hace un tiempo para definir un nuevo método de predicción (Maurer-Stroh y col., 2002). Por último, las CKII son Serina/Treonina kinasas presentes en todos los organismos

eucariontes, conformadas por dos subunidades catalíticas α y dos subunidades regulatorias β .

En *Arabidopsis* se ha descrito que las cuatro subunidades se expresan de manera ubicua en todos los tejidos, describiéndose roles en procesos fisiológicos como como señalización por luz, ritmos circadianos, respuestas hormonales, control del ciclo celular y tiempo de floración (Jayant, J. y col., 2012). Una doble y una triple mutante de los cuatro genes de subunidad α existente en *Arabidopsis* muestran un fenotipo hiposensible a NaCl (Jayant, J. y col., 2012). En remolacha, la subunidad α es inducida por NaCl y ha sido mostrado que aumenta la tolerancia a esta misma sal en levadura (Kanhonou y col., 2001). Estas evidencias sustentan la idea de que ITRG7, bajo el contexto de estrés salino, podría ser un blanco de estas enzimas y en respuesta asociada al estrés. Los sitios predichos de fosforilación por CKII se ubican en zonas accesibles de la proteína (Figura 3, en azul).

Según los datos de microarreglos, *ITRG7* se expresa de manera preferencial en semilla y en raíz (Figura 6), e interesantemente, su expresión cambia ante estrés salino, reprimiéndose en raíces y aumentando en el tejido foliar (Figura 5).

4.2. Niveles de transcrito de ITRG7 como evidencia de su participación en estrés iónico

En este Seminario se ha demostrado que los niveles de transcrito de *ITRG7* cambian de manera significativa cuando las plantas son sometidas a tratamientos con cadmio, cobre y NaCl (Figura 6). La disminución observada da cuenta de una regulación transcripcional en *ITRG7*, pero no es suficiente para asignarle un rol pivotante en la respuesta a estrés iónico, ya que la disminución puede ser por efecto directo, inmediato, de la presencia de los iones evaluados, así como por una respuesta

tangencial o derivada, producida por acontecimientos moleculares o fisiológicos causados por estas condiciones. En plantas, cadmio modifica la razón Fe/Zn —de hecho su absorción es mediante los transportadores de estos metales— e impide la absorción del hierro y el normal transporte de calcio, magnesio, fósforo y potasio (Root y col., 1975; Pence y col., 2000). De manera temprana, en hojas produce una disminución de los contenidos de clorofila y carotenoides, así como un aumento en H_2O_2 (Martínez-Peñalver y col., 2012). Todos estos efectos conllevan al fenotipo final de plantas envenenadas con cadmio: inhibición del crecimiento y clorosis. Nuestros resultados muestran que a $20\mu M$ de cadmio no hay cambios en los niveles de transcrito de *ITRG7* pero sí a $200\mu M$, disminuyendo en 50 veces, mostrando un efecto concentración-dependiente. Previamente se ha demostrado que tratamientos por una semana a concentraciones de 10 a $20\mu M$ de cadmio en *Arabidopsis* no tienen mayores efectos en la relación planta-agua o asimilación de carbón, pero a concentraciones mayores ($>50\mu M$) se observaron disminuciones concentración-dependiente en peso fresco y en la conductancia de la hoja (Perfus-Barbeoch y col., 2002).

La toxicidad por cobre reduce el crecimiento, afecta la estructura de la membrana del tilacoide, altera el transporte celular y modifica niveles de metabolitos (Schiavon y col. 2007). La inhibición del crecimiento de la raíz principal ocurre de manera concentración dependiente, desde $25\mu M$, con una completa inhibición a $50\mu M$ de sulfato de cobre (Lequeux y col., 2010). En nuestros resultados, una disminución de 75% en los niveles de transcrito de *ITRG7* se registró tanto a $15\mu M$ como a $100\mu M$ de sulfato de cobre, mostrando independencia de la concentración utilizada.

Los efectos deletéreos de NaCl en plantas son el resultado de una deficiencia de agua —lo que conlleva a estrés osmótico— y el exceso de iones de sodio en

procesos bioquímicos claves (Zhang y Blumwald, 2001). Los niveles de transcrito de *ITRG7* disminuyen desde un poco menos de la mitad (a 150mM) hasta 50 veces (a 250mM), mostrando un efecto dependiente de la concentración. Está reportado que ocurre una disminución de la tasa de crecimiento de la raíz principal dependiente de la concentración de NaCl (Jiang y col., 2007); que 150mM de NaCl genera una respuesta moderada a estrés salino en *Arabidopsis* (Jiang y Deyholos, 2006), mientras que 250mM disminuye la tasa de germinación en un 40% (Quesada y col., 2002) e inhibe completamente el crecimiento de la raíz principal, causando finalmente la muerte (Jiang y col., 2007).

No obstante los diversos efectos bioquímicos o fisiológicos de cadmio, cobre y sal, *ITRG7* muestra un denominador común ante el tratamiento con estos metales: disminuye sus niveles de transcrito de manera dependiente de la concentración.

4.3. Caracterización de la mutante *itrg7-1*

Se comprobó la mutante obtenida de la colección Salk *itrg7-1*, corroborándose su inserción en el promotor de *ITRG7* y homocigosis. La inserción causa una disminución en los niveles de transcrito en alrededor de un 60% a nivel de planta completa. En hojas tipo silvestre se observó una tenue banda que no está presente en hojas mutantes. Pese a ello, esta inserción en el promotor no implica diferencias en cuanto a las tasas de germinación (Figura 10) o largo de raíz (Figura 11) con aquellas obtenidas en semillas tipo silvestre, tanto en la condición control como ante la presencia de cadmio, cobre o cloruro de sodio, excepto en el largo de raíz a 150mM de NaCl, que discutiremos más adelante. Recordemos que en plantas tipo silvestre *ITRG7* presenta altos niveles de transcrito en semilla y raíz (Figura 4, sección 3.1.4), por lo

que se desprende que una disminución de 60% en la capacidad de generar transcrito no causa, de haber, un fenotipo aberrante, lo que se puede explicar por:

- 1) La reducción en los niveles de transcrito de por si no impacta en la cantidad de proteína y funcionalidad de *ITRG7*.
- 2) *ITRG7* forma parte de una familia de 47 genes tipo nodulina en *Arabidopsis*. Frente a la disminución de transcrito de *ITRG7*, otro gen de la familia podría suplir su función en raíz o semilla.
- 3) Otro gen puede sobrellevar la carencia de niveles adecuados de transcrito de *ITRG7* y producir (o ya estar presente) una proteína de función similar.

En el caso de NaCl, se obtuvo una diferencia significativa ante la presencia de 150mM, donde raíces de plantas mutantes son, en promedio, 24,5mm más largas que en tipo silvestres bajo el mismo tratamiento. En este caso, la carencia de niveles normales de transcrito de *ITRG7* le confirió una “ventaja” a las plantas mutantes ante la presencia de sal, al inhibirse en menor medida el crecimiento de la raíz comparado con plantas tipo silvestre bajo el mismo tratamiento.

En la evaluación del peso fresco (sección 3.4.3) de plantas de 24 días, plantas mutantes *itrg7-1* tienen mayor biomasa que su contraparte tipo silvestre en condiciones control, diferencia que se exagera luego del tratamiento en 50µM de sulfato de cobre. Entonces, por un lado, tenemos que las plantas mutantes tienen mayor biomasa — aunque desconocemos si la diferencia ocurre en un tejido en particular o si está distribuido por igual en toda la planta— y que esta diferencia es mayor luego de tratamientos con 50µM de sulfato de cobre. Esta diferencia puede explicarse por una mayor cantidad de agua al interior de las células, o a que las plantas *itrg7-1* crecen a una tasa mayor.

La diferencia significativa de peso fresco observada en el control y a 50 μ M de cobre desaparece en los otros tratamientos, aunque se ve una tendencia de los promedios a ser mayores en *itr7-1* por sobre el tipo silvestre (Figura 12). En un experimento futuro podría aumentarse el número muestral para dar mayor peso estadístico.

Para discernir si las diferencias observadas con la mutación son significativas para la planta en términos biológicos, habría que realizar estudios fisiológicos y determinar si efectivamente esta mutación le confiere una adecuación biológica en presencia de iones comparado con plantas tipo silvestres.

Por último, se podría revisar la disponibilidad de semillas mutantes en otras zonas de *ITRG7* —como dentro de la secuencia codificante con el fin de tener una mutante pérdida de función— y estudiar los parámetros evaluados en el presente seminario en un contexto carente de *ITRG7*.

4.4. Clonamiento y expresión heteróloga de *ITRG7* en levaduras

Se aisló el ADNc de *ITRG7* y se clonó en vectores de expresión en plantas y levaduras. Los vectores de expresión de *ITRG7* en plantas —transformados en *Agrobacterium tumefaciens*— permitirán su futuro estudio ya sea en *Arabidopsis* u otro modelo vegetal. Son vectores en donde *ITRG7* está bajo el control del promotor 35S, el cual es considerado un promotor eficiente, independiente del tejido en el que se encuentran las células transformantes (Hull y col., 2000), por lo que permitirá evaluar los efectos de la sobreexpresión de *ITRG7*, generando una proteína de fusión a HIS (en el caso del vector pGWB8) ó GFP en el caso de los vectores pGWB5 y pMDC85 —este último con dos secuencias del promotor 35S en tándem— generando proteínas recombinantes con epítopes útiles para estudios de localización celular en plantas, ya

sea mediante fraccionamiento subcelular o microscopía de fluorescencia, o para detección/purificación de proteínas.

Se escogieron los vectores pAG426-ccdB-EGFP y pAG426-ccdB-HA para la expresión de *ITRG7* en levadura. Ambos poseen un promotor de expresión fuerte GPD — del acrónimo en inglés *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, gen cuya expresión comanda de manera natural en levaduras— y generan proteínas de fusión a epitope HA o EGFP, útiles para estudios de localización subcelular y/o detección de proteínas. Se escogieron ambos ya que con EGFP se produce una proteína recombinante del *ITRG7* (360aá) más la no despreciable adición de 237 aminoácidos correspondientes a EGFP, el cual genera una estructura plegada tipo barril β (Arpino y col., 2012). La adición de EGFP podría generar proteínas *ITRG7* mal plegadas, enmascarando su función y/o impidiendo una correcta localización celular (Snapp, 2005). Por ello, se utilizó también la estrategia de generar una proteína recombinante con el epitope HA, de tan solo 27aá de longitud (tres repeticiones de HA en tándem) el cual no interfiere con la actividad o distribución de la proteína recombinante.

La presencia de un transcrito recombinante de *ITRG7* en levaduras, tanto en transformantes HA como EGFP, demuestra el correcto funcionamiento de los vectores escogidos (Figura 17).

Sin embargo, al momento de comprobar a nivel traduccional la presencia de la proteína recombinante *ITRG7* mediante Western Blot, fue imposible detectar una proteína del tamaño esperado, detectándose en cambio una señal de tamaño molecular aparente igual a GFP (Figura 18). Esto podrá explicarse por un eventual corte entre *ITRG7* y EGFP o proteólisis de la proteína recombinante. No obstante, las observaciones realizadas en microscopía de epifluorescencia dan cuenta de que la localización subcelular de la señal GFP en transformantes *ITRG7*-GFP —nombrada

como “cuerpo GFP positivo”— es distinta a aquella señal de GFP observada en las transformantes control GFP. Estas últimas, pese a no poseer inserto, igual expresan una proteína GFP, lo que ha sido reportado previamente para el vector utilizado (Conte y col., 2009), cuya localización es citoplasmática (Roberts y Goldfarb, 1998). Si hubiese un corte entre GFP e ITRG7, se debería observar únicamente la señal fluorescente en el citoplasma de levaduras transformantes ITRG7-GFP, tal como se observa en el control (Figura 19), lo que no ocurre. Ahora bien, en algunos casos es posible ver en levaduras transformantes ITRG7-GFP —además del cuerpo GFP positivo— señal GFP en el citoplasma, lo que podría explicar la aparición de la señal en el Western Blot en estas transformantes y un indicio de corte en un segmento de la población de proteínas ITRG7-GFP, que podría originarse por proteasas que reconocen alguna secuencia aminoacídica en el extremo- carboxilo de ITRG7. No obstante, se realizó una búsqueda informática de proteasas que reconocieran algún sitio de corte en la secuencia de aá que hace de puente entre ITRG7 y GFP, sin encontrar motivo alguno.

Buscando en literatura, se encontró imágenes en levaduras cuya señal se parece bastante a la del cuerpo GFP positivo observado en las transformantes ITRG7-GFP. Estas señales corresponden a agregomas y a gotas lipídicas (Figura 23). La primera de ellas son agregados de proteínas que escapan de la degradación dependiente de proteosoma y son transportadas a una estructura asociada al cuerpo polar del huso denominada agregoma, en donde también se reclutan componentes de la maquinaria ubiquitin-proteosoma y chaperonas. Se ha sugerido un rol como mecanismo de sobrevivencia que podría permitir a las células resistir una acumulación de proteínas anómalas (Wang y col., 2009). Como ITRG7-GFP es una proteína foránea, puede ser que las levaduras, ante la sobreproducción de esta proteína recombinante, active este mecanismo de degradación.

Las gotas lipídicas consisten en una monocapa lipídica que rodea un núcleo hidrofóbico de triacilgliceroles y esteres de esteroleos. Su superficie está rodeada de numerosas proteínas que están, en parte, presentes en la membrana del retículo endoplasmático (Kohlwein y col, 2013), cuya función es la de almacenaje de lípidos neutros, así como almacenaje temporal y/o degradación de proteínas (Murphy y col., 2009). En plantas se clasifican en dos grupos: el primer grupo está basado en oleosina y se encuentran con frecuencia en semillas. El segundo grupo, que aún no está bien caracterizado, no está basado en oleosina y se encuentran en varios tejidos, infrecuentemente en semillas. Ambos son producidos en el retículo endoplasmático (Chapman y col., 2012). Cabe la posibilidad de que ITRG7-GFP, dado su péptido señal, migre desde el retículo hacia gotas lipídicas, ya sea porque la maquinaria de la levadura detecta el péptido señal y lo envía allí, o porque la elimina mediante este mecanismo al ser una proteína de membrana foránea o una mezcla de ambos.

Como proyección se propone el estudio de la colocalización del cuerpo GFP positivo con agresomas y/o gotas lipídicas y su localización subcelular en plantas.

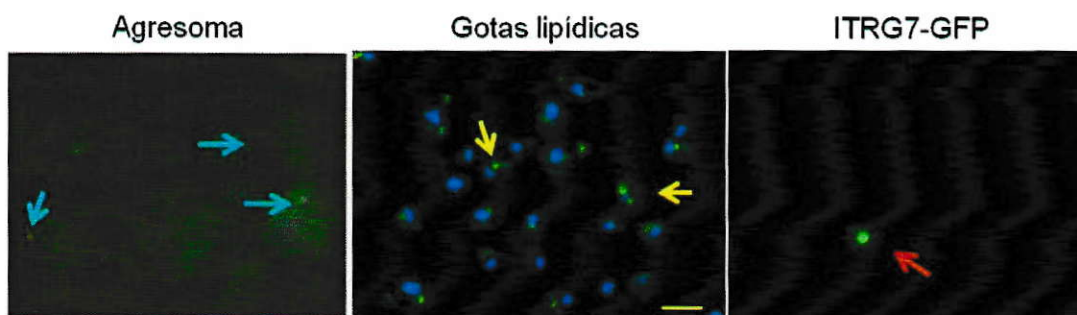


Figura 23. Fotografías de agresomas, gotas lipídicas e ITRG7-GFP en levaduras. En flechas celestes se indica los agresomas (modificado de Wang y col., 2009), en flechas amarillas se señalan algunas gotas lipídicas en verde (modificado de Madeira y col., 2015) y la flecha roja apunta al cuerpo GFP positivo visualizado en transformantes ITRG7-GFP (presente seminario de título)

Por último, los ensayos de crecimiento de levaduras transformantes ITRG7-GFP en medios enriquecidos con NaCl, zinc, cobre, cadmio y cobalto (Figura 21)

muestran que la producción de ITRG7-GFP e ITRG7-HA es perjudicial para el desarrollo de las levaduras en comparación a las levaduras controles HA o GFP. Este efecto es dependiente de la presencia y la concentración de los iones evaluados, ya que en medio control no se observaron diferencias entre levaduras transformantes ITRG7 y levaduras control, descartando así un rol proteotóxico de las proteínas recombinantes ITRG7 (en medio control) que justifique el uso de agresomas o de las gotas lipídicas antes mencionadas como mecanismos de su eliminación. Quizás ITRG7 tenga un rol en la toxicidad de iones sobre agresoma u gotas lídicas cuando las levaduras son expuestas a ellos, alterando sus funciones de eliminación de proteínas mal plegadas o de almacenamiento de lípidos, aumentando la proteotoxicidad y/o dañando el metabolismo de lípidos necesarios para un correcto funcionamiento celular. A futuro se podría evaluar si la proteína ITRG7 posee actividad transportadora de iones mediante experimentos electrofisiológicos utilizando oocitos de *Xenopus*.

A modo de resumen, si consideramos los siguientes hechos:

- que en *Arabidopsis* los transcritos de *ITRG7* disminuyen en presencia de iones
- que una mutante con cerca de un 60% menos de transcrito de *ITRG7* tiene mayor peso en cobre y una raíz más larga en sal
- y que su sobreexpresión en levaduras causa menor tolerancia en medios enriquecidos con iones

Es factible postular que ITRG7 tiene relación con iones, y que su presencia ante este tipo de estrés es perjudicial, lo que explicaría la disminución en sus niveles de transcrito en plantas tipo silvestre, el mayor peso y crecimiento de raíz antes puntualizado en una mutante pérdida de función y la menor tolerancia a iones en levaduras transformadas y que expresan heterológicamente este gen.

Finalmente no se cumple la hipótesis que planteamos inicialmente, ya que la evidencia apunta a que ITRG7 otorga menor tolerancia a estrés iónico. Sin embargo, se dan por cumplidos a cabalidad los objetivos planteados.

5. CONCLUSIONES

- La proteína ITRG7 presenta diez dominios transmembrana y un péptido señal de acuerdo a inferencias electrónicas, lo que le otorga una distribución particular al interior de las células. En levaduras la proteína de fusión ITRG7-GFP se localiza en un compartimiento intracelular de identidad desconocida.
- Ante tratamientos con CdCl₂, CuSO₄ y NaCl los niveles de transcrito de *ITRG7* disminuyen de manera dependiente de la concentración. La mutante insercional homocigota *itrg7-1* presenta una tasa de germinación de igual a la de semillas tipo silvestre y es afectada por tratamientos con cadmio, cobre o sal de manera similar. Posee mayor peso fresco que plantas tipo silvestre y mayor largo de raíz que plantas tipo silvestre luego de tratamientos con 150mM de NaCl.
- Se logró clonar *ITRG7* en vectores de expresión en plantas pGWB8, pGWB5 y pMDC85 para ser utilizados a futuro en la transformación de organismos vegetales con *ITRG7*. Además, se obtuvo vectores de expresión de *ITRG7* en levadura que generan la acumulación de proteínas ITRG7-HA e ITRG7-GFP. La expresión de proteínas recombinantes ITRG7-GFP e ITRG7-HA no es perjudicial para las levaduras, en condiciones sin enriquecimiento de iones. Sin embargo, éstas poseen menor tolerancia a estrés iónico que sus contrapartes transformantes GFP y HA.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B.**, Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (Eds). Studying gene expression and function. Molecular biology of the cell. 4th ed, USA. Garland Science, 2002. [en línea] < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26818/>> [consulta: 01 octubre 2012]
- Alonso, J.M.**, Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Science. 301(5633):65-7.
- Andersen, C.**, Ledet-Jensen, J. and Orntoft, T. (2004). Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization —applied to bladder— and colon-cancer data-sets. Cancer Research. 64:5245-5250.
- Arrivault, S.**, Senger, T. and Kramer, U. (2006). The Arabidopsis metal tolerance protein AtMP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. Plant J. 46:861-879.
- Arpino, J.**, Rizkallah, P. and Jones, D. (2012). Crystal structure of enhanced green fluorescent protein to 1.35Å resolution reveals alternative conformations for Glu222. PLoS ONE 7(10):e47132.
- Bannai, H.**, Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K. and Miyano, S. (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. Bioinformatics. 18(2):298-305.
- Bendtsen, J. D.**, Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved Prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol. 340(4):783-95.
- Briggs, G.**, Osmont, K., Shindo, C., Sibout, R. and Hardtke, C. (2006). Unequal genetic redundancies in Arabidopsis – a neglected phenomenon?. Trends in Plant Sci. 11(10):492-499.
- Busov, V.**, Johannes, E., Ross, W., Sederoff, R., Steven, S., Lanz-Garcia, C. and Goldfarb, B. (2004). An auxin-inducible gene from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) is differentially expressed in mature and juvenile-phase shoots and encodes a putative transmembrane protein. Planta. 218:916-927.
- Chapman, K.**, Dyer, J. and Mullen, R. (2012). Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. Thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. J. Lipid. Res. 53:215-226.
- Cobbett, C.** and Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu RevPlant Biol 53:159-82.
- Conde, A.**, Chaves, M. and Gerós, H. (2011). Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. Plant cell physiol. 52(9):1583-1602.
- Conte, S.**, Stevenson, D., Furner, I. and Lloyd, A. (2009). Multiple antibiotic resistance in Arabidopsis is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. Plant Phys. 151:559-573.

- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. and Scheible, W. R. (2005).** Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139:5-17.
- Durand-Dastes, F. and Haghe, J.** Irrigación. Hypergeo. [en línea] <<http://www.hypergeo.eu/spip.php?article502#>> [consulta: 01 septiembre 2012]
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M.L. (1996).** A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (93):5624-5628.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. (2000).** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* 300(4):1005-16.
- Farazi, T., Waksman, G. and Gordon, J. (2001).** The biology and enzymology of protein N-Myristoylation. *J. Biol Chem* 276(3):39501-39504.
- Gamas, P., de Carvalho, F., Lescure, N. and Cullimore, J. (1996).** Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *MPMI.* 9(4):233-242.
- Gibeaut, D.M., Hulett, J., Cramer, G.R. and Seemann, J.R. (1997).** Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol.* 115(2):317-9.
- Gomi, M., Sonoyama, M., and Mitaku, S. (2004).** High performance system for signal peptide prediction: SOSUisignal. *Chem-Bio Info. J.* (4):142-147.
- Hall, J.L. (2002).** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53(366):1-11.
- Haydon, M. and Cobbett, C. (2007).** Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 174:499-506.
- Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Munch, R. and Jahn, D. (2004).** PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res.* 32:W375-9.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998).** SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* 14(4):378-9.
- Hirzel, J., Walter, I. y Matus, I. (2015).** Estudio prospectivo de los principales metales pesados de suelos agrícolas cultivados con trigo candeal y maíz en diferentes zonas de Chile. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica.* Vol. 20:12-18.
- Hull, R., Covey, S. and Dale, P. (2000).** Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. *Microb. Ecol. Health. Dis.* 12:1-5.
- INIA (1986).** Contaminación ambiental en el valle de Aconcagua, V Región. Informe Final. Proyecto FIA 72/81.
- INIA (1990).** Fuentes de contaminación con residuos de plaguicidas organoclorados y metales pesados en sectores agrícolas, regiones IV a XI. Informe Final. Proyecto FIA 1/86.
- Jayant, J., Bu, Q., Chen, F. and Huq, E. (2012).** Casein kinase II α subunits affect multiple developmental and stress-responsive pathways in *Arabidopsis*. *Plant J.* 69:343-354.
- Jiang, Y. and Deyholos, M. (2006).** Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Bio.* DOI: 10.1186/1471-2229-5-25.

- Jiang, Y.,** Yang, B., Harris, N. and Deyholos, M. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *J. Exp. Bot.* 58(13):3591-3607.
- Juárez, M.,** Sánchez, J. y Sánchez, A. Salinidad y suelos salinos. *En: Química del suelo y medio ambiente.* 1era ed. España. Publicaciones Universidad de Alicante, 2006a. pp 589-631.
- Juárez, M.,** Sánchez, J. y Sánchez, A. Contaminación por metales pesados. *En: Química del suelo y medio ambiente.* 1era ed. España. Publicaciones Universidad de Alicante, 2006b. pp 677-721.
- Kanhonou, R.,** Serrano R. and Palau, R.R. (2001). A catalytic subunit of the sugar beet protein kinase CK2 is induced by salt stress and increases NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.* 47(5):571-9.
- Kall, L.,** Krogh, J.L. and Sonnhammer, E.L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol.* 338(5):1027-36.
- Kochian, L.** Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport, and utilization. *In: Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. L. (Eds.). Molecular biology and biochemistry of plants.* 1st ed, USA. John Wiley & Sons Ltd., 2001. pp. 1204-1247.
- Kohlwein, S.,** Veenhuis, M. and van der Klei, I. (2013). Lipid droplets and peroxisomes: key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat-store'em up or burn'em down. *Genetics.* 193(1):1-50.
- Krogh, A.,** Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 305(3):567-80.
- Ladwig, F.,** Stahl, M., Ludewig, U., Hirner, A., Hammes, U., Stadler, R., Harter, K. and Koch, W. (2012). *Siliques are red1* from Arabidopsis acts as a bidirectional amino acid transporter that is crucial for the amino acid homeostasis of siliques. *Plant Physiol.* 158:1643-1655.
- Lequeux, H.,** Hermans, C., Lutts, S. and Verbruggen, N. (2010). Response to copper excess in Arabidopsis thaliana: impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant. Physiol. Biochem.* 48(8):673-682.
- Lewis, S.,** Handy, R. D., Cordi, B., Billingham, Z. and Depledge, M. H. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology.* 8(5):351-368.
- Lynch, J.** and St.Clair, S. B. (2004). Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. *Field Crops Research.* 90:101-115.
- Madeira, J.,** Masuda, C., Maya-Monteiro, C., Matos, G., Montero-Lomeli, M. and Bozaquel-Morais, B. (2015). TORC1 inhibition induces lipid droplet replenishment in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 35(4):737-46.
- Marschner, H.** (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2nd Ed., Academic Press, London.
- Martínez-Peñalver, A.,** Graña, E., Reigosa, M. and Sánchez-Moreiras, A. (2012). The aerial response of Arabidopsis thaliana to cadmium- and copper-induced stress. *Env. Exp. Bot.* 78:1-9.
- Maurer-Stroh, S.,** Eisenhaber, B. and Eisenhaber, F. (2002). N-terminal *N-myristoylation* of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences. *J. Mol. Bio.* 317(4):523-540.

- Meinke, D.** and Koornneef, M. (1997). Community standards for Arabidopsis genetics. *Plant J.* 12(2):247-53.
- Moreno, I.,** Norambuena, L., Maturana, D., Toro, M., Vergara, C., Orellana, A., Zurita-Silva, A. and Ordenes, V. (2008), AtHMA1 is a Thapsigargin-sensitive Ca^{2+} /heavy metal-pump. *J. Biol. Chem.* 283(15):9633-9641.
- Munnik, T.** and Testerink, C. (2009). Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". *J. Lipid Res.* April S260-65.
- Munns, R.** The impact of salinity stress. *Plant stress.* [en línea] <http://www.plantstress.com/articles/salinity_i/salinity_i.htm> [consulta: 01 septiembre 2012]
- Munns, R.** and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Biol.* 59:651-81.
- Murphy, S.,** Martin, S. and Parton, R. (2009). Lipid droplet-organelle interactions: sharing the fats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791:441-447.
- Norvell, W.,** Wu., J., Hopkins, D. and Welch, R. (2000). Association of cadmium in durum wheat grain with soil chloride and chelate-extractable soil cadmium. *Soil Sci Soc Am J.* 64:2162-2167.
- Pence, N.,** Larsen, P., Ebbs, S., Letham, D., Lasat, M., Garvin, D., Eide, D. and Kochian, L. (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:4956-4960.
- Perfus-Barbeoch, L.,** Leonhardt, N., Vavasseur, A. and Forestier, C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* 32:539-548.
- Prelich, G.** (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics.* 190(3):841-854.
- Quesada, V.,** García-Martínez, S., Piqueras, P., Rosa, M. and Micol, J. (2002). Genetic architecture of NaCl tolerance in Arabidopsis. *Plant Phys.* 130:951-963.
- Ranocha, P.,** Denance, N., Vanholme, R., Freyder, A., Martínez, Y., Hoffmann, L., Kohler, L., Pouzet, C., Renou, J.P., Sundber, B., Boerjan, W. and Goffner, D. (2010). Walls are thin 1 (WAT1), an Arabidopsis homolog of *Medicago truncatula* NODULIN21, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers. *Plant J.* 63:469-483.
- Ranocha, P.,** Dima., O., Nagy, R., Felten, J., Corratge-Fallie, C., Novak, O., Morrel, K., Lacombe, B., Martínez, Y., Pfrunder, S., Jin, X., Renou, J.P., Thibaud, J.B., Ljung, K., Fischer, U., Martinoia, E., Boerjan, W. and Goffner, D. (2013). Arabidopsis WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nat. Comm.* 4:2625.
- Roberts, P.** and Goldfarb, D. *In vivo* nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Berrios, M. (Ed.). *Methods in cell biology* Vol. 53: Nuclear structure and function. 1st ed, USA. Academic Press, 1998. pp. 545-555.
- Romanos, M.,** Scorer, C. and Clare, J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8:423-488.
- Root, R.,** Miller, R. and Koeppel, D. (1975). Uptake of cadmium —its toxicity, and effect on the iron ratio in hydroponically grow corn. *J. Environ. Qual.* 4:468-472.
- Ruijter, J. M.,** Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. and Moorman, A. F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analyses of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37:6.

- Schiavon, M.**, Zhang, L., Abdel-Ghany, S., Pilon, M., Malagoli, M. y Pilon-Smits, E. (2007). Variation in copper tolerance in *Arabidopsis thaliana* accesions Columbia, Landsberg *erecta* and Wassilewskija. *Phys. Plant.* 129:342-350.
- Schmid, M.**, Davison, T., Henz, S., Pape, U., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D. and Lohmann, J. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37(5):501-6.
- Shabala, S.** and Cuin, T. A. Osmoregulation versus osmoprotection: re-evaluating the role of compatible solutes. In: da Silva, T. (Ed.). *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: Advances and topical issues*. 1st ed, USA. Global Science Books Ltd., 2006. pp. 405-416.
- Sierra, C.** (2008). Salinidad de los suelos del norte chico. *Revista Tierra Adentro, INIA*. [en línea] <<http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR25770.pdf>> [consulta: 20 mayo 2016]
- Sierra, C.**, Céspedes, R. y Osorio, A. (2008). Caracterización de la salinidad de los suelos y aguas del valle del río Copiapó. *Boletín INIA N°70*. [en línea] <<http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR27726.pdf>> [consulta: 20 mayo 2016]
- Skrabaneck, L.**, Campagne, F., and Weinstein, H. (2003). Building protein diagrams on the web with the residue-based diagram editor RbDe. *Nucleic Acids Research.* 31(13):3856-3858.
- Small, I.**, Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C. (2004). Predotar. A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics.* (6):1581-90.
- Snapp, E.** (2005). Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. *Curr. Protoc. Cell Biol.* CHAPTER, Unit-21.4.
- Society of the Chemical Industry** (1980). Site investigation and materials problems. *Proceedings of the Conference on Reclamation of Contaminated Land*. Eastourne, UK, October 1979. (The "Kelly" Indices).
- Stockle, C.** Environmental impact of irrigation: a review. *Water Research*. Washington State University, USA. pp. 121-129.
- Tuomi, J.M.**, Voorbraak, F., Jones, D.L. and Ruijter, J.M. (2010). Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *Methods.* 50:4 313-322.
- Van Belleghem, F.**, Cuypers, A., Semane, B., Smeets, K., Vangronsveld, J., d'Haen, J. and Valcke, R. (2007). Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 173:495-508.
- Vert, G.**, Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F. and Curie, C. (2002). IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell.* 14(5):1223-33.
- von Heijne, G.** (1992). Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* (225):487-494.
- Wang, Y.**, Anatoli, M., Zaarur, N., Romanova, N., Chernoff, Y., Costello, C. and Sherman, M. (2009). Abnormal proteins can form aggresome in yeast: aggresome-targeting signals and components of the machinery. *FASEB J.* 23:451-463.
- Ward, J.** (2001). Identification of novel families of membrane proteins from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics.* 17(6):560-563.
- Ward, J.**, Maser, P. and Schroeder, J. (2009). Plant ion channels: gene families, physiology and functional genomics analyses. *Annu. Rev. Physiol.* 71:59-82.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. and Provart, N. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 2(8): e718.

Zhang, H-X. and Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnol.* 19:765-768.

Zhao, F., Guo, S., Zhang, H. and Zhao, Y. (2005). Expression of yeast SOD2 in transgenic results in increased salt tolerance. *Plant Sci.* 216-224.

ANEXO

Tabla Anexo I. Composiciones de mezclas de aminoácidos empleados para la elaboración de medio de crecimiento de levaduras YMM.

Mezcla aminoácidos 1 (0,1 g/L c/u)	Mezcla aminoácidos 2 (0,05 g/L c/u)
Adenina	Ácido aspártico
Arginina	Histidina
Cisteína	Isoleucina
Leucina	Metionina
Lisina	Fenilalanina
Treonina	Prolina
Triptófano	Serina
	Tirosina
	Valina

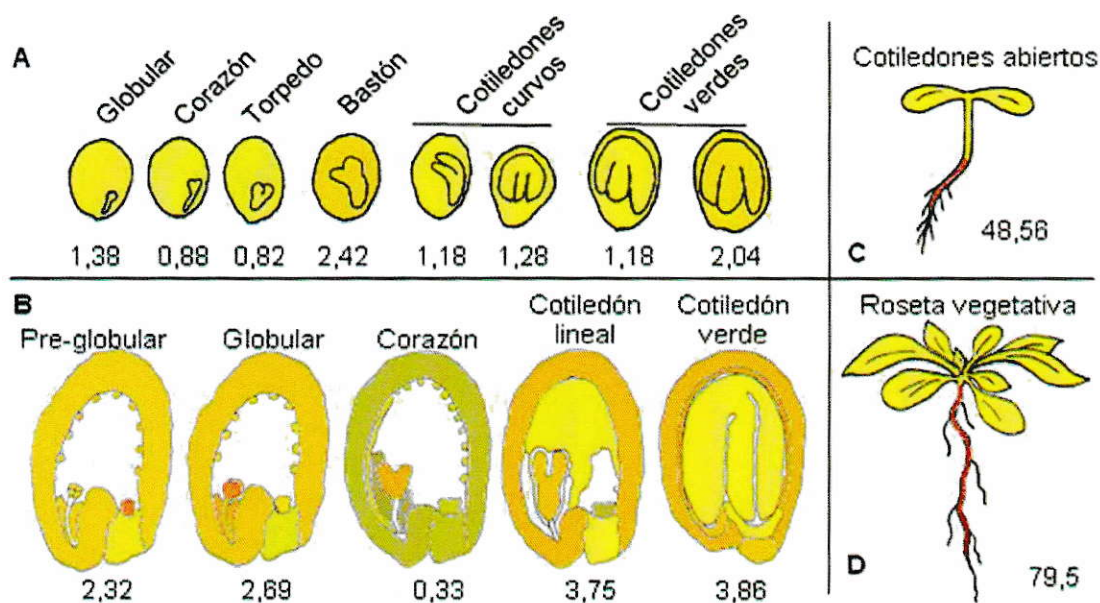


Figura Suplementaria 1. Patrones de expresión de *ITRG7* según interfaz eFP Browser. Los colores rojos o azules indican aumento o disminución en la expresión, respectivamente, al comparar la expresión de *ITRG7* con el gen de referencia *Ubiquitina 10*. Los números indican las veces de cambio en el número de transcrito de *ITRG7* respecto a los transcritos del gen de referencia. A: expresión de *ITRG7* durante el desarrollo de la semilla con datos de microarreglos del año 2005. B: expresión de *ITRG7* durante el desarrollo de la semilla con datos de microarreglos del año 2010, con detalle de las estructuras internas de la semilla, lo que permite visualizar que *ITRG7* presenta un aumento de su expresión en la cubierta. C y D: expresión aumentada de *ITRG7* en la raíz, tanto en el estadio de cotiledones abiertos como en aquél que presenta la roseta. Imagen adaptada de los análisis realizados en la plataforma eFP Browser.

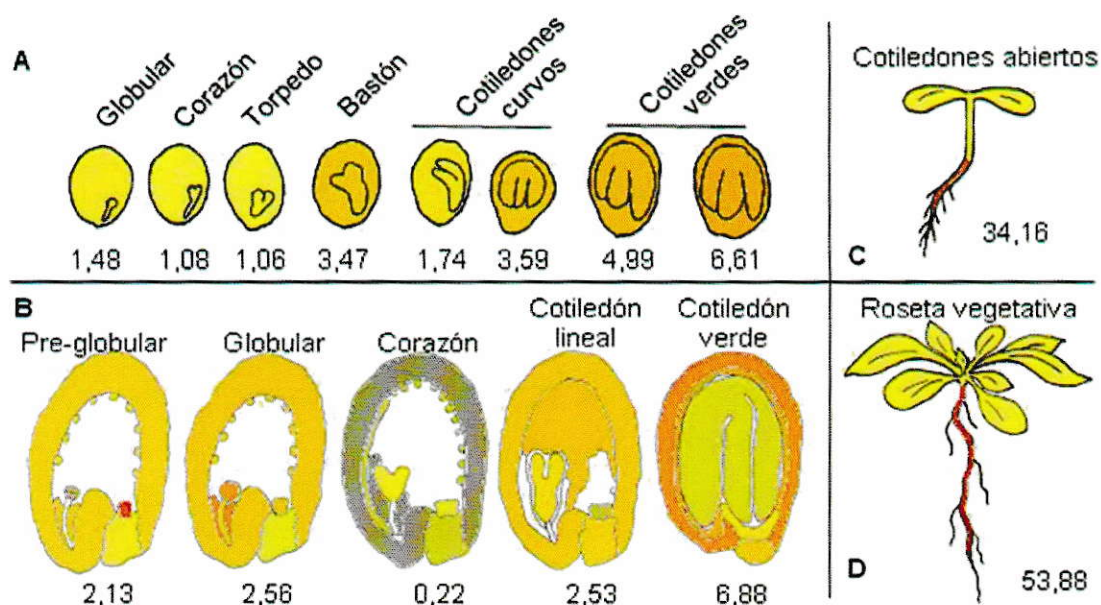


Figura Suplementaria 2. Patrones de expresión de *ITRG7* según interfaz eFP Browser. Los colores rojos o azules indican aumento o disminución en la expresión, respectivamente, al comparar la expresión de *ITRG7* con el gen de referencia **Proteína Fosfatasa 2A**. Los números indican las veces de cambio en el número de transcrito de *ITRG7* respecto a los transcritos del gen de referencia. A: expresión de *ITRG7* durante el desarrollo de la semilla con datos de microarreglos del año 2005. B: expresión de *ITRG7* durante el desarrollo de la semilla con datos de microarreglos del año 2010, con detalle de las estructuras internas de la semilla, lo que permite visualizar que *ITRG7* presenta un aumento de su expresión en la cubierta. C y D: expresión aumentada de *ITRG7* en la raíz, tanto en el estadio de cotiledones abiertos como en aquél que presenta la roseta. Imagen adaptada de los análisis realizados en la plataforma eFP Browser.

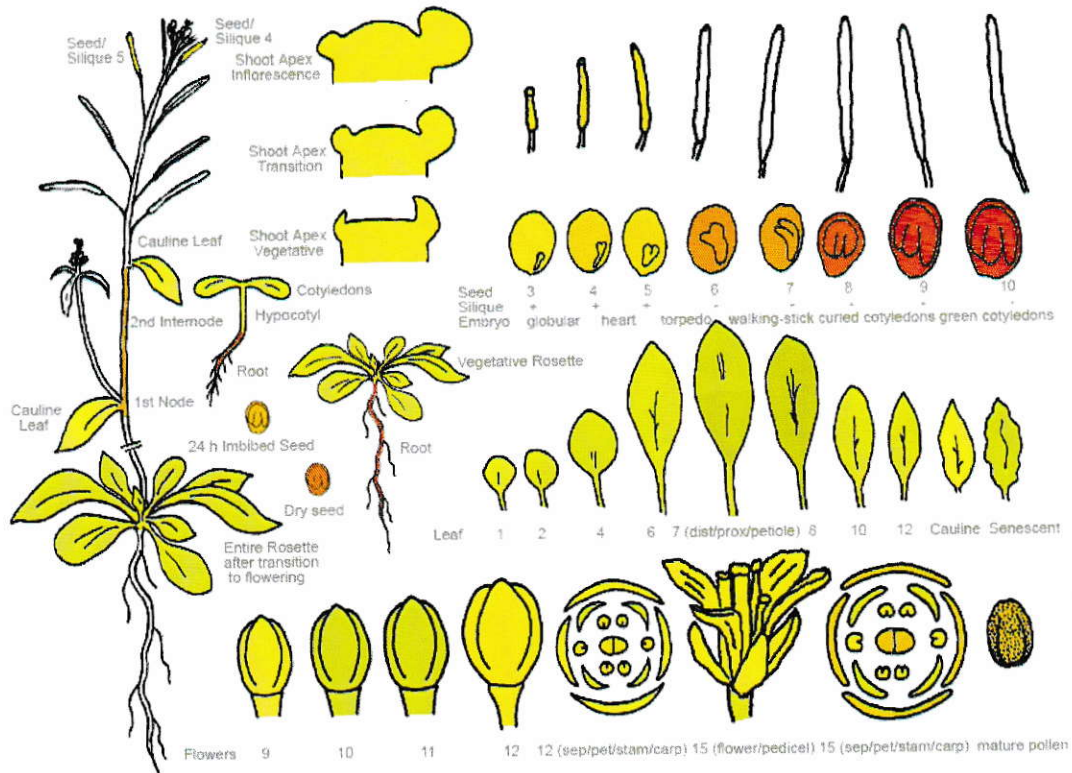


Figura Suplementaria 3. Patrones de expresión de *ITRG7* según interfaz eFP Browser durante el desarrollo de *A. thaliana*. Los colores hacia el rojo indican un aumento del nivel de transcrito de *ITRG7*, el color amarillo indica que los niveles de transcrito de *ITRG7* son similares a los del gen de referencia *Actina 2* y los colores hacia el azul indican disminución de los transcritos de *ITRG7* respecto del gen de referencia. En este caso es posible observar mayores niveles de transcrito de *ITRG7* durante el desarrollo de la semilla y en las raíces de los estadios cotiledón abierto y roseta vegetativa. Imagen adaptada de los análisis realizados en la plataforma eFP Browser.

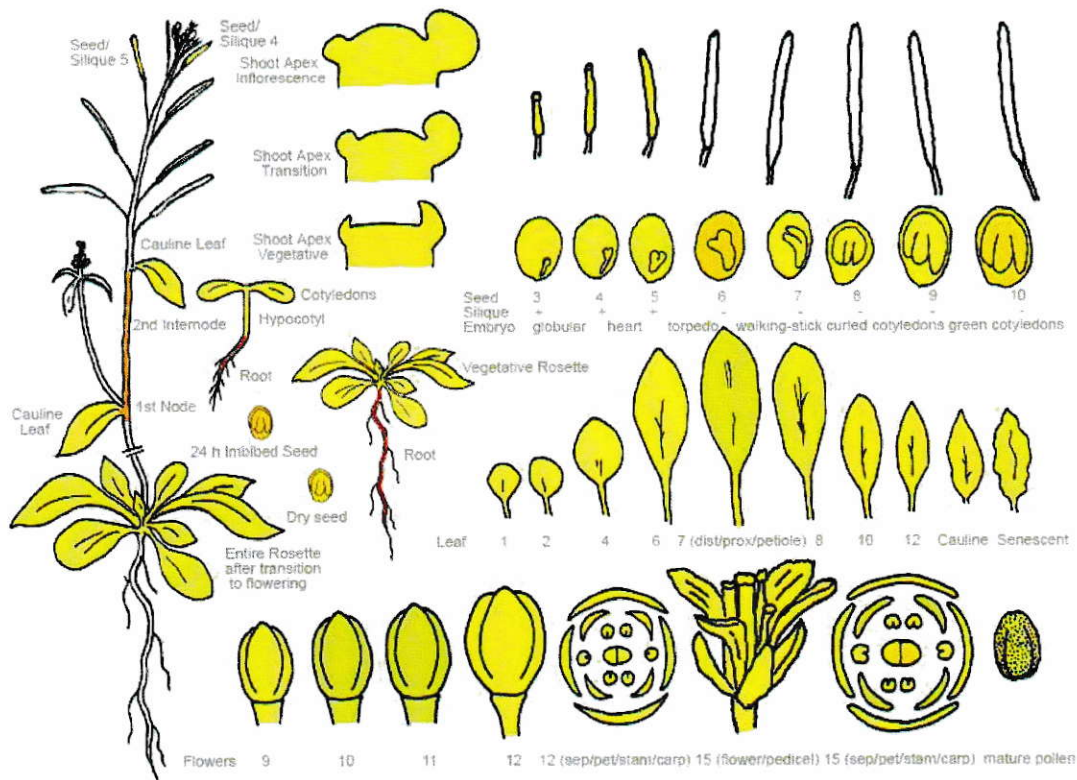


Figura Suplementaria 4. Patrones de expresión de *ITRG7* según interfaz eFP Browser durante el desarrollo de *A. thaliana*. Los colores hacia el rojo indican un aumento del nivel de transcrito de *ITRG7*, el color amarillo indica que los niveles de transcrito de *ITRG7* son similares a los del gen de referencia **Ubiquitina 10** y los colores hacia el azul indican disminución de los transcritos de *ITRG7* respecto del gen de referencia. En este caso es posible observar mayores niveles de transcrito de *ITRG7* en las raíces de los estadios cotiledón abierto y roseta vegetativa. Imagen adaptada de los análisis realizados en la plataforma eFP Browser.

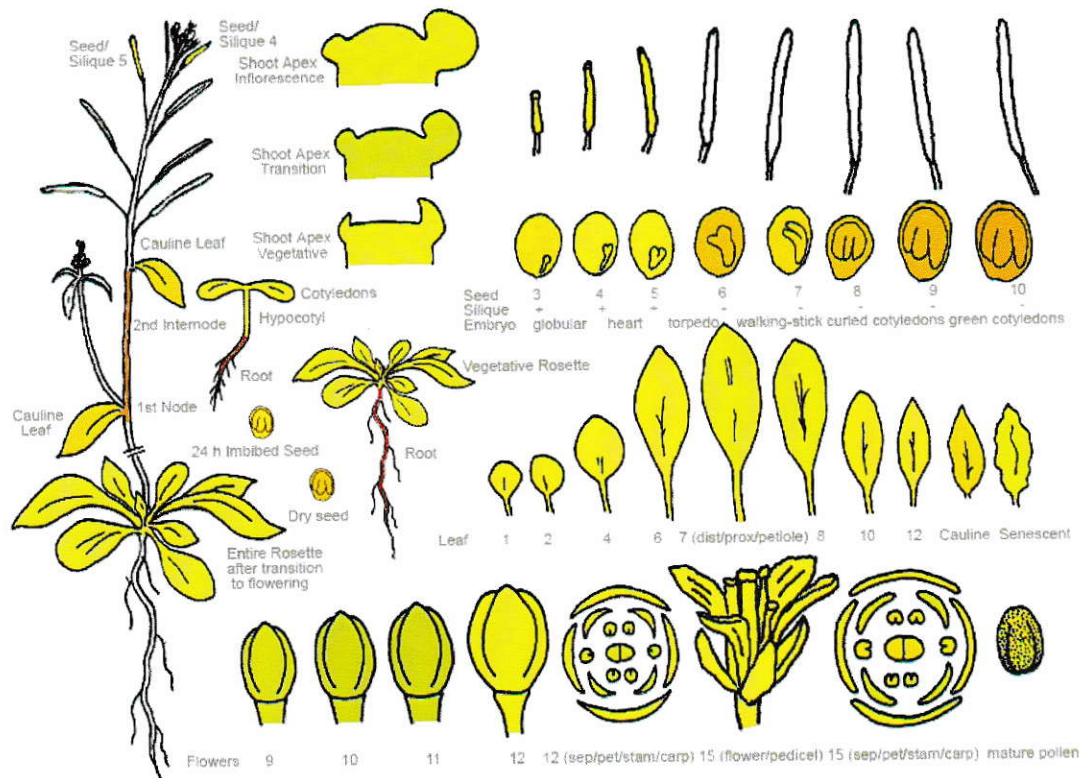


Figura Suplementaria 5. Patrones de expresión de *ITRG7* según interfaz eFP Browser durante el desarrollo de *A. thaliana*. Los colores hacia el rojo indican un aumento del nivel de transcrito de *ITRG7*, el color amarillo indica que los niveles de transcrito de *ITRG7* son similares a los del gen de referencia **Proteína Fosfatasa 2A** y los colores hacia el azul indican disminución de los transcritos de *ITRG7* respecto del gen de referencia. En este caso es posible observar mayores niveles de transcrito de *ITRG7* durante el desarrollo de la semilla y en las raíces de los estadios cotiledón abierto y roseta vegetativa (tonos rojos). Imagen adaptada de los análisis realizados en la plataforma eFP Browser.



Figura Suplementaria 6. Cambios en la expresión de *ITRG7* luego de diversos tratamientos de estrés abiótico (gen de referencia **Actina 2**). Destacables son los cambios bajo tratamientos salinos (150mM NaCl) y osmóticos (300mM Manitol), en donde se observa disminución de la expresión en raíces (color azul) e inducción de la expresión en la parte aérea de la planta (color rojo). Se observan también cambios significativos de la expresión en tratamientos con frío y calor. No se observan cambios significativos en los tratamientos de: sequía, genotóxicos, oxidativos, con rayos UV-B y heridas. Imagen adaptada de los análisis realizados en la plataforma eFP Browser.



Figura Suplementaria 7. Cambios en la expresión de *ITRG7* luego de diversos tratamientos (gen de referencia *Ubiquitina 10*). Destacables son los cambios bajo tratamientos salinos (150mM NaCl) y osmóticos (300mM Manitol), en donde se observa disminución de la expresión en raíces (color azul) e inducción de la expresión en la parte aérea de la planta (color rojo). Se observan también cambios significativos de la expresión en tratamientos con frío y calor. No se observan cambios significativos en los tratamientos de: sequía, genotóxicos, oxidativos, con rayos UV-B y heridas. Imagen adaptada de los análisis realizados en la plataforma eFP Browser.



Figura Suplementaria 8. Cambios en la expresión de *ITRG7* luego de diversos tratamientos (gen de referencia **Proteína Fosfatasa 2A**). Destacables son los cambios bajo tratamientos salinos (150mM NaCl) y osmóticos (300mM Manitol), en donde se observa disminución de la expresión en raíces (color azul) e inducción de la expresión en la parte aérea de la planta (color rojo). Se observan también cambios significativos de la expresión en tratamientos con frío y calor. No se observan cambios significativos en los tratamientos de: sequía, genotóxicos, oxidativos, con rayos UV-B y heridas. Imagen adaptada de los análisis realizados en la plataforma eFP Browser.

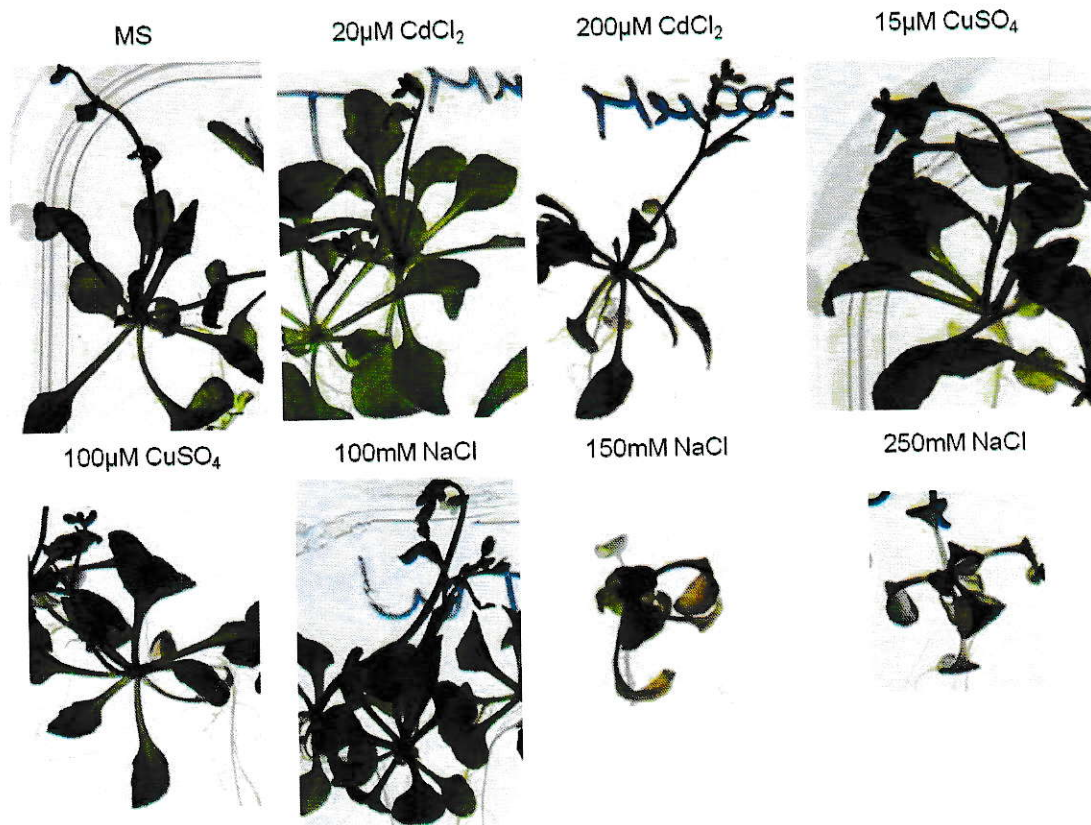


Figura Suplementaria 9. Imágenes representativas que muestran el fenotipo de plantas tipo silvestres de 14 días que fueron trasplantadas por 10 días a medios con metales o sal, según se indica en la leyenda de la parte superior. A estas plantas se les realizó extracción de ARN para síntesis de ADNc y realizar el posterior RT-qPCR del numeral 3.2.1 (Figura 6). MS = medio control. Imágenes no están a escala. Se observa clorosis en: 200µM de CdCl₂, 15 y 100µM de CuSO₄, síntoma que ha sido reportado previamente cuando *Arabidopsis* son expuestas a cadmio y cobre (Van Bellegem y cols., 2007). Luego del tratamiento con NaCl se observa una restricción del crecimiento y desarrollo conforme aumenta la concentración, así como un incremento de clorosis, síntomas que se han descrito previamente en plantas tratadas con NaCl (Munns y Tester, 2008).

Tabla Anexo II. Resultado del análisis estadístico sobre cambios en los niveles de transcrito de *ITRG7* en plantas tipo silvestre tratadas con distintos iones y concentraciones. Se realizó un análisis de varianza de una vía, utilizando Tukey como prueba posterior. Leyenda: ns = no significativo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$.

Condiciones a comparar	¿Significativo? ($P < 0.05$)	Resumen
20 μ M CdCl ₂ vs 200 μ M CdCl ₂	Si	***
20 μ M CdCl ₂ vs 15 μ M CuSO ₄	Si	***
20 μ M CdCl ₂ vs 100 μ M CuSO ₄	Si	***
20 μ M CdCl ₂ vs 100mM NaCl	No	ns
20 μ M CdCl ₂ vs 150mM NaCl	No	ns
20 μ M CdCl ₂ vs 250mM NaCl	Si	***
20 μ M CdCl ₂ vs Control	No	ns
200 μ M CdCl ₂ vs 15 μ M CuSO ₄	No	ns
200 μ M CdCl ₂ vs 100 μ M CuSO ₄	No	ns
200 μ M CdCl ₂ vs 100mM NaCl	Si	*
200 μ M CdCl ₂ vs 150mM NaCl	Si	**
200 μ M CdCl ₂ vs 250mM NaCl	No	ns
200 μ M CdCl ₂ vs Control	Si	***
15 μ M CuSO ₄ vs 100 μ M CuSO ₄	No	ns
15 μ M CuSO ₄ vs 100mM NaCl	No	ns
15 μ M CuSO ₄ vs 150mM NaCl	No	ns
15 μ M CuSO ₄ vs 250mM NaCl	No	ns
15 μ M CuSO ₄ vs Control	Si	**
100 μ M CuSO ₄ vs 100mM NaCl	No	ns
100 μ M CuSO ₄ vs 150mM NaCl	No	ns
100 μ M CuSO ₄ vs 250mM NaCl	No	ns
100 μ M CuSO ₄ vs Control	Si	***
100mM NaCl vs 150mM NaCl	No	ns
100mM NaCl vs 250mM NaCl	Si	*
100mM NaCl vs Control	No	ns
150mM NaCl vs 250mM NaCl	Si	*
150mM NaCl vs Control	No	ns
250mM NaCl vs Control	Si	***

Tabla Anexo III. Resultado del análisis estadístico sobre cambios en la tasa de germinación de plantas tipo silvestres y mutantes con distintos iones y concentraciones. Se realizó un análisis de varianza de una vía, utilizando Tukey como prueba posterior. Leyenda: ns = no significativo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$.

Condiciones a comparar	Tipo silvestre		mutante <i>itrq7-1</i>	
	¿Significativo? ($P < 0.05$)	Resumen	¿Significativo? ($P < 0.05$)	Resumen
Control vs 50µM CdCl ₂	Si	**	No	ns
Control vs 100µM CdCl ₂	No	ns	No	ns
Control vs 50µM CuSO ₄	No	ns	No	ns
Control vs 100µM CuSO ₄	Si	*	No	ns
Control vs 100mM NaCl	No	ns	No	ns
Control vs 150mM NaCl	Si	***	No	ns
50µM CdCl ₂ vs 100µM CdCl ₂	No	ns	No	ns
50µM CdCl ₂ vs 50µM CuSO ₄	No	ns	No	ns
50µM CdCl ₂ vs 100µM CuSO ₄	No	ns	No	ns
50µM CdCl ₂ vs 100mM NaCl	No	ns	No	ns
50µM CdCl ₂ vs 150mM NaCl	No	ns	No	ns
100µM CdCl ₂ vs 50µM CuSO ₄	No	ns	No	ns
100µM CdCl ₂ vs 100µM CuSO ₄	No	ns	No	ns
100µM CdCl ₂ vs 100mM NaCl	No	ns	No	ns
100µM CdCl ₂ vs 150mM NaCl	Si	**	No	ns
50µM CuSO ₄ vs 100µM CuSO ₄	No	ns	No	ns
50µM CuSO ₄ vs 100mM NaCl	No	ns	No	ns
50µM CuSO ₄ vs 150mM NaCl	No	ns	No	ns
100µM CuSO ₄ vs 100mM NaCl	No	ns	No	ns
100µM CuSO ₄ vs 150mM NaCl	No	ns	No	ns
100mM NaCl vs 150mM NaCl	Si	**	No	ns

Tabla Anexo IV. Resultado del análisis estadístico sobre cambios en el largo de raíz de plantas tipo silvestres y mutantes con distintos iones y concentraciones. Se realizó un análisis de varianza de una vía, utilizando Tukey como prueba posterior. Leyenda: ns = no significativo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$.

Condiciones a comparar	Tipo silvestre		mutante <i>itrq7-1</i>	
	¿Significativo? ($P < 0.05$)	Resumen	¿Significativo? ($P < 0.05$)	Resumen
Control vs 50 μ M CdCl ₂	Si	**	Si	***
Control vs 75 μ M CdCl ₂	Si	***	Si	***
Control vs 50 μ M CuSO ₄	No	ns	Si	***
Control vs 100 μ M CuSO ₄	Si	***	Si	***
Control vs 100mM NaCl	No	ns	Si	**
Control vs 150mM NaCl	Si	***	Si	***
50 μ M CdCl ₂ vs 75 μ M CdCl ₂	Si	**	Si	***
50 μ M CdCl ₂ vs 50 μ M CuSO ₄	No	ns	No	ns
50 μ M CdCl ₂ vs 100 μ M CuSO ₄	Si	**	Si	***
50 μ M CdCl ₂ vs 100mM NaCl	No	ns	No	ns
50 μ M CdCl ₂ vs 150mM NaCl	No	ns	Si	*
75 μ M CdCl ₂ vs 50 μ M CuSO ₄	Si	***	Si	***
75 μ M CdCl ₂ vs 100 μ M CuSO ₄	No	ns	No	ns
75 μ M CdCl ₂ vs 100mM NaCl	Si	***	Si	***
75 μ M CdCl ₂ vs 150mM NaCl	No	ns	No	ns
50 μ M CuSO ₄ vs 100 μ M CuSO ₄	Si	***	Si	***
50 μ M CuSO ₄ vs 100mM NaCl	No	ns	No	ns
50 μ M CuSO ₄ vs 150mM NaCl	Si	***	Si	***
100 μ M CuSO ₄ vs 100mM NaCl	Si	***	Si	***
100 μ M CuSO ₄ vs 150mM NaCl	No	ns	No	ns
100mM NaCl vs 150mM NaCl	Si	**	Si	***

Tabla Anexo V. Resultado del análisis estadístico sobre cambios en el peso fresco de plantas tipo silvestres y mutantes con distintos iones y concentraciones. Se realizó un análisis de varianza de una vía, utilizando Tukey como prueba posterior. Leyenda: ns = no significativo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$.

Condiciones a comparar	Tipo silvestre		mutante <i>itrG7-1</i>	
	¿Significativo? ($P < 0.05$)	Resumen	¿Significativo? ($P < 0.05$)	Resumen
Control vs 20uM CdCl ₂	No	ns	No	ns
Control vs 75uM CdCl ₂	No	ns	No	ns
Control vs 200uM CdCl ₂	Si	***	Si	**
Control vs 15uM CuSO ₂	No	ns	No	ns
Control vs 50uM CuSO ₄	No	ns	No	ns
Control vs 100uM CuSO ₄	Si	***	Si	*
Control vs 100mM NaCl	No	ns	No	ns
Control vs 150mM NaCl	No	ns	No	ns
Control vs 250mM NaCl	Si	***	Si	***
20uM CdCl ₂ vs 75uM CdCl ₂	Si	**	No	ns
20uM CdCl ₂ vs 200uM CdCl ₂	Si	***	Si	***
20uM CdCl ₂ vs 15uM CuSO ₂	No	ns	No	ns
20uM CdCl ₂ vs 50uM CuSO ₄	No	ns	No	ns
20uM CdCl ₂ vs 100uM CuSO ₄	Si	***	Si	**
20uM CdCl ₂ vs 100mM NaCl	No	ns	No	ns
20uM CdCl ₂ vs 150mM NaCl	Si	*	No	ns
20uM CdCl ₂ vs 250mM NaCl	Si	***	Si	***
75uM CdCl ₂ vs 200uM CdCl ₂	No	ns	No	ns
75uM CdCl ₂ vs 15uM CuSO ₂	No	ns	No	ns
75uM CdCl ₂ vs 50uM CuSO ₄	No	ns	Si	*
75uM CdCl ₂ vs 100uM CuSO ₄	No	ns	No	ns
75uM CdCl ₂ vs 100mM NaCl	Si	***	No	ns
75uM CdCl ₂ vs 150mM NaCl	No	ns	No	ns
75uM CdCl ₂ vs 250mM NaCl	Si	*	No	ns
200uM CdCl ₂ vs 15uM CuSO ₂	Si	**	No	ns
200uM CdCl ₂ vs 50uM CuSO ₄	Si	***	Si	***
200uM CdCl ₂ vs 100uM CuSO ₄	No	ns	No	ns
200uM CdCl ₂ vs 100mM NaCl	Si	***	Si	**
200uM CdCl ₂ vs 150mM NaCl	Si	**	Si	**
200uM CdCl ₂ vs 250mM NaCl	No	ns	No	ns
15uM CuSO ₂ vs 50uM CuSO ₄	No	ns	Si	*
15uM CuSO ₂ vs 100uM CuSO ₄	Si	**	No	ns
15uM CuSO ₂ vs 100mM NaCl	Si	*	No	ns
15uM CuSO ₂ vs 150mM NaCl	No	ns	No	ns
15uM CuSO ₂ vs 250mM NaCl	Si	***	No	ns
50uM CuSO ₄ vs 100uM CuSO ₄	Si	***	Si	**
50uM CuSO ₄ vs 100mM NaCl	No	ns	No	ns
50uM CuSO ₄ vs 150mM NaCl	No	ns	No	ns
50uM CuSO ₄ vs 250mM NaCl	Si	***	Si	***
100uM CuSO ₄ vs 100mM NaCl	Si	***	Si	*
100uM CuSO ₄ vs 150mM NaCl	Si	*	No	ns
100uM CuSO ₄ vs 250mM NaCl	No	ns	No	ns
100mM NaCl vs 150mM NaCl	Si	**	No	ns
100mM NaCl vs 250mM NaCl	Si	***	Si	**
150mM NaCl vs 250mM NaCl	Si	***	Si	**