

UCH-FC
Biotecnología
M271c
C.I.



ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Construcción y evaluación de vectores para sobre-
expresar la sorbitol deshidrogenasa de tomate (LeSDH)
en plantas”**

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

Patricio Javier Mandujano Moreno

Marzo de 2008,
Santiago de Chile



Director Seminario de Título: **Michael Handford, PhD**

Co director(a): **Dra. Claudia Stange**



“Construcción y evaluación de vectores para sobre-expresar la sorbitol deshidrogenasa de tomate (LeSDH) en plantas”

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

PATRICIO JAVIER MANDUJANO MORENO

Dr. Michael Handford
Director Seminario de Título

Firma manuscrita de Michael Handford en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dra. Claudia Stange

Co directora



Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. Ana Preller Simmons
Presidente Comisión

Firma manuscrita de Ana Preller Simmons en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Corrector

Firma manuscrita de Marcelo Baeza Cancino en tinta azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, julio 2008

BIOGRAFÍA



Todo empezó un 26 de octubre de 1984 en Rancagua. Mi madre, una hermosa joven de grandes ojos verdes y larga cabellera ondulada me trajo a este mundo con un gran esfuerzo; mi castigo: no heredar ninguna de esas características. De ésta etapa de mi vida, no tengo grandes recuerdos, ni siquiera sé donde estude. Lo único que recuerdo es que entré muy pequeño al sistema educacional de este país, a la edad de 2 años estaba en lo que se llama Nivel Medio Menor. Desde entonces hasta ahora no he dejado de estudiar y de escuchar a un profe retándome por hablar y molestar en clases. Así que deben entender lo feliz que estoy al escribir esto. Llegué a Santiago en circunstancias que no valen la pena recordar, ni escribir obviamente, lo importante es que fue



un cambio radical en mi vida, que me hizo crecer, entender y querer lo que la vida nos entrega cada día. Desde este punto podemos encontrar una bifurcación en la historia. Por un lado podemos hablar de mi vida directamente, así como la mejor de las teleseries venezolanas y por otro lado, en un sentido más académico, podemos encontrar la explicación del por qué termine estudiando la carrera de la que me estoy titulando. Como me interesa más el último punto y no quiero entrar en melodramas, comenzaré relatando mis estudios básicos. Estos fueron realizados en un colegio llamado Licarayen, el cual tenía la particularidad de nombrar a los cursos, no por su año ni su letra sino con nombres de volcanes y cosas "raras". El mío correspondía el curso Lonquimay, del que forme parte desde kínder hasta 3ro básico. Si lo pienso bien, no tengo recuerdos dentro de las salas de clases, sino afuera, en los pasillos o el patio, extraño creo yo. Luego, por otras razones que... bueno ya saben, me cambie a otro colegio, llamado Colegio Particular La Concepción. Este nombre no hace alusión a la capital de la región del Bio-Bio, sino a una batalla, de la Guerra del Pacífico, librada en Concepción, una localidad en los andes centrales del Perú. Cuando te repiten las cosas tantas veces te las aprendes, aunque no quieras. En este colegio terminé la enseñanza básica, sin pena ni gloria, aunque con mil amonestaciones.. La enseñanza media la cursé en el Colegio Pedro de Valdivia, como se puede observar, la otra vertiente de mi historia (la melodramática) influye económicamente en la académica, lo cual estuvo...bien. Es triste la comparación, pero en este colegio pude encontrar inspiración, y me di cuenta que, más que profesores, hay grandes personas que te motivan a ser mejor. Cuando pequeño le decía a mi mamá que cuando grande iba a ser científico y un test vocacional en 2do medio lo confirmó. De esta manera entre a estudiar ingeniería en biotecnología molecular, carrera de extenso nombre, que usé para impresionar a más de una mujer. Ajeno a todo lo que esta carrera me pudo entregar, en la universidad de Chile conocí a grandes personas y amigos que fueron los profesores e inspiración para ser un mejor ser humano. Se cerró una etapa y partimos con otra, más incierta que la anterior y con más influencia del lado melodramático de la vida.



AGRADECIMIENTOS

Esta parte es conflictiva, porque uno agradece a los que estuvieron contigo, a tus amigos y familiares, y en la selección de éstos está el problema.

Si tengo que agradecer a alguien lo que soy ahora, mi deber es darles las gracias a todas las personas con las que he tenido algún tipo de contacto en mi vida, sea bueno o malo. Desde el extraño tipo que te da la mano en la micro para pedirte una moneda hasta mi madre. Cada persona que me conoce o me conoció, merece mi agradecimiento. Soy sencillamente lo que he aprendido de mi vida y cada uno de ustedes forma parte de ésta.

Un especial agradecimiento a Michael Handford, mi tutor, quien con su paciencia y joven sabiduría me ayudó a realizar este seminario. Me enseñó las herramientas básicas con las que pude desenvolverme mejor y con más confianza. Gracias también por entender mi torpeza, al romper algunas cosillas en forma accidental en el laboratorio. Son cosas que pasan, a mi más frecuentemente, pero que él pudo entender.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.	v
INDICE DE TABLAS.	viii
INDICE DE FIGURAS.	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.	x
RESUMEN.	xi
ABSTRACT.	xiii
1.-INTRODUCCIÓN.	1
1.1.-El mercado de manzanas chilenas	1
1.2.-Metabolismo de azúcares en manzanas	3
1.3.-Promotores fruto-específicos	8
1.4.-Estrategia desarrollada	10
2.-HIPÓTESIS DE TRABAJO	11
3.- OBJETIVOS	11
3.1.-Objetivo General	11
3.2.-Objetivos Específicos	11
4.-MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1.- Material Biológico.	12
4.1.1.- Crecimiento de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) variedad Ailsa craig.	12
4.1.2.- Obtención de frutos de tomate y durazno para los ensayos de expresión y actividad.	12
4.1.3.- Crecimiento de bacterias <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	13
4.2.- Diseño de partidores específicos con sitios de cortes para las endonucleasas <i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>) y <i>BstEII</i> (<i>Eco91I</i>) para el clonamiento de LeSDH.	13
4.3.- Extracción de RNA total desde hojas de tomate.	14
4.4.- Cuantificación y análisis de calidad e integridad del RNA total en las extracciones realizadas.	16



4.5.- Reacciones de transcripción reversa (RT) para el RNA total de Tomate.	17
4.6.- Amplificación del cDNA de LeSDH.	17
4.7.- Clonamiento de LeSDH en un vector bacteriano.	18
4.7.1.- Purificación desde gel del fragmento amplificado de LeSDH.	18
4.7.2.- Clonamiento de LeSDH por el sistema pGEM®-T Easy.	18
4.7.3.- Transformación de <i>Escherichia coli</i> competentes con el vector pGEM®-T Easy-LeSDH.	19
4.7.4.- Mini-preparaciones de DNA plasmidial para la verificación de colonias bacterianas transformantes.	20
4.8.- Diseño de partidores específicos con sitios de corte para <i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>) y <i>BamHI</i> para la clonación del promotor del gen de la Poligalacturonasa (PG).	20
4.9.- Extracción de DNA genómico desde hojas de tomate.	21
4.10.- Reacción de PCR con el objetivo de amplificar el promotor PG desde DNA genómico.	22
4.11.- Clonamiento del Promotor PG en vector bacteriano.	22
4.12.- Elaboración de cassettes de sobre-expresión de LeSDH en plantas.	23
4.12.1.- Clonación de LeSDH en el vector binario pCambia 1302.	23
4.12.2.- Clonación del promotor PG en el vector binario pCambia 1302.	24
4.12.3.- Clonación del promotor PG en el constructo pCambia-LeSDH (35S-LeSDH).	24
4.13.- Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con los vectores pCambia 1302: PG-GFP, 35S-LeSDH y PG-LeSDH.	25
4.14.- Análisis de expresión de LeSDH y funcionalidad del promotor PG en frutos de duraznos transformados transitoriamente con los vectores elaborados.	26
4.14.1.- Transformación transitoria de frutos de duraznos y tomate con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	26
4.14.2.- Análisis por microscopía de fluorescencia de la expresión de GFP controlado por el promotor PG.	27
4.14.3.- Extracción de RNA total de frutos de durazno (<i>Prunus persica</i> var. nectarina) y análisis de expresión de LeSDH por RT-PCR	27
4.14.4.- Extracción cruda de proteínas desde frutos de duraznos transformados transitoriamente.	29
4.14.5.- Cuantificación de proteínas usando el método de BCA (bicinchoninic acid).	29

4.14.6.- Ensayo de actividad de la enzima sorbitol deshidrogenasa.	30
5.-RESULTADOS.	32
5.1.-Estrategia de clonación.	32
5.2.-Clonación del cDNA de LeSDH.	32
5.3.-Clonación del Promotor PG.	37
5.4.-Construcción del vector pCambia PG-SDH.	38
5.5.-Análisis de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformados con pCambia 35S-SDH, PG-GFP o PG-SDH.	40
5.6.-Análisis de funcionalidad del promotor PG	41
5.7.-Análisis molecular de la expresión de LeSDH en frutos de durazno.	42
5.8.-Análisis bioquímico de la expresión de LeSDH en fruto de durazno.	43
6.-DISCUSIÓN.	46
7.-PROYECCIONES Y CONCLUSIONES.	51
8.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	53





INDICE DE TABLAS

Tabla I. Comparación de las características cinéticas de LeSDH de tomate y

MdSDH3 de manzana _____ 7

Tabla II. Partidores utilizados en este seminario. _____ 15

Tabla III: Probabilidades asociadas a la pruebas T y Z. _____ 45



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo de sorbitol en manzanos.	5
Figura 2: Esquema de la estrategia usada en este seminario, para la construcción del cassette de expresión fruto-específico de LeSDH.	32
Figura 3: Determinación de la integridad del RNA total extraído de hojas de tomate por electroforesis.	33
Figura 4: Optimización de condiciones de PCR para amplificar LeSDH.	34
Figura 5: Análisis de restricción de LeSDH clonado en pGEM-T Easy.	35
Figura 6: Digestión de pGemT-LeSDH con las enzimas <i>BstEII</i> (<i>Eco91I</i>) y <i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>).	35
Figura 7: Productos de PCR de pCambia-LeSDH.	36
Figura 8: Digestión de pGemT-PG con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>SpeI</i> .	37
Figura 9: Amplificación del promotor PG clonado en pCambia1302.	38
Figura 10: Comprobación por PCR del constructo pCambiaPG-SDH.	39
Figura 11: Confirmación de la presencia de los vectores binarios en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediante PCR.	40
Figura 12: Comprobación de la funcionalidad del promotor PG mediante transformación transitoria de frutos.	42
Figura 13: Amplificación del cDNA de LeSDH en duraznos agro-inyectados con los vectores desarrollados.	43
Figura 14: Actividad de sorbitol deshidrogenasa en duraznos expresando LeSDH	

LISTA DE ABREVIATURAS

Agua np	Agua nano-pura (libre de nucleasas)
BCA	Bicinchoninic acid
CaMV	Cauliflower mosaic virus
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
CTAB	Bromuro de Cetil Trimetil Amonio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DF	Después del Florecimiento (After Full Bloom)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dT	Desoxitimidina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GAPA	Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa.
GFP	Proteína fluorescente verde
GUS	β -glucuronidasa
kb	Kilobases
Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria-Bertani
LeSDH	Sorbitol Deshidrogenasa de tomate
MdSDH	Sorbitol Deshidrogenasa de manzano
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	Medio Murashige-Skoog
NAD	Nicotinamida adenina denucleótido
NPTII	Neomicina fosfotransferasa II
pb	Par de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PG	Poligalacturonasa
PVP	Poli vinil pirrolidina
PVPP	Poli vinil poli pirrolidina
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Reacción de transcriptasa reversa
SDH	Sorbitol Deshidrogenasa
TA	Temperatura Ambiente
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad enzimática
UV	Radiación ultra violeta
Vmax	Velocidad máxima

RESUMEN

El sorbitol es el principal producto fotosintético y el mayor componente floema-translocado en un gran número de plantas de importancia económica que pertenecen a la familia Rosaceae (manzanas, peras y carozos). Este azúcar es almacenado o metabolizado en los frutos durante su desarrollo. Los diferentes azúcares presentes en el fruto poseen distintos niveles de dulzor, siendo el sorbitol unos de los menos dulces y la fructosa unos de los más dulces. Una estrategia para aumentar el dulzor de frutos sería favorecer la inter-conversión del sorbitol a fructosa en el fruto mediante la sobre-expresión de sorbitol deshidrogenasa (SDH), la enzima que convierte sorbitol a fructosa. De esta manera se aumenta la concentración de fructosa en el fruto y por consecuencia un incremento del flujo de sorbitol hacia al fruto debido al consumo de este. La enzima presentada en este trabajo es SDH de tomate (LeSDH) que, según trabajos previamente publicados, presenta una mayor eficiencia para esta conversión que las enzimas endógenas presentes en los manzanos. El cDNA de LeSDH fue aislado de tomate y clonado en un vector binario (pCambia 1302) por medio de pGemT Easy. Paralelamente se clonó un promotor fruto-específico PG (poligalacturonasa) mediante la misma estrategia, con el objetivo de sobre-expresarlo fruto-específicamente. *Agrobacterium tumefaciens* fue transformado por los vectores binarios de sobre-expresión y posteriormente se usó como herramienta para transformar frutos (tomate y duraznos) de forma transitoria mediante la técnica de agro-inyección y así llevar a cabo análisis de expresión y de actividad (molecular y bioquímico). Las pruebas correspondientes al

funcionamiento del promotor PG fueron exitosas. Los análisis de expresión de LeSDH y los ensayos bioquímicos de actividad específica de SDH en durazno, mostraron que los vectores binarios de sobre-expresión de SDH funcionaron correctamente.

ABSTRACT

Sorbitol is the main photosynthetic product and the principle component translocated through the phloem in many plants of the Rosaceae family, such as apples, pears and peaches which are of high economical importance. In apple, sorbitol is transported to the fruit during development and on entry it is metabolized in order to produce a variety of other sugars, such as sucrose, glucose and fructose. Of these sugars, fructose is twice as sweet as sorbitol. One strategy to increase the sweetness of apples, is to overexpress sorbitol dehydrogenase (SDH), the enzyme responsible for the conversion of sorbitol to fructose. In this study, we investigated LeSDH from tomato as previous studies have shown that this enzyme presents a higher efficiency and affinity in the presence of sorbitol, compared to the endogenous apple SDH. The cDNA encoding this enzyme was isolated from tomato leaves and cloned into a binary vector (pCambia1302) via pGem-T Easy. At the same time, a fruit-specific polygalacturonase (PG) promoter was cloned using the same strategy, in order to create a fruit-specific expression vector. *Agrobacterium tumefaciens* was transformed with the overexpression binary vectors: 35S-LeSDH and PG-LeSDH. Subsequently, using the agro-infiltration technique, peach and tomato fruits were transiently transformed with these vectors. The PG promoter was determined to be functioning correctly. In peach fruits, from the analyses of LeSDH expression and the biochemical assays on the specific activity of the enzyme, it was concluded that the binary overexpression vectors functioned correctly.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-El mercado de manzanas chilenas

El manzano doméstico (*Malus x domestica*) perteneciente a la familia Rosaceae, es una de las especies de mayor importancia económica para nuestro país. La manzana, fruta pomácea, se ubica junto con las peras y membrillos en el tercer lugar de producción frutícola mundial. Chile por su parte, tuvo en el periodo 1996-2001, una participación en exportaciones de manzanas de un 10% a nivel mundial y un 39% en el hemisferio o de contra-estación, liderando ampliamente en Sudamérica. Hasta el año 2006 nuestro país ha mantenido un crecimiento del 6% anual en las exportaciones de manzanas (ODEPA, www.odepa.gov.cl).

La zona central de Chile presenta buenas condiciones agroclimáticas para la propagación de estos frutales en los lugares en donde se cultivan, principalmente en las regiones VI y VII. Sin embargo, en la última década hubo un leve incremento en el número cultivos en algunas regiones ubicadas más al sur del país. En este sector, durante los últimos años, los cultivos de manzanas han experimentado expansiones y cambios varietales con el fin de lograr mejor calidad, mejores condiciones de precocidad y una ampliación del período de oferta. Uno de los principales cambios es la incorporación de variedades bicolors (Royal Gala, Fuji, Braeburn y Pink Lady), que actualmente ya superan el 50% de las exportaciones (www.odepa.gob.cl).

Los principales motores del desarrollo e incorporación de nuevas variedades son, por un lado, los cambios en las condiciones climáticas y la susceptibilidad a diferentes

patógenos; y por otro, y no menos importantes, los cambios de hábito en el consumo alimentario y los distintos requerimientos de los consumidores en lo que respecta a las propiedades organolépticas del fruto. Por esta razón es importante, para mantener una participación significativa en las exportaciones, innovar e incorporar nuevas variedades a mercados crecientes y exigentes, como lo son China, India y otros países asiáticos. Un ejemplo claro de esto fue la incorporación de las variedades bicolor. Fuji en particular, creada en Japón de un cruce entre las variedades Red Delicious y Ralls, es una de las variedades de manzana más aceptadas y con mayor crecimiento en ventas. Lamentablemente, esto revela nuestra dependencia de los fitomejoradores extranjeros para la incorporación de nuevas variedades, con el correspondiente pago de 'royalty'. Por esto, es necesario crear nuevas variedades que sean propias, que cumplan con los requerimientos de los mercados de exportación y que nos brinden una ventaja comparativa con nuestros principales competidores, entre ellos Nueva Zelanda. Para introducir distintas características a una planta, existe el fitomejoramiento clásico. No obstante, este es un proceso bastante difícil, laborioso y a largo plazo. Empero, en la última década el uso de la biotecnología, principalmente la ingeniería genética y el desarrollo de organismos genéticamente modificados (OGM), ha permitido poder integrar, a un organismo, nuevas características de forma específica y selectiva, desarrollando las variedades deseadas en un tiempo más corto y de forma más eficiente.

Una de las características de interés de los frutos, es su dulzor. El desarrollo de una variedad de manzana en donde esta propiedad organoléptica sea sobresaliente, le daría una ventaja comparativa sobre otras variedades y el desarrollo de tal variedad podrá

satisfacer la demanda de los consumidores en Asia. Cabe mencionar, que los asiáticos prefieren manzanas dulces y con poca acidez, a diferencia de los nor-europeos y estadounidenses que aprecian las manzanas ácidas (Janick y col, 1996).

1.2.-Metabolismo de azúcares en manzanas

El dulzor de las manzanas aumenta a medida que estas maduran, debido a la disminución de los ácidos orgánicos y a cambios en la composición de azúcares en el fruto, tales como la glucosa, la fructosa y la sacarosa; y a alcoholes de azúcar como el sorbitol (Hulme y col. 1963, Mansour y col. 1986). Lo dulce que pueda llegar a ser el fruto, depende tanto de la cantidad de azúcar que posee, como de la composición de ésta. Los azúcares presentes en el fruto tienen distintos grados de poder edulcorante (dulzor), lo que hace que la composición de éstos sea muy importante en el sabor final del fruto. Comparando la capacidad edulcorante o dulzor de los distintos azúcares mencionados, sorbitol es el que presenta menor poder edulcorante, siendo éste un 10% menos dulce que la glucosa, 40% menos que la sacarosa y 50% menos que la fructosa (Burt, 2006). A diferencia de la gran mayoría de especies vegetales, en las que la sacarosa es el principal azúcar sintetizado durante la fotosíntesis y exportado desde las hojas, sorbitol es el que cumple esta función en la familia Rosaceae (Bielecki, 1982). Este alcohol de azúcar lineal de 6 carbonos comprende más del 80% de los carbohidratos trasladados por el floema del manzano (Bielecki, 1969; Loescher y col, 1982; Webb y Burley, 1962). Una vez que sorbitol entra en los frutos se metaboliza rápidamente a glucosa y principalmente a fructosa, que son almacenadas en la vacuola de las células del mesocarpo del fruto (Figura 1).

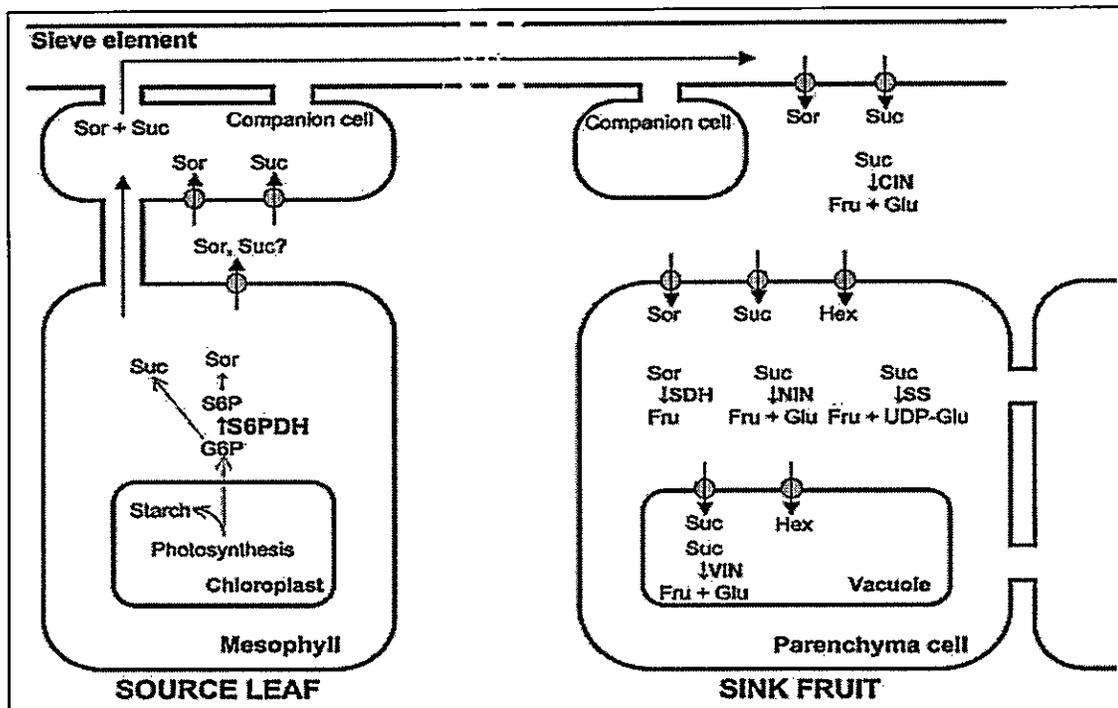


Figura 1: Metabolismo de sorbitol en manzanas: Sorbitol (Sor) y Sacarosa (Suc) son sintetizados en las hojas desde G6P (glucosa-6-fosfato). Sorbitol es sintetizado por S6PDH (sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa). S6PDH es el paso regulador. Después de la translocación al fruto, sorbitol es convertido a fructosa (Fru) por SDH (sorbitol deshidrogenasa) y la sacarosa es convertida a fructosa y glucosa (Glu) por invertasas (CIN, NIN, VIN). La síntesis de almidón como su ruptura ocurre también dentro de las células del parénquima del fruto. Hex, hexosa (Teo y col. 2004).

Esto permite mantener el gradiente de concentración, facilitando el paso de sorbitol desde las hojas hacia el fruto (Jackson, 2003). A pesar de esto, existe un remanente constante de sorbitol en los frutos de manzanas a medida que éstos maduran. Las cantidades relativas de sorbitol, medidas en jugo de manzanas, varían según la variedad y van desde 10% y 40% respecto a la sacarosa y de 4% a 8% respecto a los azúcares totales (Rekha y col, 1997). Esta fracción de sorbitol tiene la potencialidad de ser metabolizado como azúcares con más poder edulcorante, como la fructosa y así otorgarle mayor dulzor al fruto.

La enzima que cataliza la oxidación de sorbitol a fructosa es sorbitol deshidrogenasa (SDH, EC 1.1.1.14). Ésta requiere la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y ha sido catalogada como la principal enzima en el metabolismo del sorbitol en los frutos de manzana (Beruter, 1985; Yamaki y Ishiwaka, 1986). En manzano ya se han identificados 9 genes que codifican para SDH, 8 de ellos con alto porcentaje de identidad tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos (Nosarszewski y col, 2004). Asimismo se han clonado y caracterizado 4 isoformas de SDH de manzana, llamadas MdSDH1, 2, 3 y 4 respectivamente (Park y col, 2002).

Se ha documentado que SDH está regulada tanto a nivel transcripcional como a nivel post-traduccional. Sorbitol y otros azúcares podrían participar en la regulación de la expresión de los genes SDH, no obstante, la información que se conoce de este mecanismo, intermediarios y proteínas involucradas es reducida (Teo y col. 2006). Al contrario, la actividad SDH durante el desarrollo de la manzana ha sido bien estudiada. En el trabajo de Teo y col. (2006) se midió la actividad de SDH durante el desarrollo del fruto en 30, 91 y 118 días después del florecimiento máximo (DF, "After Full Bloom").

Los resultados mostraron una ausencia de actividad en el comienzo del desarrollo del fruto, un aumento considerable a los 91 días y una baja actividad a los 118 días DF. También se ha medido la actividad de esta enzima en las etapas tempranas de desarrollo del fruto (Nosarszewski y col, 2004), En este trabajo, se midió la actividad de SDH en frutos de 1 a 5 semanas después del florecimiento. Los resultados revelan una muy baja actividad durante el tiempo analizado ($1-10 \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$), destacando solo un leve incremento a las 2 semanas ($5-33 \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$). Estos ensayos fueron repetidos en

tres variedades distintas de manzanas (Lodi, Redchief Delicious, y Fuji), donde el comportamiento fue muy similar. Por lo demás, en los dos trabajos mencionados, también se midió la cantidad de enzima (SDH) presente en cada período. Los datos revelaron que la cantidad de proteína SDH no variaba en la misma forma que la actividad. Una de las posibles explicaciones, son las regulaciones post-traduccionales que inactivan a la enzima (Nosarszewski y col, 2004).

Sorbitol deshidrogenasa es una enzima clave para la inter-conversión de azúcares (sorbitol - fructosa), y por ende juega un papel importante en incrementar naturalmente el dulzor de las manzanas durante su maduración. No obstante, la baja cantidad de sorbitol y la reducida actividad SDH en las etapas finales del desarrollo de la manzana, sin nombrar el elevado número de isoformas y la fuerte regulación que presentan, nos esboza un escenario difícil para la sobre-expresión de genes propios de la manzana mediante la manipulación genética; aunque esta alternativa no puede ser descartada a priori. Empero, la incorporación de un gen foráneo que codifique para una SDH con una mayor afinidad por sorbitol (bajo K_m), permitiría transformar el remanente de este alcohol de azúcar a fructosa, incrementando su gradiente de concentración, por ende también el flujo de sorbitol hacia el fruto durante su desarrollo y así mismo su dulzor.

Una SDH con tales características se ha descrito en tomates (*Solanum lycopersicum*). Esta enzima, llamada LeSDH (Ohta y col, 2005), presenta una alta afinidad para sorbitol y una baja afinidad para fructosa (Tabla I), lo que favorece en gran medida la reacción de oxidación de sorbitol. Cabe mencionar lo curioso que resulta encontrar un gen que codifique para SDH, en una especie de la familia Solanaceae, la que utiliza sacarosa

como principal fotosintato floema-translocado. Caracterizaciones similares se han realizado en otras plantas no-Rosaceae, tales como soya y maíz (Kuo y col, 1990; Doehlert, 1987), y se propone que la enzima esté involucrada en el metabolismo de las pequeñas cantidades de sorbitol que existen en estas especies durante condiciones de estrés, por ejemplo, por frío. Comparando algunas propiedades enzimáticas de LeSDH con MdSDH3 se puede apreciar que la primera posee una mayor afinidad por sorbitol, pero su velocidad máxima, en la reacción de oxidación de sorbitol, es menor que la de la enzima de manzana (Tabla I).

Tabla I. Comparación de las características cinéticas de LeSDH de tomate y MdSDH3 de manzana.

Enzima	Sustrato	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína)
LeSDH (Ohta y col. 2005)	Sorbitol	2.39	0.378
	Fructosa	99.5	2.13
MdSDH3 (Park y col. 2002)	Sorbitol	83	0.84
	Fructosa	390	0.47

Con la información obtenida, surge la siguiente pregunta: ¿Es LeSDH la mejor opción para aumentar el dulzor de los frutos mediante su sobre-expresión en manzanas, o es más eficiente la sobre-expresión de un SDH endógeno del fruto? Los argumentos mencionados pueden indicar que LeSDH es el mejor candidato, sin embargo, la diferencia en la velocidad máxima puede afectar en alguna medida el resultado final. En este seminario de título, mediante técnicas de biología molecular, transformación génica de plantas y ensayos bioquímicos, se evaluó la expresión y actividad de unas de las enzimas, LeSDH.

Para determinar la funcionalidad de cualquier transgen, es necesario evaluar su eficiencia en un sistema modelo vegetal, mediante la transformación estable o transitoria. Sin embargo, la transformación de plantas, en forma estable mediante *Agrobacterium tumefaciens*, requiere mucho tiempo (meses), que se utiliza en seleccionar y hacer crecer las plantas transgénicas. Inclusive, tomaría más tiempo aún poder evaluar la actividad SDH en la manzana transformada, dado que demora unos 3-4 años para obtener los primeros frutos de un manzano transgénico. Empero, se ha descrito un método de transformación transitoria de frutos mediante *A. tumefaciens*, para evaluar de forma rápida la funcionalidad de transgenes directamente en ellos (Orzaez y col, 2006). La agro-inyección, como se le denominó a la técnica, permite disminuir enormemente los tiempos de análisis (hasta 4 días) necesarios para el estudio de genes foráneos expresados en frutas. Esta técnica se ha aplicado a frutos de tomate (Orzaez y col. 2006) y frutos de durazno (Caroca, 2007), pero aún no se ha descrito para frutos de manzano.

1.3.-Promotores fruto-específicos

En el diseño de un vector de sobre-expresión de un gen en cualquier sistema, es importante elegir un promotor adecuado para guiar su expresión en el tiempo y ubicación precisos. Esto es un punto importante, debido a que la sobre-expresión de SDH en forma constitutiva, en todos los tejidos de la planta, disminuiría la concentración de sorbitol presente en éstos reduciendo, principalmente, la taza de drenaje de carbono hacia los frutos ("sink activity"). Esto como consecuencia resulta en frutos de menor tamaño y de baja calidad (Teo y col, 2006). Por lo tanto, un promotor

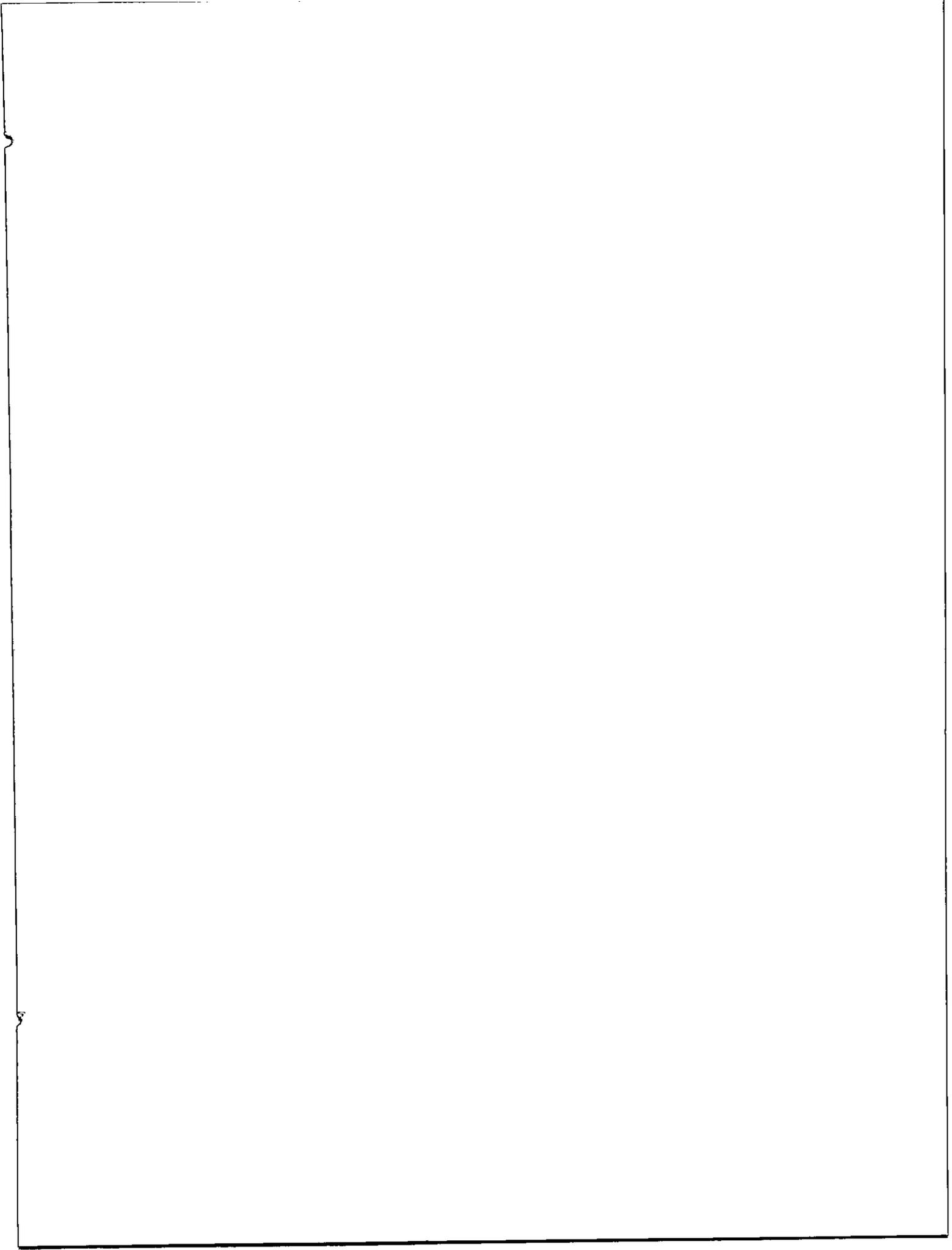
fruto-específico como el del gen PG de tomate (PG; EC 3.2.1.15; Montgomery y col, 1993) evitaría tales efectos no-deseados. PG cataliza la hidrólisis de α -(1-4) galacturonano, siendo unas de las enzimas claves en la degradación de la pectina durante la maduración de muchos frutos (Fischer y Bennett, 1991). Se puede agregar además, que es un gen regulado por etileno, fitohormona encargada del proceso de maduración de los frutos (Sitrit y Bennett, 1998), por ende su promotor es un excelente candidato para controlar la expresión de transgenes en frutos climatéricos, como lo son el tomate, el durazno y la manzana. El promotor de este gen posee regiones conservadas de respuesta a etileno, además de secuencias de regulación negativa y positiva para la expresión específica en los distintos tejidos del fruto (exo-, meso- y endocarpo). Estudios anteriores han mostrado que la extensión del promotor del gen PG es aproximadamente 1,4 kb y comprende regiones que regulan la especificidad y distribución de la expresión en el fruto, además de las secuencias de respuesta a etileno (Bird y col. 1988). En el trabajo de Montgomery y col. (1993) se evaluaron diferentes fragmentos del promotor PG, truncándolo en 6 tamaños distintos y clonando cada uno río arriba del gen reportero GUS (β -glucuronidasa). Al transformar genéticamente tomates con estas construcciones, se evaluó tanto la intensidad de expresión de GUS, como la distribución de este en el fruto. Los resultados revelaron que el fragmento de 806 pb expresaba fuertemente el gen reportero GUS y su distribución era homogénea en todo el fruto. Esto se debía a que el fragmento truncado no poseía una secuencia de regulación negativa que impedía la expresión del gen en el endocarpo. Usando este fragmento de 806 pb del promotor PG, para controlar la expresión de transgenes en plantas, se puede asegurar tanto la fruto-especificidad, como de una expresión fuerte y homogénea en todo el tejido del fruto

climatérico. Por ejemplo, se utilizó este fragmento para dirigir la expresión de fitoenosintasa de forma fruto-específica (Fraser y col, 2002).

1.4.-Estrategia desarrollada

Como objetivos de este seminario de título y como primera parte en la evaluación de los genes SDH, se aisló el cDNA de LeSDH y se construyeron dos vectores para su sobre-expresión para plantas, ambos basados en el vector binario pCambia 1302 (Hajdukiewicz y col. 1994). Un vector binario es uno que permite realizar los pasos de clonación en *Escherichia coli* para luego pasarlo a *A. tumefaciens* para lograr la expresión de los genes portados en plantas después de la transformación génica.

En uno de los vectores, la expresión de LeSDH es controlada por el promotor constitutivo CaMV35S (virus del Mosaico de la coliflor) y en el otro por el fragmento de 806 pb del promotor PG. *A. tumefaciens* fue transformada con estos vectores, más un vector control el cual contenía el promotor PG y el gen reportero GFP (proteína fluorescente verde, green fluorescent protein). Empleando la técnica de agroinyección, se transformaron frutos de durazno, en forma transitoria, con los vectores nombrados. Por medio de RT-PCR se evaluó la expresión de LeSDH en los tejidos agroinyectados del fruto. Asimismo, el aumento de la actividad SDH se determinó midiendo espectrofotométricamente la reducción de NAD en extractos crudos de proteínas de diferentes duraznos transformados por los distintos vectores, usando sorbitol como sustrato.



2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

“Es posible aumentar la actividad sorbitol deshidrogenasa en frutos mediante la sobre-expresión de LeSDH regulado por un promotor fruto-específico”

3.-OBJETIVOS

3.1.-Objetivo general:

- Construcción y evaluación de vectores para sobre-expresar sorbitol deshidrogenasa de tomate (LeSDH) en plantas.

3.2.-Objetivos específicos:

- Construir los vectores binarios para sobre-expresar LeSDH en plantas de forma constitutiva y fruto-específica.
- Análisis molecular y bioquímico de frutos transformados transitoriamente con los vectores binarios de sobre-expresión de LeSDH.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1.- Material Biológico.

4.1.1.- Crecimiento de *Solanum lycopersicum* (tomate) variedad Ailsa craig.

La semillas de tomate fueron esterilizadas (un lavado con etanol 70% durante 5 min, seguido de un lavado con 1% de cloro casero en agua esteril durante 5 min, terminando con 3 lavados de 5 min cada uno con agua esteril). Luego se prosigió a sembrar las semillas en un recipiente con medio de germinación (Sales MS 0.5X, sacarosa 15 g/L, Vitaminas MS 1X, Agar 7 g/L, pH 5.7) y se dejó crecer en esterilidad por 4 semanas, a 22 °C con 16 h de fotoperiodo. Las plantas que lograron alcanzar una altura de 6 a 12 cm, fueron traspasadas a tierra estéril, dejándolas crecer durante 1 o 2 meses, en una habitación termoregulada a 22 °C, con 16 h de fotoperiodo. Durante este tiempo, las plantas consiguieron el tamaño adecuado para la cosecha del tejido necesario (hojas) para los experimentos.

4.1.2.- Obtención de frutos de tomate y durazno para los ensayos de expresión y actividad.

Los frutos de durazno (*Prunus pérsica* var. nectarina) usados se encontraban en un estadio medio de maduración (leve disminución de la resistencia a la presión, ausencia del color verde en la epidermis y aparición de manchas rojizas en éste). Los frutos fueron usados sin pedúnculo, ya que la presencia de éste, no demostraba ninguna diferencia importante para los experimentos.

Se utilizaron tomates en racimos en los experimentos de agro-inyección. Estos estaban en una etapa temprana de maduración (coloración verdosa y/o amarilla, con fuerte resistencia a la presión).

Debido a que los frutos mencionados son climatéricos, ellos siguen madurando y aumentando su tasa de respiración una vez que son cosechados, no siendo muy relevante, para este caso, que estén o no unidos a la planta.

4.1.3.- Crecimiento de bacterias *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*.

Las bacterias *E. coli* de la cepa *DH5α* fueron crecidas en medio LB líquido [triptona 1% (p/v), extracto de levadura 1% (p/v), NaCl 0,8 % (p/v), pH 7,0 a 25 °C] o sólido [a la mezcla anterior se le agrega agar 1.5 % (p/v)] durante 14-16 h, a una temperatura de 37 °C, con agitación de 250-300 rpm en el caso de cultivo líquido.

La cepa GV3101 de *A. tumefaciens*, fue crecida en medio LB líquido y sólido durante 36-48 h, a una temperatura de 28 °C. Esta cepa presenta dos resistencias a antibióticos, rifampicina para la selección cromosómica de la cepa y gentamicina para la selección del plasmido Ti.

4.2.- Diseño de partidores específicos con sitios de cortes para las endonucleasas *BcuI* (*SpeI*) y *BstEII* (*Eco9II*) para el clonamiento de LeSDH.

Para el diseño de los partidores, se buscó en la base de datos (NCBI) la secuencia con versión única del mRNA de sorbitol deshidrogenasa de tomate (LeSDH), con número de acceso AB183015 (Ohta y col. 2005). La información entregada revela que el tamaño del mRNA es de 1409 pb, además, se encontró que el codón de inicio y de término de traducción se sitúa en los nucleótidos 189 y 1256 respectivamente.

El partidor directo (5') se compone por 18 nucleótidos, que hibridan específicamente con la secuencia complementaria del mRNA de LeSDH incluyendo el codón de inicio, antecedido por la secuencia palindrómica de 6 nucleótidos del sitio de corte para la

endonucleasa *BcuI* (*SpeI*) y 4 nucleótidos arbitrarios en el extremo 3' (Tabla II).

El partidor reverso (3') se compone por 20 nucleótidos complementarios con la secuencia codificante (AB183015), incluyendo el codón de término de la traducción, antecedido por la secuencia palindrómica de 7 nucleótidos del sitio de corte para la endonucleasa *BstEII* (*Eco9II*) y 4 nucleótidos arbitrarios en el extremo 5' (Tabla II). La secuencia del mRNA de LeSDH no presenta sitios de corte para las endonucleasas seleccionadas. Los partidores fueron sintetizados y entregados liofilizados, para ser resuspendidos en agua np a una concentración de 1 mM, y guardados en stock a -20 °C. Las alícuotas que se usaron en los experimentos están a una concentración de 10 µM, las que han sido almacenadas también a -20 °C.

4.3.- Extracción de RNA total desde hojas de tomate.

La extracción de RNA total se realizó mediante el protocolo de RNA-Solv[®] Reagent de Omega Bio-tek. Se tomaron 6 muestras de tejido de distintas hojas inmaduras, recolectadas de la misma planta. Se pesaron alrededor de 60 mg de cada muestra, recolectándolas en distintos tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Las muestras fueron congeladas, colocando los tubos dentro de un termo con nitrógeno líquido, alrededor de 5 min y posteriormente fueron maceradas con un pistilo. Al polvo resultante de cada muestra se le añadió 1 mL de RNA-Solv[®] Reagent homogeneizándolas con el mismo pistilo e incubándolas durante 5 min a temperatura ambiente (TA). Posterior a esto, se le agregó 200 µL cloroformo, se homogenizó vigorosamente las fases en un vortex por 15 s, seguido por la incubación de las muestras en hielo por 10 min. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 x g por 15 min a TA, y la fase acuosa fue recuperada y transferida

a otro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. La precipitación del RNA fue realizada agregando 500 µL de isopropanol a -20 °C e incubando a esta misma temperatura por 20 min. Después de esto se centrifugó por 10 min a 12000 x g a 4 °C y se descartó completamente el sobrenadante, cuidando de no perder el pellet. Por último, éste fue lavado con 1 mL de etanol al 80% en agua DEPC (dietilpirocarbonato, compuesto que inactiva RNasas por modificaciones covalentes en residuos de histidina) y posteriormente centrifugado, secado y resuspendido en 30 µL de agua DEPC a TA.

Tabla II. Partidores utilizados en este seminario. Los distintos partidores se utilizaron para la clonación tanto del cDNA de LeSDH como del promotor PG. GAPA y NPTII se usaron principalmente para comprobar la calidad del cDNA obtenido luego de una reacción RT y constatar la transformación de *A. tumefaciens* con los vectores elaborados, respectivamente.

Partidor	Secuencia partidor	Descripción
LeSDH- <i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>)-Directo	5'-G GCAACTAGTCTAATGGGTAAAGGAGGC-3'	Sitio de corte para <i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>) (rojo), codón de inicio de traducción (verde)
LeSDH- <i>BstEII</i> (<i>Eco9II</i>)-Reverso	5'-GGCAGGTGACCTTTTACAAATTAACATGAC-3'	Sitio de corte para <i>BstEII</i> (<i>Eco9II</i>) (rojo), codón de termino de traducción (verde)
PG- <i>BamHI</i> -Directo	5'-GGATCCTAAGTACCATCACATAATTGAGA-3'	Sitio de corte para <i>BamHI</i> (rojo)
PG- <i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>)-Reverso	5'-ACTAGTGATATATTGTTATATGGTATGGTT-3'	Sitio de corte para <i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>) (rojo)
GAPA-Directo	5'-GGTAGGATCGGGAGGACC-3'	Hibrida con una region interna 5' del gen y/o cDNA de la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa.
GAPA-Reverso	5'-GATAACCTTCTTGGCACCAG-3'	Hibrida con una region interna 3' del gen y/o cDNA de la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa.
NPTII-Directo	5'-CAAGATGGATTGCACGCA-3'	Hibrida con una region interna 5' de la Neomicina Fosfotransferasa II
NPTII-Reverso	5'-CTATGTCCTGATAGCGGT-3'	Hibrida con una region interna 3' de la Neomicina Fosfotransferasa II

4.4.- Cuantificación y análisis de calidad e integridad del RNA total en las extracciones realizadas.

Todas las extracciones de RNA total, tanto de hojas de tomate, como de frutos de durazno (sección 4.14.3), fueron cuantificadas y analizadas para constatar su calidad. La cuantificación se realizó usando un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis), que permite medir la absorbancia a 260 nm de 1 µL de la muestra sin necesidad de diluirla, entregando la concentración en forma instantánea. Además, se comprobó la pureza de las extracciones de RNA, usando las relaciones 260/280 y 260/230 que el programa del espectrofotómetro entrega. El valor relación 260/280 tiene que estar entre 1,8 y 2,0. Es generalmente aceptado que valores cercanos a 1.8 indican extracciones puras de DNA y valores cercanos a 2,0 extracciones puras de RNA; valores más bajos que estos, señalan la presencia de contaminantes como proteínas, fenoles u otros compuestos que absorben a 280 nm. Para la relación 260/230 los valores para muestras puras de RNA o DNA son ligeramente mayores, comúnmente en el rango de 1,8 y 2,2. Valores más bajos revelan la presencia de solventes orgánicos, algunas sales y proteínas. La integridad del RNA total se analizó en un gel de agarosa al 1% (p/v), el cual fue preparado con buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y bromuro de etidio 1 µg/mL. Se mezcló 1 µL de cada muestra con 1 µL de buffer de carga [Azul de bromofenol 0.25% (p/v), xylene cyanol 0.25% (p/v) y glicerol 80% (v/v)]. El gel se colocó en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X a una diferencia de potencial de 80 V durante 20 min. La visualización se llevó a cabo en una cámara oscura equipada con un trans-iluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene®). Para determinar la

integridad de RNA total de tomate y durazno, se verificó la presencia de las bandas de rRNA de 28S y 18S.

4.5.- Reacciones de transcripción reversa (RT) para el RNA total de Tomate

Las reacciones se llevaron a cabo usando el sistema ImProm-II[®] Reverse Transcription System de Promega (N^o cat. A3802). Cada reacción se realizó con 2 µg de RNA total, en un volumen de reacción de 20 µL. La composición final de la mezcla, además del RNA, fue la siguiente: Tampón ImProm-II[®] RT 1X; 3 mM de MgCl₂; 0,5 mM de dNTPs; 0,5 µM de oligo-dT, 20 U de inhibidor de ribonucleasas recombinante RNasin[®] de Promega. En un comienzo la mezcla está separada en dos volúmenes, el primero contenía el RNA total y los partidores Oligo-dT, y el segundo el resto de los componentes de la reacción.

La reacción se realizó en un termociclador, cuyo programa consiste en incubar 5 min a 70 °C al volumen que contiene el RNA y el Oligo-dT, con el objetivo de desenrollar las hebras de RNA, inmediatamente después los tubos son incubados en hielo, añadiéndoles el resto de la mezcla de reacción. Luego de 5 min, se vuelven a colocar en el termociclador y se incuban por 5 min a 25 °C, para permitir el alineamiento de los partidores oligo-dT. La extensión del cDNA ocurre a 42 °C, para esto la mezcla es posteriormente incubada a esta temperatura durante 60 min. Transcurrido este tiempo, se aumenta la temperatura hasta los 70 °C durante 15 min, con el objetivo de inactivar la transcriptasa reversa.

4.6.- Reacción de PCR con el objetivo de amplificar el cDNA de LeSDH

Para el molde de la reacción de PCR se usó el producto de la reacción en la sección anterior (4.5). El tamaño esperado del fragmento amplificado, contando desde el codón

de inicio, hasta el codón de término e incluyendo los nucleótidos agregados a los partidores, es de 1089 pb.

La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 μL y estaba compuesta de la siguiente manera: 1X Buffer de reacción Taq Favorgen[®]; 5 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM dNTPs, 0,5 μM de cada partidador (sección 4.2), 3 μL de la solución molde sin diluir (cDNA total); 1 U de Taq polimerasa Favorgen[®]. El protocolo de reacción incluyó: 3 min en "Hot-Start" a 94 °C, luego 1,5 min de denaturación en presencia de Taq, seguido por 35 ciclos con 30 s de denaturación a 94 °C, 1 min a 58 °C, para el alineamiento de los partidores y 1,5 min a 72 °C para la extensión. Esto finalizó con un ciclo de 10 min a 72° y finalmente a 4 °C.

4.7.-Clonamiento de LeSDH en un vector bacteriano

4.7.1.-Purificación desde gel del fragmento amplificado de LeSDH

Se cargó todo el producto PCR (20 μL) de la sección 3.6 en un gel de 0,7 % agarosa, y por electroforesis (sección 3.4), se separó la banda de interés de 1089 pb. Se cortó y purificó la banda del gel mediante el kit de purificación de DNA desde geles Wizard[®] PCR Preps Resin de Promega. El fragmento purificado fue recuperado en 15 μL de agua np.

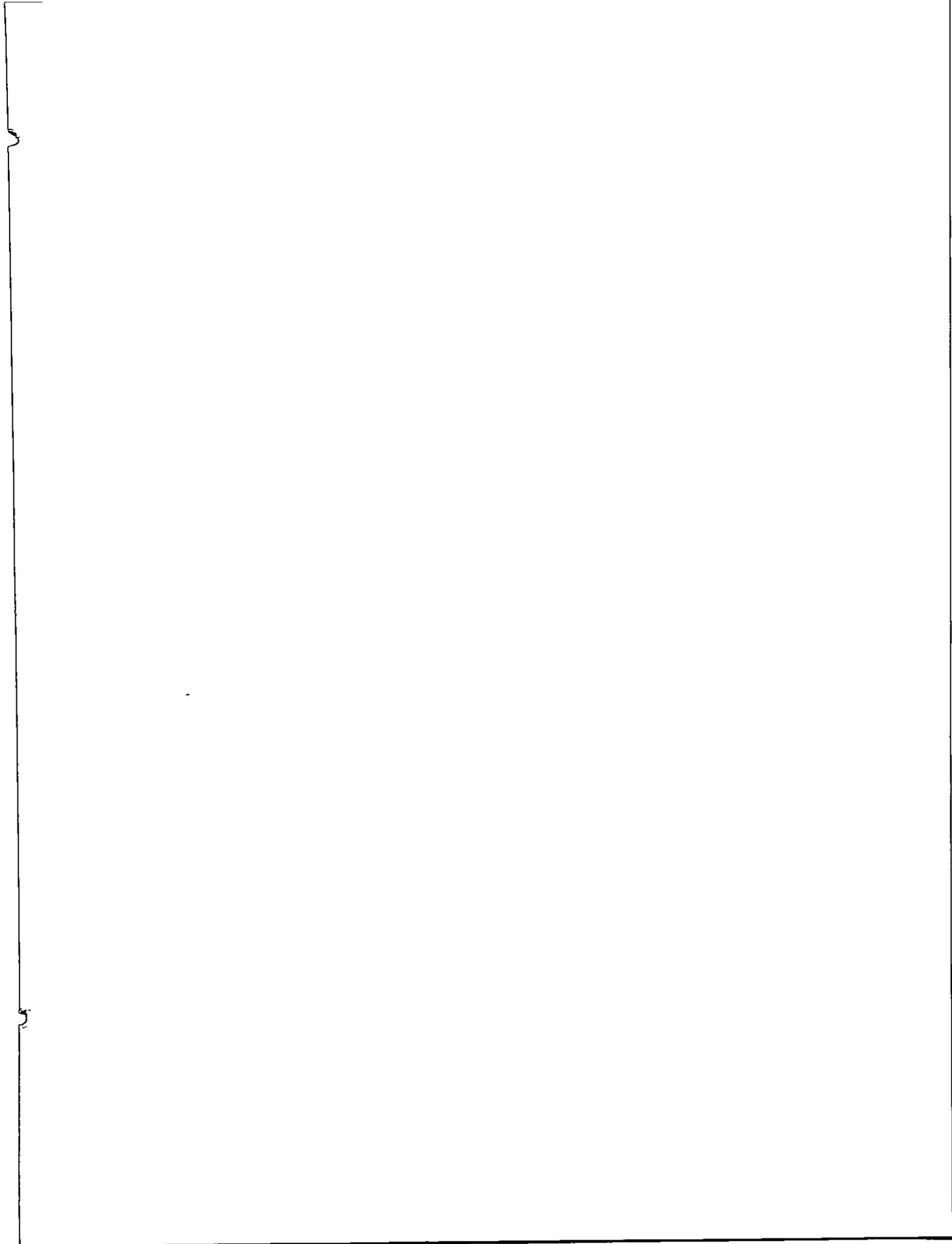
4.7.2.- Clonamiento de LeSDH por el sistema pGEM[®]-T Easy

El sistema pGEM[®]-T Easy (Promega) es un conveniente método de clonamiento para productos de PCR. Este vector lineal de 3 kb tiene en sus extremos una timidina desapareada, que provee un eficiente mecanismo para ligar productos de PCR, que presentan en sus extremos una adenina desapareada (al usar Tag o Pag). La reacción de

ligación fue realizada en un volumen de 10 μ L el que contenía, 50 ng del vector lineal, 1X "Rapid Ligation Buffer", 60 ng del producto PCR purificado (sección 4.7.1) y 3 unidades de DNA Ligasa T4. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante 16 horas.

3.7.3.- Transformación de *Escherichia coli* competentes con el vector pGEM[®]-T Easy – LeSDH

En este paso se usaron células competentes *E. coli* correspondientes a la cepa *DH5 α* preparadas en el laboratorio por el método de CaCl₂. Se tomó los 10 μ L de la reacción de ligación de la sección anterior y se mezcló con una alícuota de 150 μ L de células competentes en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Posterior a esto, mediante el método de shock térmico, se prosiguió a transformar las células. En primer lugar se incubó la mezcla a 4 °C por 15 min, después se colocó el tubo en un baño a 42 °C por 1 min, terminando nuevamente a 4 °C por 5 min. Finalizado el tiempo, se agregó 1 mL de medio líquido LB al tubo y se dejó incubando a 37 °C durante 1 h con agitación. Para el último paso, se centrifugó el tubo con las células a 5000 x g, resuspendiendo el pellet con 100 μ L de medio LB. Después se sembró los 100 μ L en una placa de Petri con medio sólido LB y ampicilina (100 mg/L) para seleccionar las células transformantes. Aquellas colonias que crecieron fueron inoculadas en 5 mL de medio líquido LB con ampicilina (100 mg/L) y crecidas toda la noche a 37 °C. A estos clones se les aisló el vector por medio de una mini-preparación de DNA plasmidial (sección 4.7.4). Los vectores purificados fueron analizados por digestión simple con las enzimas *Pst*I, *Eco*RI y *Hind*III (Fermentas[®]) en forma separada (1X buffer de reacción, 50 ng de vector purificado, 1 U de enzima, incubado durante 1 h a 37 °C). Los clones positivos fueron



denominados pGemT-LeSDH. Se eligió un clon para su secuenciación usando los partidores estándares T7 y SP6.

4.7.4.- Mini-preparaciones de DNA plasmidial para la verificación de colonias bacterianas transformantes.

Las colonias de bacterias que se analizaron, fueron crecidas en un tubo de 15 mL con 5 mL de medio LB líquido siguiendo los detalles de la sección 4.1.3. De los 5 mL, 1 mL fue guardado en stock con glicerol al 20% a -80 °C como respaldo. Si la colonia era un falso positivo, simplemente se eliminaban del stock. Los plásmidos bacterianos fueron aislados de los 4 mL restantes, mediante mini-preparaciones siguiendo las instrucciones del fabricante (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, Axygene®, N° de catalogo AP-MN-P-250). Al final, se resuspendieron los plásmidos en 30 µL de una solución de 2,5 mM Tris-HCl, pH 8,5 a TA.

En el caso de *E. coli*, el DNA plasmidial obtenido fue lo suficientemente abundante para poder digerirlo con endonucleasas en los pasos de clonación y verificación. Por el contrario para *A. tumefaciens*, debido al menor número de copias de sus plásmidos y la poca eficiencia de extracción, la cantidad de DNA plasmidial extraído no era suficiente como para realizar pruebas con endonucleasa, pero si suficiente para ser molde en reacciones de PCR.

4.8.-Diseño de partidores específicos con sitios de corte para *BcuI* (*SpeI*) y *BamHI* para la clonación del promotor del gen de la poligalacturonasa (PG).

Los partidores usados fueron facilitados por la Dra. Claudia Stange, Universidad de Chile, estos fueron diseñados según los resultados del trabajo Montgomery *y col.* (1993). Usando la base de datos (NCBI), se encontró la secuencia del primer exón del gen PG,

con número de acceso X07410, éste incluye las secuencias regulatorias para la expresión del gen en forma completa y específica para todo el tejido del fruto (Rose y col. 1988).

El partidor directo (5') contiene 23 nucleótidos específicos de la secuencia del promotor PG antecedido por la secuencia palindrómica de 6 nucleótidos del sitio de corte, para la endonucleasa *Bam*HI (Tabla II).

El partidor reverso (3') contiene 24 nucleótidos complementarios a la secuencia del promotor PG antecedido por la secuencia palindrómica de 6 nucleótidos del sitio de corte, para la endonucleasa *Bcu*I (*Spe*I) (Tabla II). La extensión de la secuencia regulatoria flanqueada por los partidores es de 806 pb. Los sitios de corte de endonucleasas no están presentes en la secuencia interna.

4.9.- Extracción de DNA genómico desde hojas de tomate

La extracción de DNA genómico fue llevada a cabo mediante el método CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio, Doyle y Doyle, 1988). Se pesó 50 mg de tejido de hoja, sin vasos vasculares y se les añadió 600 µL de Buffer CTAB [CTAB 1% (p/v), Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), Na₂EDTA 10 mM, NaCl 0,7 M, antes de usar se agregó β-mercaptoetanol 1% del volumen final] macerando e incubando a 70 °C por 30 min. Se añadió luego 400 µL de Buffer CTAB, macerando e incubando a 70 °C por 15 min. Luego se añadió 400 µL de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) invirtiendo repetidamente. Se centrifugó la mezcla a 12000 x g por 10 min y se rescató 800 µL de la fase superior en un tubo de microcentrifuga nuevo con 700 µL de isopropanol, para precipitar el DNA genómico. Se mezcló invirtiendo, incubándolo posteriormente a -20 °C por 30 min. Se centrifugó por 15 min a 12000 x g, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 750 µL de etanol al 70% en agua np. Finalmente, se

centrifugó a 12000 x g por 5 min, descartando el sobrenadante, secando y resuspendiendo el pellet en 30 µL de agua np con 1 µL de RNasa A (1 mg/mL). La cuantificación de la extracción se llevó a cabo siguiendo los pasos de la sección 4.4, y la calidad e integridad de la extracción se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, en donde se observa la presencia de una banda de migración relativa muy baja.

4.10.- Reacción de PCR con el objetivo de amplificar el promotor PG desde DNA genómico.

La reacción se realizó en un volumen de 20 µL y la mezcla estaba compuesta por: 1X Buffer de reacción Taq Favorgen®; MgCl₂ 5 mM; dNTPs 0,2 mM, 0,5 µM de cada partidor (sección 4.8), 50 ng de DNA genómico; 1 U de Taq polimerasa Favorgen®. La reacción comenzó con 2 min en "Hot-Start" a 95° C y 1.5 min a 94 °C con Taq-polimerasa. Después de esto continuó con 35 ciclos a 94 °C por 50 s, 52 °C por 50 s y 72 °C por 1 min, finalizando con un ciclo a 72 °C por 10 min. El tamaño del amplificado esperado es de 818 pb, incluyendo los nucleótidos agregados en los partidores.

4.11.-Clonamiento del Promotor PG en vector bacteriano

El clonamiento del promotor PG fue realizado por la alumna Bárbara Núñez bajo la tutela la de doctora Claudia Stange.

Este paso fue realizado de la misma forma que en la sección 4.7. Las colonias que lograron crecer fueron incubadas en medio LB líquido siguiendo las especificaciones de la sección 4.1.3. El vector purificado por una mini-preparación de DNA plasmidial (sección 4.7.4), fue digerido por las enzimas *Bam*HI y *Spe*I (1X buffer de reacción, 50

ng de vector purificado, 2 U de enzima, incubado 1 h a 37 °C), los clones positivos fueron llamados pGemT-PG.

4.12.- Elaboración de cassettes de sobre-expresión de LeSDH en plantas.

4.12.1.- Clonación de LeSDH en el vector binario pCambia 1302

Los clones *DH5a* transformados con el vector pCambia 1302 fueron proporcionados por la Dra. Claudia Stange, Universidad de Chile. Este vector binario contiene una secuencia de selección bacteriana (kanamicina^R, Neomicina Fosfotransferasa II o *NPTII*) y un origen de replicación bacteriano pBR322. El T-DNA (DNA de transferencia) está flanqueado por las secuencias “T-border Left” y “T-border Right”, este incluye el gen de selección de plantas transformadas (hygromicina^R) controlado por el promotor constitutivo doble CaMV35S y el gen reportero GFP, controlado por el promotor constitutivo simple CaMV35S, un terminador NOS y secuencias de poli-adenilación.

La secuencia de LeSDH fue cortada del vector pGemT-LeSDH purificado, por una doble digestión con las enzimas *Eco91I* y *SpeI* (1X Buffer Tango, 500 ng del vector pGemT-LeSDH, 2 U de *Eco91I* y 2 U de *BcuI*, incubado 1 h a 37 °C). El vector binario pCambia 1302 fue digerido con las mismas enzimas.

La purificación de los fragmentos, la ligación y la transformación de *E. coli* cepa *DH5a* fue llevada a cabo de igual manera que en la sección 4.7. El medio de selección fue LB solido suplementado con kanamicina (100 mg/L), las colonias que crecieron fueron inoculadas en 5 mL de medio de selección liquido y crecidas toda la noche a 37 °C. Para analizar las colonias, se purificó el vector binario y se realizó una reacción de PCR para LeSDH usando el protocolo de la sección 4.6 empleando como molde 5 ng del producto

de la mini-preparación de DNA plasmidial. Para los controles negativos se usó como molde el vector pCambia 1302 sin modificar (35S-GFP). Los clones positivos fueron llamados pCambia-LeSDH (35S-LeSDH).

4.12.2.- Clonación del promotor PG en el vector binario pCambia 1302

El vector pCambia 1302 y el vector pGemT-PG fueron doble digeridos con las enzimas *SpeI* y *BamHI*, usando el protocolo de la sección anterior (4.12.1, usando buffer Tango).

La purificación de los fragmentos, ligación y transformación de *E. coli* cepa *DH5a* con la construcción se realizó de igual manera que en la sección 4.7.

El análisis de las colonias positivas se llevó a cabo mediante la extracción del vector por mini-preparación de DNA plasmidial y una reacción de PCR para el promotor PG usando el protocolo de la sección 4.8 y 5 ng del vector como templado. Los clones positivos fueron denominados pCambia-PG (PG-GFP).

4.12.3.- Clonación del promotor PG en la construcción pCambia-LeSDH (35S-LeSDH).

Se purificó los vectores pCambia-LeSDH (35S-LeSDH, sección 4.12.1) y pGemT-PG (PG-GFP, sección 4.12.2) mediante una mini-preparación de DNA plasmidial (sección 4.7.4). Estos vectores fueron digeridos con las enzimas *BamHI* y *SpeI* usando el protocolo de la sección 4.12.1. La purificación de los fragmentos de interés, su ligación y transformación de *E. coli* cepa *DH5a* con el vector resultante se realizó al igual que en la sección 4.7. Las colonias que crecieron en el medio de selección LB-kan, se analizaron mediante la extracción de su DNA plasmidial y una posterior reacción de PCR, tanto para LeSDH, como para el promotor PG, usando los protocolos nombrados

en las secciones 4.12.1 y 4.12.2 respectivamente. Los clones positivos fueron llamados pCambia-PG-LeSDH (PG-LeSDH).

4.13.- Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con los vectores pCambia 1302: PG-GFP, 35S-LeSDH y PG-LeSDH.

Este proceso fue independiente para cada vector. Se mezclaron 50 ng aproximadamente de cada vector, obtenidos mediante un mini-preparación de DNA plasmidial, con 100 μ L de células competentes de la cepa de *A. tumefaciens* GV3101, previamente descongeladas en hielo en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. La mezcla se congeló en nitrógeno líquido durante 5 min, luego se dejó descongelar a TA. Luego se le agregó 1 mL de medio líquido LB y se dejó crecer a 28 °C con agitación toda la noche. Al día siguiente se sedimentó las bacterias por centrifugación a 5000 x g por 5 min, se resuspendieron en 100 μ L de medio LB y se sembraron completamente en medio LB sólido, suplementado con kanamicina (100 mg/L,) para la selección de los vectores de interés, gentamicina (100 mg/L), para la selección del plásmido Ti y rifampicina (10 mg/L), para la selección cromosómica de la cepa GV3101. Se dejaron crecer por 2 días a 28 °C hasta que las colonias se hicieran visibles. El análisis de los clones positivos se llevó a cabo realizando una mini-preparación de DNA plasmidial (sección 4.7.4) y una reacción de PCR para LeSDH, promotor PG (sección 4.6 y 4.10) y el gen de resistencia para kanamicina (*NPTII*), que se encuentra en los vectores pCambia 1302 (Tabla II). Para este último se usó el protocolo de PCR para LeSDH, modificando únicamente la temperatura de apareamiento de los partidores a 55°C; el fragmento esperado es de 654 pb. Los clones positivos fueron almacenados en glicerol 20% a -80 °C.

4.14.- Análisis de expresión de LeSDH y funcionalidad del promotor PG en frutos de duraznos transformados transitoriamente con los vectores elaborados.

4.14.1.- Transformación transitoria de frutos de duraznos y tomate con *Agrobacterium tumefaciens*.

Los clones de *A. tumefaciens* positivos de la sección 4.12 (PG-LeSDH, PG-GFP, 35S-LeSH) fueron crecidos en medio LB liquido suplementado con kanamicina (100 mg/L), gentamicina (100 mg/L) y rifampicina (10 mg/L) durante 1 día a 28°C con agitación hasta una densidad óptica entre 0,6 y 0,8 a una longitud de onda de 600 nm. Las bacterias se sedimentaron centrifugándolas a 5000 x g por 5 min y se resuspendieron hasta una densidad óptica de 1.0, en un medio de infiltración (MMA), que consiste en 0,5 X MS, MES 10 mM (pH 5,6), sacarosa 20 g/L y acetosiringona 200 µM. Esta suspensión bacteriana se usó para agro-inyectar frutos de durazno (Caroca, 2007), haciendo uso de una jeringa de 1 mL con aguja. Cada fruta se transformó con una construcción distinta (PG-LeSDH o PG-GFP o 35S-LeSDH). Se inyectó alrededor de 3 mL por durazno, marcando la zona de la superficie del fruto en donde la aguja penetró. En el caso de la transformación de tomate, el método fue el mismo, pero teniendo cuidado de inyectar al fruto en el tejido del pericarpo, penetrando aproximadamente 3 mm desde la cascara. Se mantuvieron los frutos de durazno y tomate a TA durante 4 días, pasado este tiempo se cosechó el tejido agro-inyectado para los análisis posteriores. En ninguno de los casos se agro-inyectó todo el tejido del fruto, debido a que el tejido sin infiltrar fue utilizado como control.

4.14.2.- Análisis por microscopia de fluorescencia de la expresión de GFP controlado por el promotor PG.

El análisis de la funcionalidad del promotor PG se realizó usando el cassette de expresión PG-GFP. Mediante *A. tumefaciens* transformada con este vector, se agro-inyectó frutos de tomate y durazno usando el método de la sección anterior (4.14.1). Se realizaron cortes muy finos del tejido agro-inyectado de los frutos, luego de los 4 días de incubación a TA. Estas muestras fueron observadas bajo un microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS IX70). Para los controles negativos se usó tejido sin agro-inyectar y tejido transformado con pCambia-LeSDH. El control positivo se realizó transformando los frutos con el vector pCambia 1302 (35S-GFP).

4.14.3.- Extracción de RNA total de frutos de durazno (*Prunus persica* var. nectarina) y análisis de expresión de LeSDH por RT-PCR.

La extracción de RNA total a partir de frutos de duraznos, se realizó mediante el protocolo descrito por Meisel y col. (2005). Se pesó 4 g de tejido del mesocarpo agro-inyectado de cada fruto de durazno transformado, para luego congelarlos con nitrógeno líquido y en un mortero, previamente esterilizado, se maceró hasta quedar un polvo muy fino. Luego en un tubo de 50 mL, se recolectó el polvo generado y se le agregó 10 mL de buffer de extracción [CTAB 2% (p/v), PVP (PM 40.000) 2% (p/v), Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2M, espermidina trihidrocloruro 0,05%] previamente calentado a 65 °C. La mezcla se incubó a 65 °C por 15 min, agitándola en un vortex 3 o 4 veces durante el proceso. Luego se realizó una extracción con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se agitó vigorosamente en un vortex y se

centrifugó a 12000 x g a 4 °C por 30 min. Sobre la fase acuosa resultante, se realizó una nueva extracción tal como la anteriormente descrita. La fase acuosa recuperada fue mezclada con 0.25 volúmenes de LiCl 10 M en agua DEPC incubando la mezcla toda la noche a 4 °C. El día siguiente se centrifugó durante 30 min a 12000 x g a 4 °C, para precipitar todo el RNA. Eliminando el sobrenadante el pellet fue resuspendido en 500 µL de buffer SSTE [NaCl 1M, SDS 0,5% (p/v), Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1mM] y transferido a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. A la mezcla se le agregó 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) agitandola vigorosamente en un vortex y centrifugandola por 10 min a 12000 x g, recuperando la fase acuosa en otro tubo. La precipitación del RNA total se realizó añadiéndole 2 volúmenes de etanol absoluto preenfriado e incubándolo 10 min a -80 °C. Luego se prosiguió a centrifugar por 20 min a 12000 x g a 4 °C. El pellet fue lavado con 500 µL etanol 70% en agua DEPC, centrifugado durante 10 min a 12000 x g a 4 °C y secado a TA. El pellet fue resuspendido en 20 µL de agua DEPC y guardado a -80 °C. La cuantificación y el análisis de calidad e integridad se llevaron a cabo de la misma manera que en la sección 4.4. Para el análisis de la expresión de LeSDH en frutos de durazno, se realizó un RT-PCR empleando la metodología descrita en las secciones 4.5 y 4.6. Paralelamente se realizó un análisis de la calidad del RNA efectuando una reacción de RT-PCR para GAPA (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, Número de Acceso At3g26650; Tabla II). La cuantificación y determinación de pureza de la extracción se realizó de la misma manera que en la sección 4.4. Para el control negativo técnico, en la reacción de PCR de LeSDH, se usó como molde la extracción de RNA directamente. Con esto último se pudo descartar la contaminación con DNA genómico y/o plasmidial que pudo ser

arrastrado en la extracción de RNA y por consiguiente haber interferido con los resultados obtenidos.

4.14.4.- Extracción cruda de proteínas desde frutos de duraznos transformados transitoriamente

La extracción cruda de proteínas se llevó a cabo en base al procedimiento descrito por Lo Bianco y Reiger (1998). Se extrajo 5 g de tejido del mesocarpo de durazno 4 días después de la agro-inyección con las diferentes construcciones, para el control negativo se usó el tejido del mismo fruto que no estuvo en contacto con la suspensión de *A. tumefaciens* (sección 4.14.1). Estos fueron macerados en un mortero, previamente enfriado a 4 °C, en presencia de 5 mL de buffer de extracción B [Tris-HCl 0,1 M (pH 9 a 25 °C) y glicerol 8% (v/v)] y 5 mL de una solución de Tween-20 0,1% (v/v), PVPP 1% (p/v), que fue agregada durante el procedimiento. Cuando se logró homogenizar completamente el tejido, la mezcla resultante fue filtrada a través de una gaza y posteriormente vertida en un tubo de vidrio de 30 mL, para centrifugarla a 20000 x g por 15 mins a 4 °C. Finalmente el sobrenadante fue desalinizado, usando una columna de Sephadex G-25 (96 % rendimiento de proteína) para eliminar pequeñas moléculas, azúcares, nucleótidos, etc.

4.14.5.- Cuantificación de proteínas usando el método de BCA (bicinchoninic acid)

La cuantificación proteica del extracto desalinizado de la sección 3.14.4 se llevó a cabo mediante el kit Protein Determination Bicinchoninic Acid Method (SIGMA). Las soluciones necesarias fueron: "Bicinchoninic Acid Solution", Sigma N° de catalogo B-

9643; de sulfato de cobre pentahidrato 4% (p/v), agua np y BSA (Bovine serum albumin) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La cuantificación se realizó en una placa de ELISA, donde se colocaron las distintas diluciones, en diferentes pocillos. En cada uno se colocó la muestra a analizar (curva de calibración o muestras diluidas) y se completó con agua np hasta los 20 μL , siendo este valor el máximo de volumen a medir según este procedimiento. Posteriormente se le añadió 180 μL de una solución de BCA/ CuSO_4 4% (50:1) y dejándolo incubar por 15 min a 37 °C.

La curva de calibración se realizó agregando 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 15 μL de la solución de BSA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se completó con agua np hasta 20 μL . Para las muestras de extracto crudo se midió 1, 2 y 3 μL de estos y al igual que la curva se completó hasta los 20 μL con agua np.

Después de los 15 min a 37 °C la medición colorimétrica se realizó con un espectrofotómetro de placa de ELISA midiendo la absorbancia de cada pocillo a 562 nm.

4.14.6.- Ensayo de actividad de la enzima sorbitol deshidrogenasa.

Cuando la enzima SDH oxida sorbitol a fructosa, reduce una molécula de NAD^+ a NADH. Este último absorbe a 340 nm, y por lo tanto, se puede seguir la reacción en un espectrofotómetro por el aumento de absorbancia a esta longitud de onda.

La mezcla realizada para el ensayo tenía un volumen final de 3 mL. Ésta estaba compuesta por 2,3 mL de buffer Tris-HCl 0.1 M (pH 9.0); 50 μL de NAD^+ 32 mM y 150 μL del extracto desalinizado (Gerlach, 1984 y Lo Bianco, 1998). La mezcla sin sorbitol fue incubada por 5 min a TA para estabilizar la reducción de NAD^+ por contaminantes en el extracto. La reacción se inició con la adición de 500 μL de una

solución de sorbitol 20 % (p/v) en agua np. La medición se efectuó durante 5 min en un espectrofotómetro termo-regulado a 25 °C.

La unidad de actividad enzimática se define como; la cantidad de enzima cual produce 1 μmol de NADH por minuto a 25 °C y pH 9.0 bajos las condiciones mencionadas.

Para el cálculo de las unidades de enzima por mL de extracto se uso la ecuación 1 y 2

Ecuación 1

$$\text{Actividad por volumen (U/mL)} = \Delta A_s \times 3.0 \text{ (mL)} / [6.2 \times 10^{-3} \text{ (cm}^2\text{/mmol)} \times 0.15 \text{ (mL)}]$$

Ecuación 2

$$\text{Actividad por miligramos de proteína total (U/mg)} = (\text{U/mL})/C$$

Donde ΔA_s , es el cambio de absorbancia por min; 6.2×10^{-3} (cm²/mmol), es el coeficiente de extinción micromolar; C es la concentración de proteínas totales en el extracto desalinizado, calculado en la sección 4.14.5. El control negativo de sobre-expresión (actividad basal) se realizó usando el extracto proteico desalinizado del tejido del fruto sin agro-inyectar para cada muestra.

Para analizar el aumento de actividad se comparó pareadamente la actividad específica de las muestras transformadas, con pCambia 35S-LeDH y su control negativo; y pCambia PG-LeSDH y su mismo control. Las muestras se analizaron en triplicados y las pruebas estadísticas usadas fueron T de Student y Z-test usando niveles de significación de 0,05 y 0,95 respectivamente.

5.- RESULTADOS

5.1.-Estrategia de clonación

La clonación de LeSDH en pCambia 1302 y la construcción del vector PG-LeSDH siguieron una serie de pasos lógicos, los cuales fueron verificados mediante PCR y ensayos de digestión. El diseño de los partidores permitió orientar la dirección de clonamiento, dejando a LeSDH bajo el control del promotor fruto-específico PG. El clonamiento siguió la estrategia esquematizada en la Figura 2.

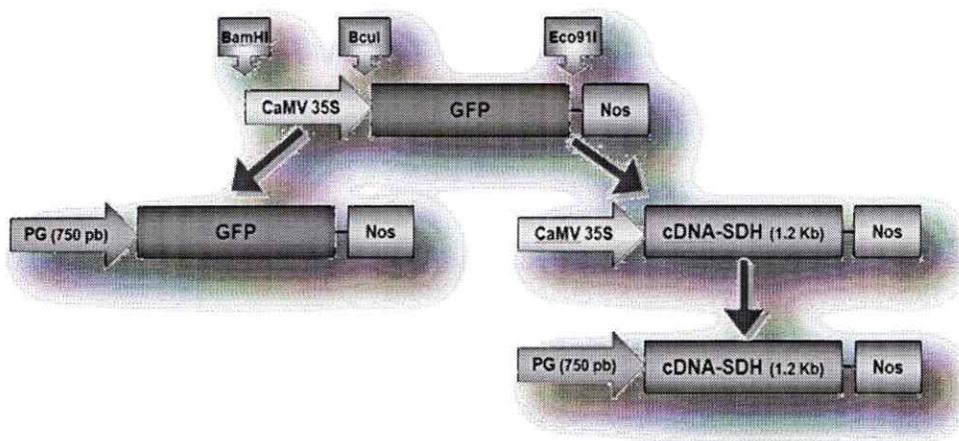


Figura 2: Estrategia usada para la construcción del cassette de expresión fruto-específico de LeSDH. En primera instancia, se comenzó con el vector pCambia 1302 (35S-GFP), continuando con los clonamientos subsiguientes. Nos, terminador nopaline sintetasa para expresión en plantas; CaMV 35S, promotor constitutivo, para expresión en plantas, del virus del mosaico de la coliflor; GFP, proteína fluorescente verde; PG, promotor del gen de la poligalacturonasa de tomate; cDNA-SDH, cDNA de la sorbitol deshidrogenasa de tomate, LeSDH.

5.2.-Clonación del cDNA de LeSDH.

Con el objetivo de amplificar el cDNA de LeSDH para su clonamiento en un vector bacteriano (pGEM[®]-T Easy), se extrajo RNA total desde hojas de tomate (sección 3.3; Ohta y col. 2005). Al comprobar la calidad de las extracciones por electroforesis, se encontró que 5 de las 6 muestras extraídas mostraron las bandas características de RNA ribosómico 28S y 18S (Figura 3). Probablemente por problemas en la homogenización del tejido la muestra 3 no mostró producto alguno. Las bandas de 28S de las muestra 5 y 6 aparecen muy tenues y se revelan más claramente al aumentar el contraste de la fotografía. La cuantificación de las extracciones obtenidas reveló concentraciones de RNA entre 400 y 1000 ng/ μ L (sección 4.4).

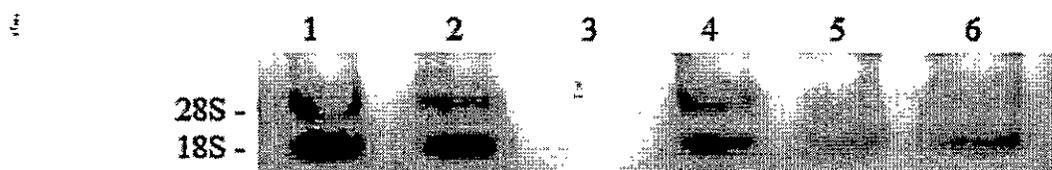


Figura 3: Determinación de la integridad del RNA total extraído de hojas de tomate por electroforesis. Se puede apreciar las bandas de RNA ribosómico 28S y 18S para 5 de las 6 muestras.

Se realizaron reacciones de transcripción reversa (RT) usando el partidador 3' oligo(dT) y 2 μ g de RNA. Reacciones de PCR utilizando partidores específicos para GAPA (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa), un gen que se expresa en forma constitutiva y se encuentra altamente conservado en plantas, mostraron que el cDNA generado fue de buena calidad (sección 4.5; datos no mostrados).

Para amplificar el cDNA de LeSDH, a la vez agregando sitios de restricción para los pasos de clonación subsiguientes (5'*Spe*I, 3'*Eco*91I), fue necesario optimizar las condiciones de PCR, específicamente la temperatura de apareamiento de los partidores.

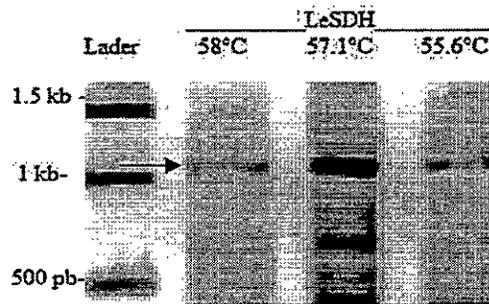


Figura 4: Optimización de condiciones de PCR para amplificar LeSDH. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestran los productos de PCR al amplificar el cDNA de LeSDH a tres distintas temperatura de apareamiento. Se utilizó partidores, 5' *Spe*I y 3' *Eco*91I (Tabla II). Se aprecia que a 58 °C, se amplifica el producto esperado (1089 pb) y que hay menos productos inespecíficos.

A 58 °C en esta etapa, se obtuvo un amplificado que concuerda con el tamaño esperado (1089 pb), con pocos amplificados inespecíficos (Figura 4). Las diferencias en la cantidad de productos observados en la figura 4 fueron ocasionadas por problemas en la carga del gel. A temperaturas de apareamiento mayores, no se generaban productos detectables (datos no mostrados). Por lo tanto se determinó que 58°C es la temperatura de apareamiento óptima para una específica amplificación del cDNA de LeSDH.

Usando el sistema pGEM[®]-T Easy (Promega) se clonó el cDNA de LeSDH, transformando posteriormente bacterias competentes *E. coli* cepa *DH5α* mediante shock térmico. Cinco colonias que crecieron en el medio de selección (ampicilina, 100mg/L) fueron analizadas extrayéndoles el DNA plasmidial y realizando ensayos diagnósticos con endonucleasas (*Pst*I, *Eco*RI y *Hind*III; Figura 5).

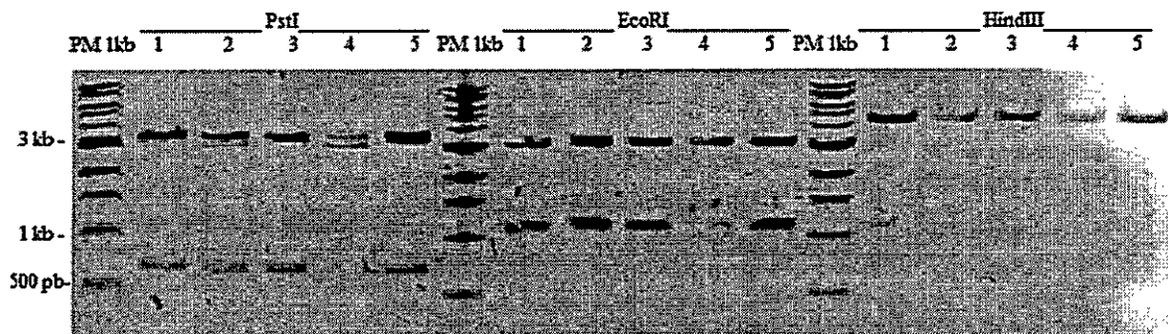


Figura 5: Análisis de restricción de LeSDH clonado en pGEM-T Easy. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestra la digestión total de cinco mini-preparaciones de pGem-T LeSDH. *PstI* corta en el vector y dentro del inserto liberando un fragmento de 600 pb, *EcoRI* corta flanqueando el inserto liberando un fragmento de ~1 kb y *HindIII* lineariza el vector, cortando solo dentro del inserto, PM estándar de peso molecular de 1 kb.

La enzima *PstI* corta a 419 pb desde el codón de inicio del cDNA de LeSDH y además a 88 pb desde el inicio del promotor SP6 en el vector pGem-T Easy. Si la dirección del inserto era T7 a SP6 en el vector, la banda liberada tendría un tamaño de aproximadamente 600 pb, siendo éste el resultado de la prueba (Figura 5).

La enzima *EcoRI* fue utilizada debido a que flanquea próximamente al inserto. Cortando con esta enzima se libera completamente el cDNA de LeSDH del vector (~1kb). La enzima *HindIII* no corta en el vector, pero si una vez en el inserto. La prueba fue positiva para las tres endonucleasas: liberando un fragmento de 600 pb, cortando con *PstI*; liberando un fragmento de aproximadamente 1kb, cercano al tamaño del cDNA de LeSDH, cortando con *EcoRI*; y dejando el vector en forma lineal, cortando con *HindIII* (Figura 5). pGEM[®]-T Easy en forma circular migra en el gel de agarosa entre 2 y 3 kb, dependiendo de su grado de sobre-enrollamiento (Figura 6).

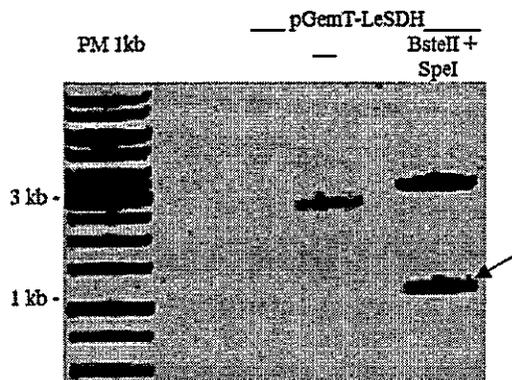


Figura 6: Digestión de pGemT-LeSDH con las enzimas *BstEII* (*Eco91I*) y *BcuI* (*SpeI*). Al digerir este vector se liberó el inserto de ~1 kb. El control negativo (carril -) fue el vector pGemT-LeSDH sin digerir. La flecha indica el fragmento de ~1 kb, que contiene la secuencia del cDNA de LeSDH.

Otra prueba realizada fue efectuar una reacción de PCR, usando como molde el vector pGemT-LeSDH purificado, para amplificar LeSDH. Las 5 colonias analizadas dieron positivo para esta prueba (datos no mostrados), y se seleccionó una para secuenciarla. Usando los partidores T7 y SP6 estandarizados para pGem-T, se secuenció el pGemT-LeSDH clon 1, y se comparó los resultados obtenidos con la base de datos. Los resultados mostraron un 99% de identidad con LeSDH, número de acceso AB183015, a nivel de nucleótidos y 100% a nivel de aminoácidos.

Se digirió pGemT-LeSDH clon 1 con las enzimas *Eco91I* y *SpeI*, para liberar el cDNA de LeSDH (Figura 6). Paralelamente también se digirió, con las mismas enzimas, el vector pCambia 1302 (35S-GFP) purificado desde *E. coli*. En el caso de pGemT-LeSDH se purificó desde el gel de agarosa el fragmento de ~ 1 kb (Figura 6), y para el caso de pCambia 1302 se purificó el vector lineal desde el gel de agarosa, descartando el fragmento liberado que codifica para GFP. La ligación y la transformación de *E. coli* se llevó a cabo de igual manera que los pasos anteriores. Las colonias que crecieron en medio LB suplementado con kanamicina (100 mg/L), fueron analizadas mediante PCR

usando los partidores para LeSDH (Figura 7). El molde usado para la reacción fue el producto de una mini-preparación de las colonias crecidas. Los clones positivos fueron llamados pCambia-LeSDH (35S-SDH).

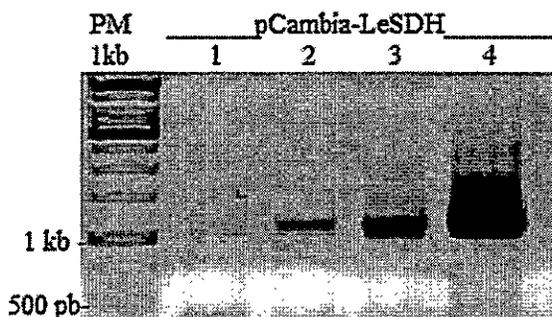


Figura 7: Productos de PCR de pCambia-LeSDH. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestran los productos del PCR con la confirmación de la presencia de LeSDH en pCambia 35S-LeSDH. Se utilizó partidores para amplificar LeSDH (Tabla II) y las 4 colonias analizadas resultaron positivas. El control negativo se realizó usando como templado el vector pCambia1302 sin LeSDH (no mostrado).

5.3.-Clonación del Promotor PG

Con el fin de obtener el promotor PG, se extrajo de DNA genómico desde hojas de tomate (Doyle y Doyle, 1988). Para analizar las colonias transformadas con pGemT-PG, se les realizó una mini-preparación para posteriormente realizar un ensayo con endonucleasas (*Bam*HI y *Spe*I; Figura 8) y una reacción de PCR con partidores para amplificar el promotor PG (Tabla II; datos no mostrados). El fragmento liberado producto de la digestión con las enzimas mencionadas fue purificado desde el gel de agarosa, para clonarlo en pCambia 1302 (35S-GFP) digerido con las mismas enzimas.

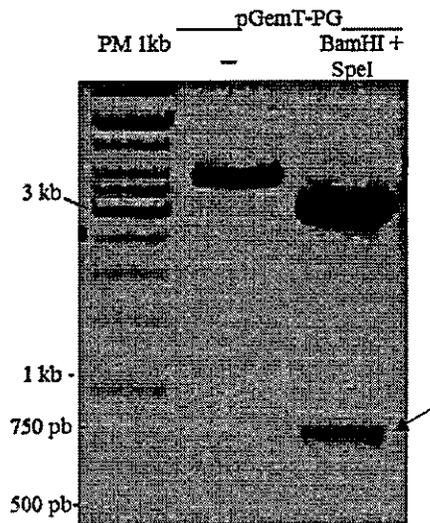


Figura 8: Digestión de pGemT-PG con las enzimas *Bam*HI y *Spe*I. El control negativo es el vector digerido con sólo con la enzima *Bam*HI. La Flecha indica el fragmento liberado que contiene la secuencia del promotor PG.

Las bacterias transformadas con el resultado de la ligación del promotor PG y el vector 35S-GFP fueron sembradas en medió LB suplementado con kanamicina (100 mg/L). Una de las colonias que creció fue analizada mediante PCR usando los partidores para el promotor PG, y como molde, el producto de las mini-preparaciones del clon (Figura 9).

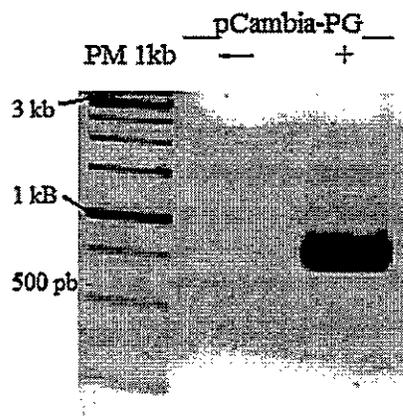


Figura 9: Amplificación del promotor PG clonado en pCambia1302. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestra el producto PCR para el promotor PG. Se utilizaron los partidores para amplificar el promotor PG (Tabla II). La colonia analizada resulto ser positiva. El control negativo (carril -) fue el usando como templado el vector pCambia 1302 (35S-GFP) sin PG.

Al clon analizado se denominó pCambia-PG (PG-GFP), el cual se utilizó como control para el funcionamiento del promotor PG, midiendo la fluorescencia de GFP, gen reportero rio abajo del promotor (sección 4.14.2).

5.4.-Construcción del vector pCambia PG-SDH

Usando los vectores construidos anteriormente (pCambia 35S-SDH y pGem-T PG) se prosiguió a clonar el promotor PG en el vector pCambia 35S-SDH para obtener LeSDH bajo el control del promotor fruto-especifico PG (pCambiaPG-SDH) siguiendo la estrategia esquematizada (Figura 2). Realizando una mini-preparación se purificó el vector pCambia35S-SDH, posteriormente se digirió con las endonucleasas *Bam*HI y *Spe*I y se purificó el fragmento correspondiente al vector lineal sin el promotor 35S (806 pb). Asimismo se digirió el vector pGemT-PG con las mismas enzimas, purificando el fragmento del promotor PG. Luego se realizó una ligación con los fragmentos purificados y se transformaron bacterias *E. coli* dejándolas crecer en medio LB suplementados con kanamicina (100 mg/L). Las colonias se analizaron mediante PCR tanto para LeSDH como para el promotor PG, usando como molde las mini-preparaciones realizadas a cuatro clones (Figura 10). Las colonias analizadas resultaron ser positivas, al tener el vector pCambia 1302 que contiene el cDNA de LeSDH y el promotor PG. Estos clones se llamaron pCambia PG-LeSDH o simplemente PG-LeSDH. Para el control negativo se usó el vector pCambia 1302 como molde de reacción (datos no mostrados).

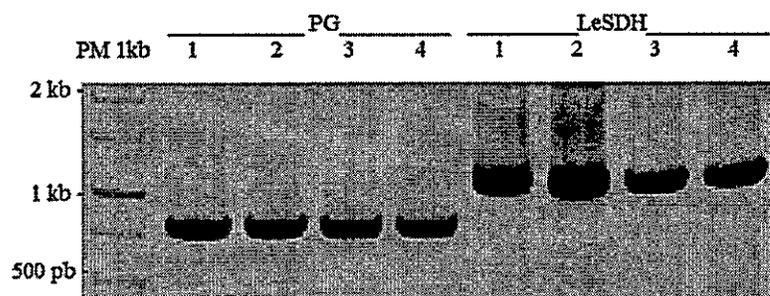


Figura 10: Comprobación por PCR de la construcción pCambia PG-SDH. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestran los resultados de las reacciones de PCR para el promotor PG y LeSDH (Tabla II), usando como molde 4 colonias distintas del vector pCambia-PG-LeSDH.

5.5.-Análisis de *Agrobacterium tumefaciens* transformados con pCambia 35S-SDH, PG-GFP o PG-SDH.

Se transformaron, en forma separada *A. tumefaciens* cepa GV3101 con los vectores pCambia35S-SDH (sección 5.2), pCambia PG-GFP (sección 5.3) o pCambia PG-SDH (sección 5.4). Las bacterias fueron crecidas en medio LB suplementado con kanamicina (100 mg/L), gentamicina (100 mg/L) y rifampicina (10 mg/L). Para verificar la transformación exitosa de las bacterias, se les realizó una mini-preparación para analizarlas. Las mini-preparaciones realizadas a *A. tumefaciens* extraen muy poco DNA plasmidial, debido principalmente al bajo número de copias en las células. Por esta razón el análisis se realizó mediante reacciones de PCR para LeSDH, el promotor PG y además para el gen de resistencia a kanamicina, *NPTII* (sección 4.13) presente en el vector pCambia 1302. Mediante esta técnica se verificó la presencia de los vectores en *A. tumefaciens* (Figura 11)

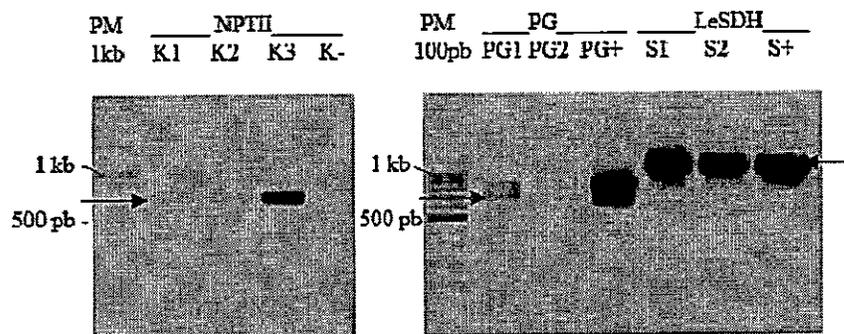


Figura 11: Confirmación de la presencia de los vectores binarios en *Agrobacterium tumefaciens* mediante PCR. Geles de agarosa con bromuro de etidio en que se muestran los productos de PCR realizados con los vectores pCambia 35S-SDH, pCambia PG-GFP y pCambia PG-SDH obtenidos de *Agrobacterium tumefaciens*. Se amplificó el gen de resistencia de kanamicina (*NptII*), SDH y PG (Tabla II). **K1:** *NptII* en pCambia PG-LeSDH, **K2:** *NptII* en pCambia 35S-LeSDH, **K3:** *NptII* en pCambia PG-GFP, **PG1:** PG en pCambia PG-LeSDH, **PG2:** PG en pCambia PG-GFP, **S1:** SDH en pCambia PG-LeSDH, **S2:** SDH en pCambia 35S-LeSDH. PG+ y S+ son los controles positivos para el promotor PG y LeSDH respectivamente. **-K:** es el control negativo para NPTII. Las flechas rojas muestran el amplificado para *NPTII* y PG respectivamente. Cuando los pocillos del gel no están completamente perpendiculares a la dirección del campo eléctrico generan bandas anchas, como las mostradas en esta figura.

5.6.-Análisis de funcionalidad del promotor PG

Para evaluar la funcionalidad de los vectores construidos fue necesario usar un fruto modelo. Como LeSDH proviene de tomate, usar esta fruta como modelo implica correr el riesgo de que el silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) afecte los análisis funcionales de expresión y actividad. Por esta razón, el fruto de durazno es un buen modelo alternativo para las pruebas requeridas (Caroca, 2007). Además, métodos de extracción de RNA y proteínas están bien descritos para esta fruta (Meisel y col, 2005; Lo Bianco y col, 1998), como también la técnica de agro-inyección (Caroca, 2007).

En primera instancia, se constató la funcionalidad del promotor PG. Para esto, se agro-inyectó frutos de tomate y durazno con los vectores PG-GFP, 35S-GFP y 35S-LeSDH;

estos dos últimos usados como control positivo y negativo respectivamente. Se realizaron cortes delgados del tejido agro-inyectado y se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia para detectar la fluorescencia de GFP (sección 4.14.2; Figura 12). Bajo el microscopio de epifluorescencia, se observó alta intensidad de fluorescencia para GFP en los tejidos del pericarpo de tomate y durazno, después de 4 días de la agro-inyección. Entre los frutos transformados transitoriamente con PG-GFP y 35S-GFP no se encontraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia. En cambio con el fruto transformado con 35S-LeSDH, la fluorescencia fue tan baja que la cámara utilizada no logró detectarla, obteniendo fotos muy oscuras y de baja resolución. Cabe destacar que no se encontró diferencia en la fluorescencia entre el tejido transformado con 35S-LeSDH y el tejido no agro-inyectado (datos no mostrados). La imposibilidad de observar células independientes se debe al grosor de los cortes. Estos resultados confirman que el promotor PG puede guiar la expresión de genes en frutos.

5.7.-Análisis molecular de la expresión de LeSDH en frutos de durazno.

Luego de comprobar la funcionalidad de los promotores, se determinó la expresión del mRNA de LeSDH mediante RT-PCR. Para ello, se transformaron frutos de durazno con los vectores pCambia 1302-35S-LeSDH, PG-LeSDH y PG-GFP, este último usado como control negativo para la expresión de LeSDH. Se extrajo el RNA total de los tejidos agro-inyectados (sección 4.14.3), cuantificándolos y determinando su integridad por electroforesis (Figura 3; datos no mostrados). Luego de realizar la reacción de RT con el partidor oligo-dT, se comprobó que la calidad del cDNA total fue buena usando la expresión de GAPA (sección 4.5; datos no mostrados).

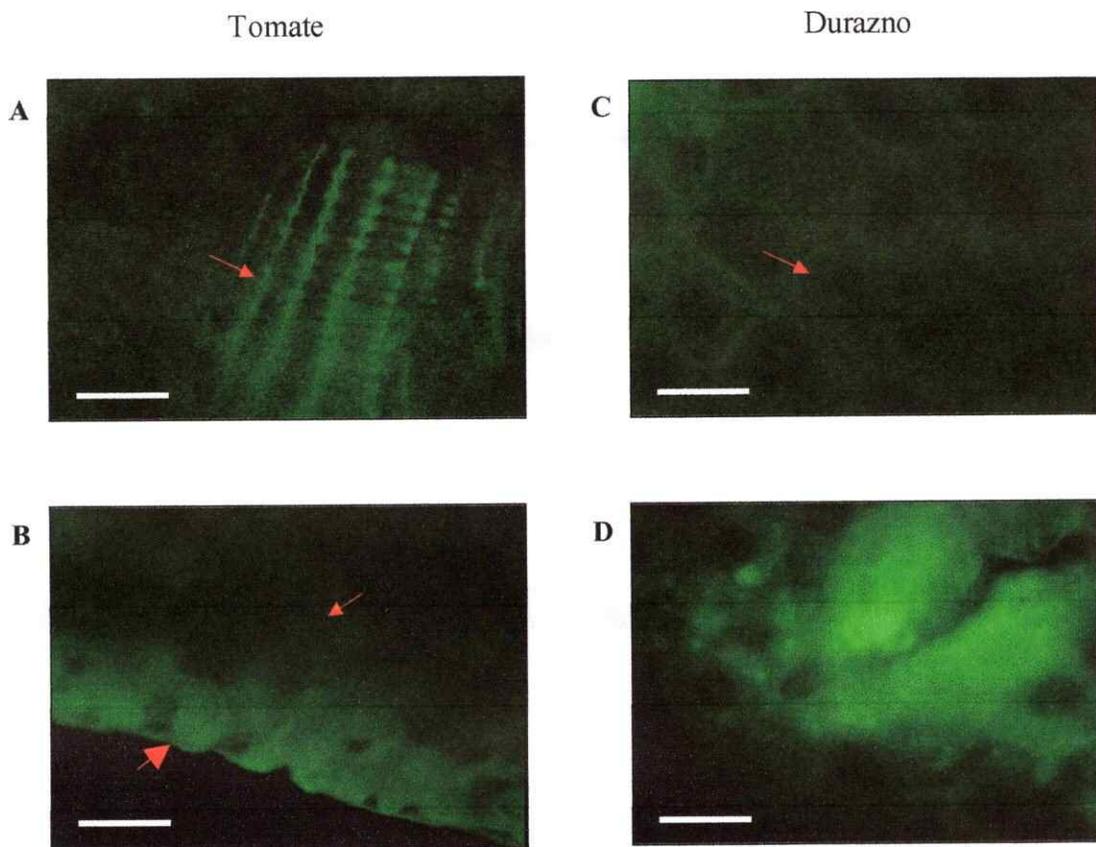


Figura 12: Comprobación de la funcionalidad del promotor PG mediante transformación transitoria de frutos. Fotos obtenidas luego de 4 días después de la agro-inyección. **A:** Tomate transformado con *A. tumefaciens* portando el vector pCambia 35S-GFP (flecha, fibras del pericarpo). **B:** Tomate transformado con pCambia PG-GFP, (flecha grande, células del exocarpo; flecha pequeña, células del pericarpo). **C:** Durazno transformando con pCambia 35S-GFP, (flecha, célula del exocarpo). **D:** Durazno transformado con pCambia PG-GFP, tejido del pericarpo. Las fotografías están aumentadas 600 veces, la barra blanca equivale a 20 μm .

A continuación, se realizó la reacción de PCR utilizando partidores para amplificar LeSDH. Los resultados revelaron la expresión de LeSDH mRNA en duraznos agro-inyectados con 35S-LeSDH y para PG-LeSDH después de 4 días de la agro-inyección. No se detectó expresión para los frutos transformados con el vector PG-GFP, confirmando la especificidad de los partidores usados para LeSDH, al no amplificar el SDH endógeno del durazno, ni ningún otro gen (Figura 13). Como controles negativos

para la reacción se usó como molde la extracción de RNA en forma directa; al no tener un amplificado, se dedujo que no había contaminación de DNA plasmidial y genómico en las muestras de RNA (datos no mostrados).

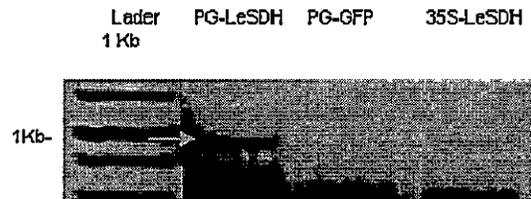


Figura 13: Amplificación del cDNA de LeSDH en duraznos agro-inyectados con los vectores desarrollados. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestran los resultados de la reacción RT-PCR de duraznos agro-inyectados con pCambia PG-SDH, PG-GFP o 35S-SDH 4 días previamente. Se utilizó partidores para amplificar LeSDH (Tabla II). La flecha roja indica el amplificado de la reacción PCR, que corresponde a LeSDH.

5.8.-Análisis bioquímico de la expresión de LeSDH en fruto de durazno.

El siguiente paso fue la medición de la actividad de sorbitol deshidrogenasa en los frutos transformados en forma transitoria. Usando los vectores 35S-LeSDH o PG-LeSDH se agro-inyectó, de forma independiente, sectores demarcados en frutos de durazno (sección 4.14.1). La intención era usar el tejido no agro-inyectado del mismo fruto como control de actividad basal y compararlo con el tejido transformado por cada uno de los vectores mencionados. Tres frutos fueron agro-inyectados con el vector 35S-LeSDH y tres con el vector PG-LeSDH. Después de 4 días, se prosiguió a realizar una extracción cruda y desalinizada de proteínas desde los tejidos agro-inyectados y de tejidos no-agro-inyectados (sección 4.14.4). Es decir, para cada vector, se obtuvo tres extractos independientes y tres extractos que actuaron como control. Inmediatamente, con estos extractos se realizaron ensayos de actividad usando sorbitol como sustrato y NAD⁺

como coenzima; la reducción de éste a NADH fue seguida en un espectrofotómetro a 340 nm. La tabulación de los datos se realizó en forma pareada para los frutos agro-inyectados con 35S-LeSDH o PG-LeSDH. Se graficó el promedio de la actividad específica ($\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) para 35S-LeSDH, PG-LeSDH y los controles correspondientes para cada uno (Figura 14). Para los cálculos se utilizó las ecuaciones 1 y 2.

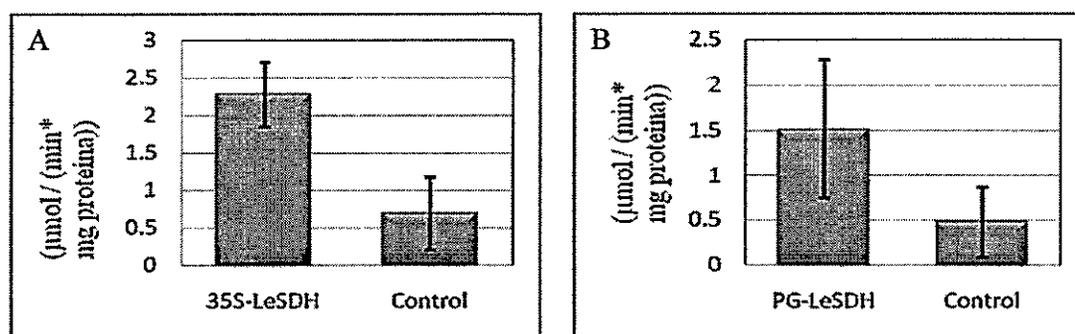


Figura 14: Actividad de sorbitol deshidrogenasa en duraznos expresando LeSDH en forma transitoria. A: Actividad de tejido agro-inyectado con el vector 35S-LeSDH, usando como control el tejido no agro-inyectado. **B:** Actividad del tejido agro-inyectado con el vector PG-LeSDH, usando el mismo control que en A. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de los ensayos realizados ($n = 3$).

Gráficamente se destaca un incremento en la actividad SDH en los tejidos agro-inyectados, tanto para 35S-LeSDH como para PG-LeSDH. Para los tres ensayos, la actividad medida en los tejidos agro-inyectados siempre fue mayor que el control correspondiente. Por otro lado, si se compara la actividad de los tejidos transformados con el vector 35S-LeSDH y PG-LeSDH, se observa que el primero presenta una mayor actividad y una menor variación en los datos.

Con el objetivo de averiguar el efecto de la agro-inyección en la actividad SDH (aumento o disminución) en el fruto de durazno, se transformó un fruto transitoriamente con el vector PG-GFP. Se repitió el mismo ensayo realizado con los otros dos vectores, usando como control el tejido no transformado. Las pruebas revelaron que no hubo variaciones significativas entre las muestras analizadas, descartando cualquier efecto que la agro-inyección tenga en la actividad SDH endógena de los frutos de durazno (datos no mostrados). La veracidad estadística de los datos obtenidos se comprobó realizando una prueba T (T de Student), comparando los datos de forma pareada. Además, se realizó una prueba Z de una cola, usando el promedio y las desviaciones estándar calculadas (Tabla III). Con los datos obtenidos se asume, con más de un 95% de confianza, que existe un aumento de la actividad SDH a causa de la transformación transitoria de de frutos de durazno con las construcciones realizadas.

Tabla III: Probabilidades asociadas a las pruebas T y Z. La prueba T entrega la probabilidad de que dos muestras puedan proceder de dos poblaciones subyacentes con igual media. La prueba Z entrega la probabilidad de que la media de la muestra sea mayor que el promedio de las observaciones del conjunto control. Los valores de significancia usados fueron 0.05 para la prueba T y 0.95 para la prueba Z.

Ensayos	Prueba T	Prueba Z
35S-LeSDH vs Control	0.023	1.000
PG-LeSDH vs Control	0.032	0.990

6.-DISCUSIÓN

La estrategia desarrollada en este seminario de título buscaba no sólo la construcción de vectores binarios para la sobre-expresión de sorbitol deshidrogenada de tomate (LeSDH), sino también determinar la expresión de éste y medir la actividad SDH usando el durazno como fruta modelo. Estos dos puntos son críticos para verificar y constatar lo que se planteó como estrategia para aumentar el dulzor en los frutos de manzano.

En el proceso de clonación del cDNA de LeSDH, se optimizó el protocolo de PCR para la amplificación específica de este cDNA, pues fue posteriormente uno de los métodos en la verificación del clonamiento del cDNA de LeSDH. Además, dado que la secuencia nucleotídica del SDH de durazno (Yamada y col. 2001) posee un 79% de identidad con LeSDH (datos no mostrados) fue esencial poder distinguir entre LeSDH y SDH de durazno mediante RT-PCR en los frutos agro-inyectados. La principal condición que se optimizó fue la temperatura de apareamiento (hibridación de partidores con la hebra templado), aunque las concentraciones de los partidores y de $MgCl_2$ también fueron modificadas extensivamente.

La secuenciación del cDNA de LeSDH se realizó en el vector pGem-T usando los partidores T7 y SP6. Las variaciones en los nucleótidos entre la secuencia clonada y la secuencia depositada en la base de datos (Número de acceso AB183015; www.ncbi.nlm.nih.gov), podrían corresponder a posibles errores introducidas por la enzima *Taq* polimerasa. Alternativamente diferencias en la variedad de tomate podrían explicar las variaciones encontradas. La secuencia depositada bajo el número de acceso AB183015

proviene de la variedad 'Momotaro' (Ohta y col., 2005), mientras en este seminario de título se usó la variedad Ailsa Craig. Sin embargo, es importante destacar que ninguna de estas diferencias modificó la secuencia aminoacídica.

Respecto al promotor PG, el vector pGemT-PG no fue secuenciado. Sin embargo, cabe mencionar que mutaciones puntuales no afectan en gran medida el funcionamiento del promotor. En cambio, pérdidas de fragmentos superiores a 100 pb pueden llevarse consigo regiones de regulación positiva que perjudican la expresión fuerte y homogénea en el fruto (Montgomery y col. 1993). Se observó que tanto las reacciones de PCR como las de digestión indicaron que el tamaño del promotor PG clonado coincidió con el tamaño esperado (~800 pb; Figuras 7, 8, 10 y 11), descartando ésta posibilidad.

El vector pCambia 35S-LeSDH expresa LeSDH en forma constitutiva, debido a que su expresión está regulada por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Benfey y Chua, 1990). Esto permitió tener un control positivo de la expresión de LeSDH al compararlo con el vector PG-LeSDH.

Comparando las intensidades de banda de las muestras 35S-LeSDH y PG-LeSDH se pudo observar una mayor cantidad de amplificado para este último (Figura 13). Aunque este no es un dato concluyente para determinar la fuerza de expresión del promotor PG (para esto se tendría que realizar qPCR), el resultado constata el funcionamiento de ambos vectores y demuestra que existe expresión del mRNA de LeSDH a un nivel detectable.

En los ensayos con el vector PG-LeSDH los resultados revelan también un aumento de la actividad SDH en el fruto de durazno agro-inyectado versus el control. No obstante, el incremento fue más moderado comparado con el vector 35S-LeSDH, además de tener mayor varianza en los valores de actividad (Figura 14B). Esto último se debe principalmente a que el promotor PG contiene regiones de respuesta a etileno conservadas (Bird y col. 1988). El estadio de madurez de un fruto climatérico, como el durazno, determina la concentración de etileno presente en éste, así mismo el etileno es la principal hormona que participa en la maduración de los frutos. A medida que aumenta la concentración de etileno, más se sintetiza de este compuesto (Sitrit y Bennett, 1998). Además, como compuesto volátil, este puede difundir desde un fruto maduro a uno inmaduro cercano y acelerar el proceso de maduración de éste último. Sin importar que las características claves para seleccionar los frutos en un estadio de maduración medio (sección 4.1.2) sean parecidas, se desconoce tanto la concentración interna de etileno, como el contacto que tuvo el fruto con esta fito-hormona proveniente de frutos en estadios más avanzados de maduración. Por esta razón, la expresión de LeSDH por el vector PG-LeSDH puede presentar marcadas variaciones, observadas en este caso como cambios en la actividad SDH. Sin embargo, existe un aumento notorio de actividad SDH bajo el control del promotor PG, en comparación con el control. Aunque aparentemente existe un aumento en la actividad SDH en los frutos transformados, esta al parecer no es muy grande. Al no haber trabajos relacionados al aumento de actividad SDH en plantas no existe un patrón de comparación y solo se puede especular y plantear que la transformación transitoria de frutos mediante agro-

inyección no es muy eficiente, y que una fracción de células está expresando el transgen (LeSDH). Esto repercute en un aumento discreto en la actividad SDH total medida.

La validez estadística se realizó en forma pareada, comparando cada ensayo de actividad entre el tejido agro-inyectado y el no agro-inyectado para cada fruto y para cada vector en forma independiente. La prueba T (T de Student) entrega la probabilidad de que las muestras medidas provengan de una misma población de igual media. El valor de significancia usado para esta prueba es de 0.05 y las dos pruebas, tanto para 35S-LeSDH y PG-LeSDH dieron valores inferiores (Tabla III). Sin embargo esta es una aproximación estadística con un número de repeticiones limitado (3). Con el objetivo de constatar los resultados se realizó una segunda prueba estadística, la prueba Z. Ésta entrega la probabilidad de que una muestra sea mayor a un conjunto de valores observados (control). En este caso el valor de significancia fue de 0.95, así mismo las dos muestras dieron valores superiores (Tabla III). Por lo tanto, a pesar de que el número de muestras es reducido, y la varianza en los datos es marcada, existe evidencia de un aumento de la actividad SDH correlacionado con la expresión de LeSDH en los frutos de durazno, por lo que podemos concluir que ambos vectores (35S-SDH y PG-SDH) son funcionales en este sistema. Lamentablemente, no se han publicado datos sobre la actividad SDH endógena en duraznos, en las unidades trabajadas en este seminario. Yamada y col. (2001), documenta la actividad SDH durante el desarrollo del fruto de durazno respecto al peso fresco extraído en cada ensayo. Esto imposibilita comparar los valores de actividad control obtenidos en este seminario y los valores obtenidos por Yamada y col. (2001). Por esta razón, se verificó los datos encontrados con los

documentados en manzana (Teo y col. 2006) y pera (Oura y col. 2000), miembros de la familia Rosaceae al igual que el durazno. El promedio de actividad documentado en pera ($1.082 \pm 0.075 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) se asemeja a los obtenidos en los ensayos control en este seminario, aunque los valores publicados para manzanas sean bastante inferiores ($5-33 \text{ nmol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Las diferencias mencionadas en los estados de maduración de los frutos de durazno, conllevan también a diferencias en la actividad SDH, aunque los valores obtenidos en los controles se encuentran dentro del rango esperado y además son semejantes entre sí.

7.-PROYECCIONES Y CONCLUSIONES

La sobre-expresión de LeSDH podría aumentar el flujo de sorbitol hacia el fruto de manzano, acrecentando su volumen y aumentando su dulzor al incrementar la cantidad de fructosa en éste. Sin embargo, aun falta realizar un análisis similar con MdSDH3 (SDH de manzano) para poder así finalmente comparar la eficiencia relativa de estas dos enzimas, con el objetivo de aumentar el dulzor de manzanas. Los pasos a seguir en los que respecta a LeSDH, se orientan principalmente a transformar manzanos establemente con las construcciones desarrolladas y repetir los ensayos realizados en este trabajo, con la intención final de determinar la composición de azúcares en las manzanas transgénicas.

Los objetivos de este seminario de títulos fueron cumplidos:

1) Se clonó el cDNA de LeSDH bajo el control de un promotor constitutivo (35S) y un promotor fruto-específico (PG),

2) Se verificó la expresión de LeSDH usando duraznos como modelo de fruto y se determinó un incremento significativo en la actividad de SDH en frutos agro-inyectados de durazno.

Por otro lado, las técnicas utilizadas sentarán base para futuras investigaciones relacionadas con el tema. Tanto la técnica de agro-inyección como los ensayos enzimáticos, permitirán en forma rápida y precisa determinar el funcionamiento de nuevos vectores para sobre-expresar otras enzimas de interés, por ejemplo MdSDH3. Y de esta forma poder comparar empíricamente las diferencias entre las enzimas propuestas, para la inter-conversión de azúcares en frutos de manzanas, con el fin de aumentar su dulzor.

8-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benfey P N y Chua N H (1990).** The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science*. **250**: 959-966.
- Beruter J (1985).** Sugar accumulation and changes in the activities of related enzymes during development of the apple fruit. *J Plant Physiol* **121**: 331-341.
- Bieleski R L (1969)** Accumulation and translocation of sorbitol in apple phloem. *Aust J Biol Sci* **22**: 611-620.
- Bieleski R L (1982).** Sugar alcohols, *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*. **13A**: 158-92.
- Bird C R, Smith C J S, Ray J A, Moureau P, Bevan M W, Bird A S, Hughes S, Morris P C, Grierson D y Schuch W (1988).** The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **11**: 651-662.
- Burt B A (2006).** JADA Continuing Education: The use of sorbitol- and xylitol-sweetened chewing gum in caries control. *J Am Dent Assoc.* **137**: 190-196.
- Caroca R (2007).** Identificación de PpCBF en *Prunus persica*: Un gen ortólogo funcional de la familia DREB1/CBF de *Arabidopsis thaliana*. Seminario de Título, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Doehlert D C (1987).** Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* **84**: 830-834.
- Fischer R L y Bennett A B (1991).** Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 675-703.
- Fraser P D , Romer S, Shipton C A, Mills P B, Kiano J W, Misawa N, Drake R G, Schuch W y Bramley P M (2002).** Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *PNAS.* **99**: 1092-1097.
- Gerlach U (1984).** *Methods of Enzymatic Analysis.* Verlag Chemie, Weinheim, Germany. **3**: 112-117.
- Hajdukiewicz P, Svab Z y Maliga P (1994).** Small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **25**: 989-994.
- <https://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servlet/contenidos.ServletDetallesScr;jsessionid=C03F746F40D54D051C8DB294F689AD1F?idcla=2&idcat=5&idn=1079>.

Hulme A C, Dones J D y Woollorton L S (1963). The respiration climacteric in apple fruit. *Proc. Royal Soc. B.*158: 514-535.

Jackson J E, (2003). *Biology of Apples and Pears.* Cambridge University Press. Pag 238.

Janick J, Cummins JN, Brown SK y Hemmat M. Apples In Fruit Breed, Volume I: Tree and Tropical Fruits, edited by Janick J and Moore JN. John Wiley & Sons pp 1-77.

Kuo T M, Doehlert D C y Crawford C G (1990). Sugar metabolism in germinating soybean seeds. Evidence for the sorbitol pathway in soybean axes. *Plant Physiol.* 93: 1514-1520.

Lo Bianco R y Rieger M, Sung S J S (1998). A simple, rapid extraction and assay procedure for NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase (SDH) in peach. *J Am Soc Hortic Sci.* 123:1065-1068.

Loescher W H, Marlow G C y Kennedy R A (1982). Sorbitol metabolism and source-sink interconversions in developing apple leaves. *Plant Physiol* 70: 335-339.

Mansour R, Latche A, Vaillant V, Peach J C y Reid M S (1986). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in ripening apple fruit. *Physiol. Plant* 66: 495-502.

Meisel L, Fonseca B, González S, Baezayates R, Cambiazo V, Campos R, Gonzalez M, Orellana A, Retamales J y Silva H (2005). A Rapid and Efficient Method for Purifying High Quality Total RNA from Peaches (*Prunus persica*) for Functional Genomics Analyses. *Biol Res.* 38: 83-88.

Montgomery J, Pollard V, Deikman J y Fischer R L (2003). Positive and Negative Regulatory Regions Control the Spatial Distribution of Polygalacturonase Transcription in Tomato Fruit Pericarp. *Plant Cell.* 5: 1049-1062.

Nosarszewski M, Clements A M, Downie A B y Archbold D D (2004). Sorbitol dehydrogenase expression and activity during apple fruit set and early development. *Physiol Plant.* 121: 391-398.

Ohta K, Moriguchi R, Kanahama K, Yamaki S y Kanayama Y (2005). Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochem.* 66: 2822-2828.

- Orzaez D, Mirabel S, Wieland W H y Granell A (2006).** Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol.* **140:** 3-11.
- Oura Y, Yamada K, Shiratake K y Yamaki S (2000).** Purification and characterization of a NAD⁺ dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochemistry* **54:**567-572.
- Park S W, Song K J, Kim M Y, Hwang J-H, Shin Y U, Kim W-C y Chung W-I (2002).** Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. *Plant Sci.* **162:** 513-519.
- Rekha S. Singhal, Pushpa R K y Dinanath V R (1997).** Handbook of Indices of Food Quality and Authenticity. Woodhead Publishing. Pag 99.
- Rose E, Houck C M, Monson E K, DeJesus C E, Sheehy R E, y Hiatt W R (1988).** The nucleotide sequence of the 5' flanking region of a tomato polygalacturonase gene. *Nucleic Acids Res.* **16:** 71-91.
- Sitrit Y y Bennett A B (1998).** Regulation of Tomato Fruit Polygalacturonase mRNA Accumulation by Ethylene: A Re-Examination. *Plant Physiol.* **116:** 1145-1150.
- Teo G, Suzuki Y, Uratsu S L, Lampinen B, Ormonde N, Hu W K, DeJong T M y Dandekar A M (2006).** Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *PNAS.* **103:** 18842-18847.
- Webb K L y Burley J W A (1962).** Sorbitol translocation in apple. *Science* **137:** 766.
- Yamada K, Niwa N, Shiratake K y Yamaki S (2001).** cDNA clonig of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from peach fruit and its expression during fruit development. *J Am Soc Hortic Sci.* **76:** 581-587.
- Yamaguchi Y, Kanayama Y, Soejima J y Yamaki S (1996).** Changes in the amounts of the NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase and its involvement in the development of apple fruit. *J Am Soc Hortic Sci.* **121:** 848-852.
- Yamaki S y Ishiwaka K (1986).** Roles of four sorbitol related enzymes and invertase in the seasonal alteration of sugar meta-bolism in apple tissue. *J Am Soc Hortic Sci* **111:** 134-137.