

UCH-FC
Biotecnología
0495
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

“Generación y análisis de *Arabidopsis thaliana* que expresan la enzima sorbitol deshidrogenasa de *Vitis vinífera* (VvSDH)”

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

Karina Vanessa Olivos Hernández

Director del Seminario de Título: Dr. Michael Handford

Octubre, 2016

Santiago, Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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

KARINA VANESSA OLIVOS HERNÁNDEZ

“Generación y análisis de *Arabidopsis thaliana* que expresan la enzima sorbitol deshidrogenasa de *Vitis vinifera* (VvSDH)”

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

Michael Handford
Director Seminario de Título

Handwritten signature of Michael Handford in blue ink, positioned above a horizontal line.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Claudia Stange Klein
Presidente

Handwritten signature of Claudia Stange Klein in blue ink, positioned above a horizontal line.



Dra. Loreto Prat del Río
Integrante

Handwritten signature of Loreto Prat del Río in blue ink, positioned above a horizontal line.

BIOGRAFÍA



Nací un 24 de marzo de 1992 en Buin, mi infancia se desarrolló en una localidad llamada Vínculo, comuna de Paine, donde viví con mis padres y mi hermana mayor. En el colegio nos destacábamos por nuestras buenas notas y por participar en los grupos de danza. La enseñanza media la realizamos en Santiago, en el Internado Nacional Femenino Carmela Silva Donoso, sin embargo, al segundo año de mis estudios nos cambiamos de ciudad y nos fuimos a Parral, ubicada en la VII región, donde terminé mi enseñanza media.

Fue allá donde comenzó a interesarme el área de la biología, y al momento de escoger una carrera me incliné por Biotecnología en la Universidad de Chile, entré a la carrera y con los ramos de Botánica y prácticos de células vegetales de biología celular me di cuenta que me gustaban mucho las plantas, por lo que decidí hacer mi Seminario de Título en esa área, antes de entrar a un laboratorio de “plantas” hice una pasantía en el laboratorio de Inmunología de la Dra. Bono, pero me di cuenta que no era lo mío. Finalmente entré al Centro de Biología Molecular Vegetal bajo la tutela del Dr. Handford en el año 2013, primero haciendo una pasantía, a lo que siguió una Unidad de Investigación y finalmente el desarrollo de mi Seminario de Título.

A mi familia y amigos...

AGRADECIMIENTOS

... A mi familia por el apoyo incondicional que me han entregado, a mi Mamá en primer lugar y a mi tía Ali, mi segunda mamá. Por estar ahí siempre, aunque las distancias nos separen...

... A mi hermana, Kathy, mi sobrina Ali y Andrés, por esos fines de semana que me han adoptado en su casa...

... A mis compañeros de lab, por hacer de este lugar un espacio muy agradable para trabajar, especialmente Sara, Simón y Barbi, gracias por su compañía, por el apoyo y la ayuda durante el desarrollo de mi tesis, además de todas las conversaciones chistosas y/o serias. También a Maripi, que se integró este año. Todos ustedes me han dado ánimo, cariño y alegrías. A mi tutor, Profe Mike, gracias por recibirme en el lab hace tanto tiempo ya y por su apoyo y guía durante mi estancia acá, a Koke, por ser quien me guió en mis primeros pasos en el lab. ¡Gracias!...

... A Nexo, por apoyarme y ayudarme durante el transcurso de mi carrera y de mi tesis, por hacer que me diera cuenta que, si las cosas no resultan a la primera, no es el fin del mundo, por estar ahí siempre que lo necesite, ¡¡¡Gracias y Mil Gracias!!!

... Cote, golda, no importa la distancia que nos separa, siempre estamos la una para la otra, para escuchar nuestras quejas, penas y alegrías...

... Javier, gracias por darme ánimo, por estar ahí...

... Y gracias a todas aquellas personas que, a pesar de no nombrarlas, han sido parte de mi desarrollo y de una forma u otra, me han ayudado a cumplir con esta meta...

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Azúcares en plantas.....	1
1.2 Funciones de los polioles en plantas	2
1.3 Metabolismo del sorbitol.....	2
1.4 Sorbitol deshidrogenasa (SDH)	3
1.4.1 Sorbitol deshidrogenasa en plantas.....	4
1.5 Estrategia desarrollada	7
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo general:.....	8
2.2 Objetivos específicos:	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	9
3.1.1 Plásmidos utilizados	9
3.1.2 Cepas y crecimiento bacteriano.....	10
3.1.3 Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> quimiocompetentes	10
3.1.4 Propagación de especies vegetales	11
3.2 OBTENCIÓN Y VERIFICACIÓN DE pGWB8-VvSDH.....	12
3.2.1 Purificación de plásmidos	12

3.2.2 Recombinación entre vectores de entrada (pCR8-VvSDH) y destinación (pGWB8)	12
3.2.3 Transformación de <i>E. coli</i> MACH1 quimiocompetente.....	12
3.2.4 Transformación de <i>Agrobacterium</i> quimiocompetente	13
3.2.5 Verificación de pGWB8-VvSDH por PCR	13
3.2.6 Secuenciación.....	14
3.2.7 PCR de pGWB8 y pGWB8-VvSDH a partir de <i>A. tumefaciens</i>	15
3.3 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE HOJAS DE <i>N. tabacum</i>	15
3.4 TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE <i>A. thaliana</i>	16
3.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL	16
3.5.1 Extracción de RNA a partir de hojas de <i>N. tabacum</i> agroinfiltradas	16
3.5.2 Extracción de DNA genómico a partir de hojas caulinares de <i>A. thaliana</i>	17
3.5.3 Extracción de RNA a partir de hojas caulinares de <i>A. thaliana</i>	18
3.6 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRAÍDOS	18
3.6.1 Cuantificación	18
3.6.2 Determinación de la integridad y calidad de ácidos nucleicos	18
3.7 OBTENCIÓN DE cDNA A PARTIR DE RNA DE TABACO Y ARABIDOPSIS .	19
3.7.1 Tratamiento con DNasa	19
3.7.2 RT-PCR.....	20
3.8 DETECCIÓN DE VvSDH-HIS	24
3.8.1 Extracción de proteínas totales a partir de hojas de <i>N. tabacum</i> agroinfiltradas	24
3.8.2 SDS-PAGE.....	25
3.8.3 Western blot	26
3.8.4 Dot blot	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Clonación de VvSDH en pGWB8, un vector binario para la expresión de VvSDH-His en plantas	28
4.1.1 Extracción de DNA plasmidial a partir de <i>E. coli</i>	28
4.1.2 Recombinación del vector pCR8-VvSDH con el vector de destinación pGWB8	28
4.1.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con pGWB8 y pGWB8-VvSDH y verificación por PCR	29

4.2 Determinación de la funcionalidad del vector pGWB8-VvSDH mediante la transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i>	32
4.2.1 Evaluación de la expresión del gen <i>VvSDH</i>	32
4.2.2 Determinación de la traducción del gen <i>VvSDH-His</i>	34
4.3 Transformación estable de plantas silvestres y mutantes <i>sdh-</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante inmersión floral con pGWB8-VvSDH y análisis molecular de plantas transformantes	38
4.3.1 Extracción de DNA genómico	40
4.3.2 Extracción de RNA y síntesis de cDNA	42
4.3.3 Porcentaje de eficiencia de la transformación de <i>A. thaliana</i>	46
5. DISCUSIÓN	48
5.1 Clonación de VvSDH en pGWB8, un vector binario para la expresión de VvSDH-His en plantas.	49
5.2 Análisis de la funcionalidad de pGWB8-VvSDH mediante transformación transitoria de hojas de tabaco.....	50
5.2.1 Expresión del gen <i>VvSDH</i>	50
5.2.2 Traducción del gen <i>VvSDH-His</i>	51
5.3 Transformación estable de plantas silvestres y mutantes <i>sdh-</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante inmersión floral con pGWB8-VvSDH y análisis molecular de plantas transformantes	53
6. CONCLUSIONES	55
7. PROYECCIONES	56
8. BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXO	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores utilizados durante el desarrollo del seminario de título.	20
Tabla 2: Combinación de partidores usados para la amplificación por PCR de DNA. ...	22
Tabla 3: Programas de PCR utilizados.	23
Tabla 4: Tabla resumen de plantas de <i>A. thaliana</i> transformantes.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vía de síntesis y degradación de sorbitol.....	3
Figura 2: Plantas <i>sdh</i> - y silvestre de <i>A. thaliana</i> sometidas a estrés hídrico.	5
Figura 3: Efecto del déficit hídrico sobre la acumulación de manitol (A) y sorbitol (B) en uvas.....	6
Figura 4: PCR de minipreparaciones de <i>E. coli</i> transformadas con pGWB8-VvSDH. .	29
Figura 5: PCR de colonia de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformadas con pGWB8.	30
Figura 6: Amplificado de CDS de VvSDH a partir de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformada con pGWB8-VvSDH.	31
Figura 7: Obtención y verificación de la calidad de RNA total extraído de tabaco agro-infiltrado.....	33
Figura 8: Determinación de la funcionalidad transcripcional de pGWB8-VvSDH.	34
Figura 9: Ensayo de western blot anti-His.....	35
Figura 10: Ensayo de dot blot anti-His.	37
Figura 11: Siembra de semillas T0 de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas con pGWB8 (A) o pGWB8-VvSDH (B) en medio de selección.	39
Figura 12: Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>Actina</i> de <i>A. thaliana</i> transformadas con pGWB8 (A) o pGWB8-VvSDH (B).	40
Figura 13: Amplificación por PCR de los genes <i>cmR-ccdB</i> y <i>VvSDH-His</i> de <i>A. thaliana</i> transformadas con pGWB8 (A) o pGWB8-VvSDH (B), respectivamente.....	41
Figura 14: Verificación de la calidad de RNA totales.....	43
Figura 15: Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>Actina</i> de <i>A. thaliana</i> transformantes que portan pGWB8-VvSDH.....	44
Figura 16: Amplificación de VvSDH (A) y VvSDH-His (B) por RT-PCR en <i>Arabidopsis</i> transformados con pGWB8-VvSDH.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

% p/v	Porcentaje peso/volumen
% v/v	Porcentaje volumen/volumen
°C	Grados Celsius
A6PR	Aldosa 6-fosfato-reductasa
APS	Persulfato de amonio
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
D.O. _{600nm}	Densidad óptica medida a 600 nm
DEPC	Diethyl Pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
kDa	Kilo Dalton
K _{cat}	Constante catalítica
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria-Bertani
MOPS	Ácido 3-(N-Morfolino)propanesulfónico
MS	Medio de Murashige y Skoog
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitroazul de tetrazolio " <i>Nitro blue tetrazolium</i> "
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Revoluciones por minuto
RT	Reacción de la transcriptasa reversa
S6PP	Sorbitol fosfatasa
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
<i>sdh-</i>	Mutante para la enzima sorbitol deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UV	Ultra violeta
V	Voltaje
WT	"wild type", líneas vegetales silvestres

RESUMEN

En la mayoría de las especies vegetales, la sacarosa es el principal azúcar transportado desde los órganos fotosintéticos hacia los órganos sumideros. Sin embargo, en las especies de las familias *Rosaceae* y *Plantaginacea*, es el sorbitol el principal azúcar transportado, el cual es oxidado a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa (SDH) en los órganos sumideros. Estudios han reportado que los polioles, como el sorbitol, otorgan diversas características ventajosas a estas especies, como protección frente a radicales libres, uso más eficiente del carbono, y mayor tolerancia frente a estrés hídrico o salino.

Se han identificado ortólogos para la enzima SDH en especies de otras familias, como maíz, soja, *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) y uva (*Vitis vinifera*). En *A. thaliana* se determinó que AtSDH es citoplasmática y capaz de oxidar sorbitol, ribitol y xilitol. Además, plantas mutantes *sdh*- luego de ser sometidas a condiciones de estrés hídrico aumentaban sus niveles de polioles y presentaban una mayor tolerancia frente a este estrés. Por otro lado, VvSDH es el ortólogo más cercano en uva (Thompson Seedless), compartiendo un 84% de identidad aminoacídica con AtSDH. VvSDH posee una localización sub-celular citoplasmática y presenta actividad enzimática *in vitro*. Sin embargo, se desconoce si VvSDH efectivamente cumple el rol de una SDH *in vivo*, y un abordaje para determinar su papel es analizar su capacidad de complementar funcionalmente las mutantes *sdh*- de *A. thaliana*.

Por lo tanto, en este Seminario de Título, se sentaron las bases para realizar este análisis, que es de largo plazo. Para ello, se construyó un vector de expresión que contiene el cDNA que codifica para VvSDH (pGWB8-VvSDH) fusionado a un tag de histidina. Se

determinó la funcionalidad transcripcional y traduccional del vector, mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco, utilizando las técnicas de RT-PCR y de dot blot. Además, se transformaron establemente plantas de *A. thaliana* silvestres y tres líneas *sdh*- independientes, con pGWB8 y pGWB8-VvSDH, obteniendo múltiples transformantes T0 que fueron analizadas molecularmente. Posterior a este trabajo, las plantas homocigotas de las siguientes generaciones serán sometidas a estrés hídrico con la finalidad de corroborar *in vivo* la funcionalidad de la enzima VvSDH.

ABSTRACT

In most plant species, sucrose is the main sugar transported from photosynthetic source organs to sink organs. However, in species of the *Rosaceae* and *Plantaginaceae* families, sorbitol is the main sugar transported, which is oxidised to fructose by sorbitol dehydrogenase (SDH) once in sink organs. Studies have reported that polyols, like sorbitol, give various advantageous features to these species, like protection against free radicals, efficient use of carbon and greater tolerance to drought or salt stress.

Orthologs for the SDH enzyme have been identified in species from other families such as maize, soybean, *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) and grape (*Vitis vinifera*). In *A. thaliana*, AtSDH is cytoplasmic and is capable of oxidising sorbitol, ribitol and xylitol. In addition, mutant *sdh*- plants after being under water stress conditions have increased polyol levels and a higher tolerance to this stress. On the other hand, VvSDH is the closest ortholog in grapes (Thompson Seedless), sharing 84% amino acid identity with AtSDH. VvSDH is cytoplasmic and presents enzymatic activity *in vitro*. However, it is unknown whether VvSDH effectively plays the role of an SDH *in vivo*, and an approach to determine its role is to analyse its ability to functionally complement *sdh*- mutants of *A. thaliana*.

Therefore, in this thesis, the foundations were laid for this long term analysis. To do so, an expression vector containing the cDNA encoding VvSDH (pGWB8-VvSDH) fused to a histidine tag was constructed. The transcriptional and translational functionality of the vector was determined by transient transformation of tobacco leaves, using RT-PCR and dot blot technique. In addition, wild type and three independent *sdh*- lines of *A.*

thaliana were transformed stably with pGWB8 and pGWB8-VvSDH, obtaining multiple T0 transformants which were analysed molecularly. After this thesis, homozygous plants of the subsequent generations will be subjected to water stress in order to confirm *in vivo* the functionality of the enzyme VvSDH.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Azúcares en plantas

Los productos primarios de la fotosíntesis son los azúcares como sacarosa, y los alcoholes de azúcares (polioles) como el sorbitol (Negm & Loesher, 1979). Los polioles corresponden a azúcares reducidos en sus grupos ceto o aldo (Bielecki, 1982). La cadena de carbono de estos puede ser lineal (ribitol, xilitol, sorbitol, manitol, entre otros) o cíclica como el inositol y ononitol (Noiraud y cols., 2001). En la mayoría de las especies vegetales son la sacarosa o la rafinosa los azúcares que son transportados vía floema (tejido vascular) desde los órganos fotosintéticos (hojas), hacia los órganos sumideros (frutos, raíces) (Zimmermann & Ziegler, 1975). Sin embargo, en especies de la familia *Rosaceae* (Ej. Durazno, *Prunus persica*) y *Plantaginaceae* (Ej. llantén, *Plantago major*), es el sorbitol el principal fotosintato translocado, en la familia *Celastraceae* (Ej. *Euonymus* sp) es el galactitol (Pommerrenig y col., 2007) y en las familias *Apiaceae* (Ej. apio, *Apium graveolens*), *Oleaceae* (Ej. olivo, *Olea europaea*) y *Rubiaceae* (Ej. café arábigo, *Coffea arabica*) el manitol es el fotosintato principalmente translocado (Bielecki, 1982; Lewis, 1984). En plantas superiores se han reportado un total de 17 polioles, de los cuales solo en angiospermas se han aislado al menos 13 de ellos, donde el manitol es el que está mayormente distribuido (Lewis, 1984).

1.2 Funciones de los polioles en plantas

Los polioles además de ser una fuente de carbono, presentan algunas características y funciones que son importantes para las plantas. Algunas de estas son: a) protección frente a radicales libres, ya que tienen la capacidad de neutralizar estas especies reactivas (Smirnoff & Cumbes, 1989; Shen y col., 1997), b) entregan un mayor rendimiento neto de ATP en órganos no fotosintéticos (Pharr y col., 1995), c) en su forma lineal son eficientes osmolitos, por lo que su acumulación ayuda a tolerar mejor el estrés de tipo abiótico como sequía, bajas temperaturas y estrés salino (Galinski & Truper, 1994), d) actúan como solutos compatibles, ya que pueden acumularse en altas concentraciones dentro de la célula sin dañarla y sin interferir en procesos metabólicos (Stoop y col., 1996; Conde y col., 2007), y e) permiten la translocación de micronutrientes como el boro (B), considerado como inmóvil o ligeramente móvil y que es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Brown & Hu, 1996).

1.3 Metabolismo del sorbitol

El sorbitol es el poliol más ampliamente estudiado, ya que se encuentra en especies vegetales de gran importancia económica tanto a nivel mundial, como para nuestro país. Dentro de estas especies, se encuentran al manzano (*Malus x domestica*), ciruela (*Prunus salicina*), pera (*Pyrus pyrifolia*), y durazno (*Prunus persica*).

El sorbitol es sintetizado en órganos fuente (hojas), a partir de la glucosa-6-fosfato por acción de la aldosa-6-fosfato reductasa (A6PR; EC .1.1.1.200), reacción que está

acoplada a la oxidación de NADPH donde se genera sorbitol-6-fosfato, el cual a su vez es desfosforilado por acción de la sorbitol fosfatasa (S6PP). El sorbitol es cargado al floema por transportadores, y translocado hacia los órganos sumidero (frutos, raíces), donde por acción de la sorbitol deshidrogenasa (SDH; EC 1.1.1.14) es oxidado a fructosa (Figura 1; Loescher, 1987; Beruter y col., 1997).

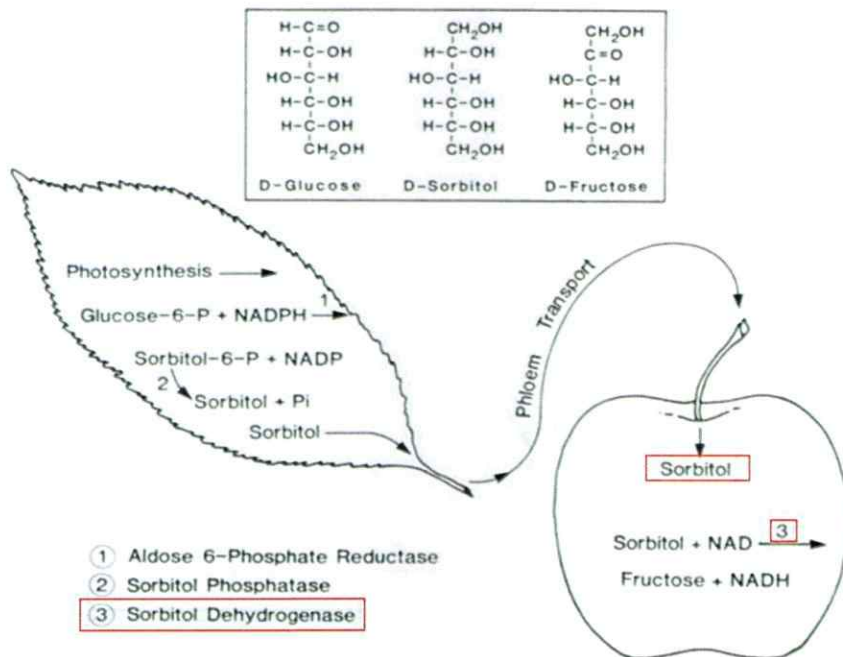


Figura 1: Vía de síntesis y degradación de sorbitol. Enzimas involucradas en la síntesis de sorbitol en órgano fuente (hoja) y degradación de sorbitol en órgano sumidero (fruto). (Modificado de Loescher, 1987).

1.4 Sorbitol deshidrogenasa (SDH)

SDH no solo está presente en el reino vegetal, también es posible encontrarla en animales (Negm & Loescher, 1979; Blakley, 1951), bacterias (Sola-Carvajal y col.,

2012) y levaduras (Sarthy y col., 1994). Fue parcialmente purificada por primera vez desde hígado de rata (Blakley, 1951), luego desde pera (Oura y col., 2000) y caracterizada desde manzana utilizando proteínas recombinantes (Yamada y col., 1998). Su conformación es de un tetrámero con un ion de zinc por cada subunidad. Cada subunidad presenta dos dominios, uno es el dominio de unión a la coenzima y el otro es el dominio catalítico, el cual tiene un sitio de unión a zinc (Johansson y col., 2001).

1.4.1 Sorbitol deshidrogenasa en plantas

Se han identificado SDHs en plantas pertenecientes principalmente a la familia *Rosaceae*, como ciruela (Guo y col 2012), durazno (Lo Bianco y col., 1998), pera (Oura y col, 2000), y manzana (Park y col, 2002). Sin embargo, se han encontrado ortólogos en otras familias, como maíz (*Zea mays*) (Doehlert, 1987), soya (*Glycine max*) (Kuo y col, 1990), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Ohta y col, 2005), *Arabidopsis thaliana* (Nosarszewski y col, 2012; Aguayo y cols., 2013; Aguayo y cols., 2015) y vid (*Vitis vinifera*) (Conde y col., 2015).

En *A. thaliana* (*Brassicaceae*), se determinó que la enzima AtSDH (*At5g51970*) presenta una localización sub-celular citoplasmática y es capaz de oxidar sorbitol, ribitol y xilitol (Aguayo y col., 2013; Aguayo y col., 2015). Tres mutantes independientes *sdh-* en esta especie con una inserción de T-DNA en el ecotipo Columbia (Col-0): SALK 020855 (*sdh1-1*), 077335 (*sdh1-3*) y 023456 (*sdh1-4*), crecidas en medio Murashige & Skoog presentan un fenotipo similar que plantas silvestres. Sin embargo, luego de aplicar estrés por sequía hay un aumento en la concentración de sorbitol y ribitol en las dos primeras

(Nosarszewski y col., 2012) y bajo ciertas condiciones de fotoperiodo, poseen mayor tolerancia a dicho estrés (Aguayo y col., 2013), consistente con el rol de sorbitol y otros polioles actuando como solutos compatibles.

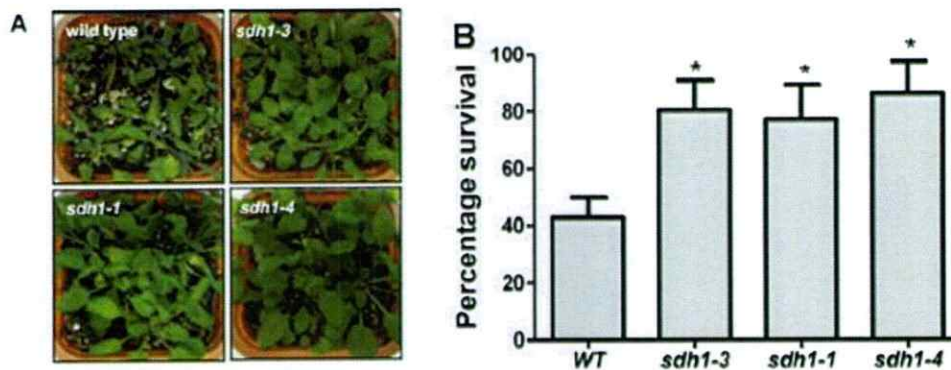


Figura 2: Plantas *sdh*- y silvestre de *A. thaliana* sometidas a estrés hídrico. A. Fenotipo de plantas de 4 semanas sometidas a 14 días sin riego. B. Porcentaje de sobrevivencia de líneas *sdh*- y silvestres 14 días después de la re-hidratación. (Modificado de Aguayo y col, 2013).

En plantas de vid (*V. vinifera*) se observó que cuando eran sometidas a estrés hídrico (déficit de agua), en las bayas se producía un aumento en los niveles de metabolitos (manitol, galactinol, *myo*-inositol, glicerol y sorbitol) los que podrían a su vez afectar negativamente las características del vino (“Tempranillo”), mientras que en hojas la concentración de polioles se mantenía constante. Específicamente en bayas de uva se observó un aumento de 2.5 veces de manitol comparado con el control, que corresponde a bayas de plantas sin déficit hídrico, mientras que el sorbitol aumentó de 3 a 4 veces más que el control (Conde y col., 2015).

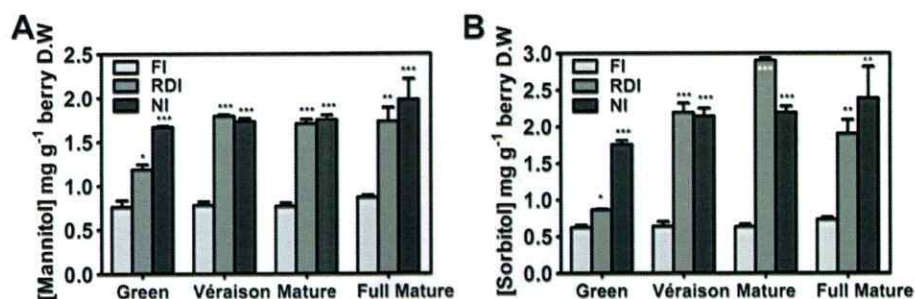


Figura 3: Efecto del déficit hídrico sobre la acumulación de manitol (A) y sorbitol (B) en uvas. Concentración de manitol (A) y sorbitol (B) en el mesocarpo de uvas a diferentes etapas de desarrollo y en diferentes condiciones hídricas (FI: completamente irrigado; RDI: déficit regular de irrigación; NI: sin irrigación), (Modificado de Conde y col., 2015).

Por otro lado, se aisló y clonó el cDNA de una *SDH* proveniente de la cepa Cabernet Sauvignon (*VvSDH1*), donde se determinó que *VvSDH1* poseía entre un 75 y 86% de identidad aminoacídica con otras *SDHs* conocidas (Ej. manzana) (Tang, 2011). También se aisló a partir de cDNA de la cepa Thompson Seedless un marco de lectura abierto (ORF) codificante para un gen denominado *VvSDL*, con 99% de identidad a *VvSDH1*, 87% de identidad a *SISDH* de *S. lycopersicum* y un 77% a *MdSDH* de *M. domestica*. Se determinó que la localización sub-celular de *VvSDL* es citoplasmática y además presentaba actividad enzimática *in vitro*, donde la enzima recombinada obtenida a partir de extractos solubles de *E. coli* era capaz de oxidar sorbitol, xilitol y ribitol. Al purificar la proteína, se determinaron sus parámetros cinéticos, obteniendo que *VvSDL* poseía una K_m de $1,56 \pm 0,23$ mM, una velocidad máxima de 61 nM S⁻¹ y una k_{cat} de $0,338$ S⁻¹, al oxidar sorbitol (Araya, 2013). Estos antecedentes permiten afirmar que

VvSDL sería una sorbitol deshidrogenasa, por lo que para este Seminario de Título se denominó el gen como *VvSDH*.

1.5 Estrategia desarrollada

Es conocido el rol de los polioles en especies vegetales que los sintetizan (*Rosaceae* y *Plantaginaceae*), y se ha visto que en aquellas especies que translocan otros azúcares, la acumulación de polioles como el sorbitol permiten responder de mejor manera frente a estrés hídrico por ejemplo, como es el caso de *A. thaliana*. Se determinó *in vitro* que la enzima presentaba actividad y era capaz de oxidar polioles, pero aún no se ha determinado su rol *in vivo*. Es por esto que una forma de determinar si VvSDH de Thompson Seedless efectivamente cumple el rol de una SDH *in vivo*, es evaluar su capacidad de complementar funcionalmente las mutantes *sdh-* de *A. thaliana*, revirtiendo su fenotipo y aumentando su sensibilidad al estrés por sequía (Figura 2). Sin embargo, es un objetivo de largo plazo. Por lo tanto, en este Seminario de Título, se construyó el vector de expresión pGWB8-VvSDH, el cual se corroboró su funcionalidad transcripcional y traduccional mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Luego, se transformaron establemente plantas *sdh-* y silvestres de *A. thaliana* y se analizaron a nivel molecular. Posterior a este seminario, se pretende realizar ensayos de déficit hídrico en las líneas obtenidas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Obtención de un vector de expresión que posee el gen que codifica para una sorbitol deshidrogenasa de *Vitis vinifera* (pGWB8-VvSDH) y transformar plantas silvestres y mutantes *sdh*- de *Arabidopsis thaliana*.

2.2 Objetivos específicos:

2.2.1.- Clonar VvSDH en pGWB8, un vector binario para la expresión de VvSDH-His en plantas.

2.2.2.- Determinar la funcionalidad del vector pGWB8-VvSDH mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco.

2.2.3.- Transformar establemente plantas silvestres y mutantes *sdh*- de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión floral con pGWB8-VvSDH.

2.2.4.- Analizar molecularmente *Arabidopsis thaliana* transformadas establemente con pGWB8-VvSDH.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Plásmidos utilizados

Se utilizó el vector de entrada pCR8 (pCR®8/GW/TOPO® LifeTechnologies), el cual posee el gen que codifica para la resistencia a espectinomicina, permitiendo así seleccionar células bacterianas transformadas con este vector. Específicamente, se utilizó pCR8-VvSDH (Araya, 2013; ver Anexo), que posee la secuencia codificante de dicho gen, sin su codón de término. Además, se utilizó el vector de salida o destinación, pGWB8 (GATEWAY Binary Vector, Nakagawa y col., 2009), el cual posee el gen *nptII* que codifica para la resistencia a kanamicina, y que es usado para seleccionar bacterias transformadas con dicho vector. Además, posee el gen *hpt* que codifica para la resistencia a higromicina, el cual es utilizado para la selección de transformantes en plantas, y agrega un tag de histidina (6X-His) en el extremo carboxilo terminal de VvSDH.

pCR8 es compatible con la tecnología GATEWAY™ (basada en la recombinación sitio-específica entre fago λ y DNA de *Escherichia coli*) (Karimi y col., 2002). El fragmento de interés en pCR8 está entre los sitios *attL* (1 y 2) que luego por recombinación homóloga con el vector de destinación que posee los sitios de recombinación *attR* (1 y 2) queda flanqueado por estos sitios, en una reacción catalizada por la enzima LR Clonase™ de Invitrogen. Una vez transferido el gen al vector de destinación, éste podrá ser transferido al genoma de una célula vegetal, ya que este tipo

de vectores permite transformar estable o transitoriamente un tejido vegetal, por la presencia de las regiones RB y LB, que permiten transferir la información entre estos bordes a la planta, mediado por la capacidad de la bacteria *A. tumefaciens* de realizar transferencia horizontal de material genético.

3.1.2 Cepas y crecimiento bacteriano

E. coli transformados con pCR8-VvSDH fueron crecidos en LB sólido [NaCl 0,8% (p/v), triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), agar 1,6% (p/v)] con espectinomicina (100 µg/ml) para la selección de transformantes, y luego estos últimos fueron crecidos en LB líquido [NaCl 0,8% (p/v), triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v)] y el antibiótico respectivo con agitación de 200 rpm, durante 16 h a 37°C. Los clones portando pGWB8-VvSDH fueron crecidos en medio LB sólido o líquido con kanamicina (50 µg/ml) para la selección de transformantes.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 fue crecida en LB sólido o líquido con agitación de 200 rpm durante 48 h a 28°C, suplementado con rifampicina (10 µg/ml) para la selección de la cepa de *Agrobacterium* y gentamicina (25 µg/ml) para la selección del plásmido Ti. Para la cepa portadora de pGWB8-VvSDH o pGWB8, se adicionó kanamicina (50 µg/ml).

3.1.3 Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes

Se prepararon células de *A. tumefaciens* quimiocompetentes, para lo cual se incubó un pre-inóculo de 20 µl en 5 ml de LB líquido con los antibióticos (sección 3.1.2) con agitación a 28°C durante 18 h. Posteriormente se traspasó este cultivo a 100 ml de LB

líquido con igual concentración de antibióticos y agitación en un matraz de 250 ml hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (D.O._{600nm} entre 0,5 y 0,8, JENWAY 6300 Spectrophotometer). El cultivo se traspasó a dos tubos Falcon de 50 ml y se dejó en hielo durante 10 min, se centrifugaron a 3000g y 4°C durante 20 min para posteriormente eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de CaCl₂ (20 mM) estéril frío. Luego, se congelaron alícuotas de 100 µl en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.1.4 Propagación de especies vegetales

Semillas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) fueron sembradas en lana de roca (gro|dan[®], GRO-SLAB[™]), regadas dos veces por semana con medio hidropónico (Gibeaut y col., 1997), con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a 22°C. Plantas de 3.5 meses de edad aproximadamente fueron utilizadas para la transformación transitoria.

Semillas de *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0), SALK 020855 (*sdh1-1*), 077335 (*sdh1-3*) y 023456 (*sdh1-4*) fueron esterilizadas con etanol 70% (v/v) durante 2 min, secadas en campana de flujo laminar y sembradas en placas de Petri que contenían medio MS con vitaminas (Murashige & Skoog basal medium w/vitamins, *PhytoTechnology Laboratories*®), suplementado con sacarosa 3% (p/v), myo-inositol 0,1% (p/v) y agar 0,6% (p/v) (llevado a pH 5,8 antes de agregar el agar). Las placas fueron puestas en un incubador con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a 22°C por dos semanas. Posteriormente las plántulas fueron traspasadas a un soporte *jiffy-7C* hidratado (*Jiffy International AS*) en sistema AraHarvest (*SPL Life and Sciences*), cubiertas con alusa plast, el cual fue removido una semana después. Las plantas se

mantuvieron en invernadero con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a 22°C durante 3 semanas hasta cuando fueron transformadas mediante inmersión floral.

3.2 OBTENCIÓN Y VERIFICACIÓN DE pGWB8-VvSDH

3.2.1 Purificación de plásmidos

Se creció la cepa de *E. coli* con el vector de interés (sección 3.1.1) en LB líquido, y posteriormente se extrajo el DNA plasmidial siguiendo las indicaciones del protocolo de mini-prep (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit).

3.2.2 Recombinación entre vectores de entrada (pCR8-VvSDH) y destinación (pGWB8)

La reacción de recombinación (volumen final 20 µl) consistió en 150 ng de pCR8-VvSDH (4 µl) y 150 ng de pGWB8 purificados (4 µl) (sección 3.2.1), ambos cuantificados mediante NanoDrop (sección 3.6.1) y 1 µl de LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogen). Se incubó a 25°C por 1 h, se agregó 1 µl de proteinasa K y se dejó a 37°C por 10 min para detener la reacción.

3.2.3 Transformación de *E. coli* MACH1 quimiocompetente

Se utilizó el método de transformación por golpe térmico. Células competentes de *E. coli* cepa MACH1 (previamente realizadas en el laboratorio) (100 µl) se mezclaron con 10 µl de la reacción de recombinación, se dejaron durante 10 min en hielo, se aplicó el golpe térmico por 30 seg a 42°C para posteriormente dejarlas en hielo por 5 min. Se agregaron 200 µl de LB líquido y se dejaron crecer durante 1 h a 37°C con agitación. Luego éstas fueron sembradas en medio LB sólido con el antibiótico kanamicina.

3.2.4 Transformación de *Agrobacterium* quimiocompetente

Se transformó *A. tumefaciens* con pGWB8 y pGWB8-VvSDH mediante golpe térmico. Para la transformación se descongeló una alícuota de *Agrobacterium* quimiocompetente (sección 3.1.1), se adicionaron 400-600 ng de vector binario purificado obtenido luego de la transformación de *E. coli* quimiocompetente y su purificación (sección 3.2.3 y 3.2.1 respectivamente) y se incubó en N₂ líquido durante 5 min. Luego se agregó 1 ml de LB líquido y se incubó a 28°C con agitación de 200 rpm durante 2 h. Se sembraron en placas LB sólido suplementado con los antibióticos respectivos (sección 3.1.2) 50 µl del cultivo y 50 µl de cultivo luego de ser centrifugado a 4000g durante 5 min a temperatura ambiente, con la eliminación de 500 µl de LB y resuspendidos en el medio restante. Posteriormente, se realizó un cultivo líquido, donde se picó una colonia de *Agrobacterium* resistente al antibiótico (crecida en placas) y se depositó en 5 ml de medio LB líquido con los antibióticos respectivos (sección 3.1.2). Luego se preparó un concentrado de células a partir del cultivo líquido. Para esto, se tomaron 700 µl del cultivo y se depositó en un tubo eppendorf de 1,5 ml al cual se le adicionaron 400 µl de glicerol (85% v/v) el cual fue almacenado a -80°C para sus posteriores usos.

3.2.5 Verificación de pGWB8-VvSDH por PCR

Para corroborar la obtención de pGWB8-VvSDH, se crecieron cultivos de *E. coli* transformados en medio LB líquido. Posteriormente el plásmido fue purificado (sección 3.2.1), y se realizó un PCR con Taq DNA Polimerasa con partidores *VvSDH_F* y *VvSDH_R* (ver Tabla 1). La reacción consistió en la mezcla de 1X buffer de reacción con MgCl₂ 15 mM de Sigma-Aldrich®, dNTP 0,2 mM *mix* [dATP 10 mM, dCTP 10



mM, dGTP 10 mM y dTTP 10 mM], 1 μ M de cada partidor, 1 U de enzima Taq DNA Polimerasa de Sigma-Aldrich®, ~100 ng de templado y agua miliQ estéril hasta obtener un volumen final de 20 μ l. El programa de PCR utilizado se denominó VvSDH (ver Tabla 3). Para la observación del producto de PCR se realizó un gel de agarosa 1,5% (p/v) preparado con buffer TAE 1X [Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8]. Las muestras de DNA (10 μ l) se mezclaron con 2 μ l de buffer de carga (6X DNA Loading Dye de Fermentas®), el gel fue depositado en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X, y se aplicó una diferencia de potencia de 90 V durante 50 min. Luego se incubó el gel en una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml) durante 15 min. Posteriormente se visualizaron las bandas en una cámara oscura equipada con un transiluminador UV y se capturó la imagen con GeneGenius Classic (SynGene®).

3.2.6 Secuenciación

Para determinar si la secuencia de *VvSDH* había sido correctamente clonada en el vector de destinación y además si ésta poseía el tag de interés en marco de lectura en su extremo C-terminal, se diseñaron partidores específicos para el vector (Tabla 1) y se secuenciaron las muestras de DNA plasmidial purificadas previamente a partir de *E. coli*. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia de *VvSDH* obtenida por Araya (2013), la cual previamente había sido comparada con las secuencias de *Arabidopsis*, níspero, frutilla, durazno, entre otras.

3.2.7 PCR de pGWB8 y pGWB8-VvSDH a partir de *A. tumefaciens*

Para verificar la correcta transformación de *A. tumefaciens* con los vectores, se realizó un PCR de colonia para ambos constructos. El templado se obtuvo picando 1 colonia de *Agrobacterium* resistente a kanamicina y suspendida en 10 µl de agua. Luego se tomaron 2 µl como templado en una mezcla de 1X buffer de reacción con 15 mM MgCl₂ de Sigma-Aldrich®, 0,2 mM dNTP *mix* [10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP y 10 mM dTTP], 1 µM de cada partidor (ver Tabla 1), 1 U de enzima Taq DNA Polimerasa de Sigma-Aldrich® y agua miliQ estéril hasta un volumen final de 20 µl. Los programas utilizados se denominaron pGWB8_FR para el caso del vector pGWB8-VvSDH y cmR_FR, ccdB_FR y cmR_F-ccdB_R para el vector pGWB8 (ver Tabla 3). La visualización de bandas se realizó mediante la realización de geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X (sección 3.2.5).

3.3 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE HOJAS DE *N. tabacum*

Se realizaron cultivos líquidos de *A. tumefaciens* transformado con pGWB8-VvSDH y pGWB8. Para esto, se crecieron 30 µl del concentrado de *A. tumefaciens* transformado (sección 3.2.4) en 5 ml de LB líquido, luego 1 ml del pre-inóculo fue traspasado a 10 ml de LB líquido suplementado con los antibióticos respectivos (sección 3.1.2) y se incubó durante 18 h a 28°C con agitación de 200 rpm. Se centrifugó a 7000g durante 3 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en agua destilada estéril hasta alcanzar una D.O._{600nm} entre 0,5 y 0,8. Luego se agregó 0,1 mM de acetosiringona. Posteriormente se procedió a transformar el tejido vegetal, causando una herida en la cara abaxial de la hoja de *N. tabacum* con una aguja fina (de una jeringa de insulina), y

luego con una jeringa sin aguja se procedió a infiltrar lentamente 5 ml de la suspensión por la herida, hasta cuando el panel de la hoja se vio completamente infiltrado. Las plantas fueron dejadas en invernadero durante 3 días, para luego recolectar el tejido infiltrado y realizar ensayos de extracción de RNA y proteínas totales (sección 3.5.1 y 3.8.1).

3.4 TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE *A. thaliana*

Se realizaron cultivos líquidos de *A. tumefaciens* (100 ml; sección 3.2.4), dejándolos crecer hasta saturación. Los 100 ml fueron divididos en 2 Falcon de 50 ml y centrifugados a 5000g durante 20 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 50 ml de medio de infiltración [sacarosa 5% (p/v), silwett L-77 0,05% (p/v)] durante 1 h hasta una D.O._{600nm} de 0,8. Inflorescencias de plantas de 5 semanas fueron sumergidas en la suspensión durante 30 seg, se eliminó el exceso de medio con papel absorbente, se dejaron las plantas en invernadero en oscuridad durante 24 h y luego con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 22°C hasta la obtención de semillas (T0) (Clough & Bent., 1998).

3.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL

3.5.1 Extracción de RNA a partir de hojas de *N. tabacum* agroinfiltradas

Luego de tres días post-agroinfiltración de hojas de *N. tabacum*, se procedió a masar 100 mg de tejido, los cuales fueron puestos en tubos eppendorf de 1,5 ml, congelados en N₂ líquido y almacenados a -80°C. El tejido fue molido en mortero con N₂ líquido, y

para la extracción de RNA se siguieron las indicaciones del método de TRIzol® Reagent (Life Technologies).

3.5.2 Extracción de DNA genómico a partir de hojas caulinares de *A. thaliana*

Semillas de *A. thaliana* (T0) transformantes fueron esterilizadas (sección 3.1.4) y sembradas en placas de Petri con medio MS sólido 1% (p/v) sacarosa, suplementado con higromicina (25 µg/ml). Se dejaron en un incubador con fotoperiodo 16 h luz y 8 h de oscuridad a 22°C durante 2 semanas hasta la observación de plántulas resistentes al medio de selección. Las plántulas fueron trasplantadas a sistema *jiffy* y mantenidas en invernadero. Luego de 4 a 5 semanas se procedió a recolectar dos a tres hojas caulinares, las cuales fueron puestas en tubos eppendorf de 1,5 ml, congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80°C. Se molió el tejido con pistilo frío hasta tener un polvo fino, manteniéndolo en N₂ líquido, se agregaron 400 µl de Buffer de extracción Edward [Tris-HCl 200 mM (pH 7,5), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5 % (p/v)], se agitó vigorosamente durante 5 seg a temperatura ambiente y se centrifugó a 13300 rpm durante 5 min. Se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un tubo eppendorf de 1,5 ml, se adicionaron 300 µl de isopropanol frío y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifugó a 13300 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70% (v/v) invirtiendo los tubos. Se centrifugó a 13300 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente, el cual fue resuspendido en 40 µl Tris-HCl 10 mM pH 8 y almacenado a -20°C.

3.5.3 Extracción de RNA a partir de hojas caulinares de *A. thaliana*

Se recolectaron y masaron 50 mg de tejido de hojas caulinares de *A. thaliana* y se congelaron en N₂ líquido. Se molió el tejido con pistilo y N₂ líquido. Posteriormente se siguieron las indicaciones del kit PowerPlant ® RNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc) para la extracción de RNA.

3.6 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRAÍDOS

3.6.1 Cuantificación

Para la cuantificación de DNA y RNA se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop®ND-1000 UV-Vis. Se midieron las absorbancias 230 nm, 260 nm y 280 nm, con las cuales se calcularon los índices A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Cuando el índice A_{260}/A_{280} es cercano a 1,8 (para DNA) o 2 (para RNA) se considera que las muestras están libres de contaminantes como proteínas o compuestos fenólicos, mientras que cuando el índice A_{260}/A_{230} está dentro del rango 1,8 – 2,2 indica que las muestras no presentan solventes orgánicos y sales. Valores menores a los mencionados anteriormente, indican contaminación de las muestras.

3.6.2 Determinación de la integridad y calidad de ácidos nucleicos

Para determinar la integridad del RNA extraído, éste fue sometido a una electroforesis en condiciones denaturantes. Se preparó un gel de agarosa 1,5% (p/v) en 26,1 ml de

H₂O DEPC, 3 ml de Buffer MOPS 10X [MOPS 0,4 M, acetato de sodio 0,1 M, EDTA 10 mM, llevado a pH 7 con NaOH 10 M en DEPC] y 900 µl de formaldehído 37% (v/v). Se prepararon las muestras de RNA mezclando 1 µl de muestra con 1 µl de buffer de carga (2X RNA Loading Dye de Thermo Scientific™), se incubó a 70°C durante 10 min y luego en hielo durante 5 min. El gel de agarosa fue puesto en la cámara de electroforesis con Buffer MOPS 1X, se cargaron las muestras y se aplicó una diferencia de potencial de 70 V durante 45 min. Posteriormente se visualizaron las bandas en un transiluminador UV y la imagen fue capturada con GeneGenius Classic (SynGene®).

La integridad y calidad del DNA y cDNA se corroboró mediante PCR, amplificando un fragmento del gen *18S* para el caso de cDNA obtenido a partir de hojas de *N. tabacum* y el gen *Actina* para el caso de DNA y cDNA de *A. thaliana*. Para ello, se utilizaron los partidores 18S_F y 18S_R para la amplificación de *18S* y AtActina4_F, AtActina4_R para la amplificación de actina (Tabla 1), los programas de PCR utilizados fueron 18S_FR y Actina respectivamente (Tabla 3). Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa 1,5% (p/v), resueltos por electroforesis y visualizados tal como se indica en sección 3.2.5.

3.7 OBTENCION DE cDNA A PARTIR DE RNA DE TABACO Y ARABIDOPSIS

3.7.1 Tratamiento con DNasa

Luego de extraer el RNA, las muestras fueron tratadas con el fin de eliminar posibles fragmentos de DNA. Para esto se trataron 2 µg de RNA total con 1 U de DNasa I (Thermo Scientific™), buffer DNasaI 1X (Thermo Scientific™), 10 U RiboLock RNase

Inhibitor (Thermo Scientific™) y H₂O DEPC hasta un volumen final de 20 µl. Se incubó a 37°C durante 1 h, se mantuvo 1 min a temperatura ambiente, se agregó 1 µl de EDTA (50 mM) y se incubó a 65°C durante 10 min.

3.7.2 RT-PCR

Para la síntesis de cDNA, se realizó una reacción de transcripción reversa a las muestras de RNA tratadas con DNasa. Se usó el sistema de ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). Se tomaron 11 µl de la reacción de tratamiento con DNasa (sección 3.7.1), se mezcló con 0,1 mM de oligoAp (Tabla 1), se incubó durante 5 min a 70 °C y luego 5 min en hielo. Posteriormente se agregó el “mix RT” compuesto por Buffer ImProm-II™ 5X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 1 mM *mix* en DEPC [dATP 10 mM, dCTP 10 mM, dGTP 10 mM y dTTP 10 mM], 2 µl Improm-II™ Reverse Transcriptase y se llevó a volumen final de 40 µl con agua libre de nucleasas. Luego se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa en un termociclador siguiendo el programa RT-PCR (Tabla 3). Posteriormente las muestras se guardaron a -20°C.

Tabla 1: Partidores utilizados durante el desarrollo del seminario de título. Se indican las secuencias de los partidores, la temperatura *melting* y una breve descripción del lugar de hibridación de estos.

Nombre	Secuencia	T _m (°C)	Descripción
VvSDH_F	5'- ATG GGA AAA GGA GGG ATG TCT CAG GG -3'	61.9	Hibrida desde el inicio del gen
VvSDH_R	5'- GAG GTT GAA CAT GAC CTT AAT GGC AG -3'	57.9	Hibrida desde extremo 3', no incluye el codón de término

			de <i>VvSDH</i>
VvSDH_F-inter	5'-GCC GAT ACA ATC TGT GCC CT -3'	57.5	Híbrida en una región intermedia del gen <i>VvSDH</i> en sentido
pGWB8_F	5'- TAT CCT TCG CAA GAC CCT TCC T -3'	57.8	Híbrida en una región de pGWB8 río arriba del gen
pGWB8_R	5'- CGA GCT CTA AGC ATG ATG ATG ATG -3'	55.5	Híbrida con el tag de histidina
18S_F	5'- TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT -3'	60.6	Híbrida en una región interna del gen <i>18S</i> en sentido
18S_R	5'- ACA ATG ATC CTT CCG CAG GT -3'	60.4	Híbrida en una región interna del gen <i>18S</i> en anti-sentido
His3	5'- CAT TCT GCC GAC ATG GAA GCC ATC A -3'	56	Híbrida en la región del tag de histidina
ccdB_F	5'- GAG AGC CGT TAT CGT CTG TTT GTG GA -3'	60.3	Híbrida en una región interna del gen <i>ccdB</i> en sentido
ccdB_R	5'- TGA TGT CAT TTT CGCGGT GGC TGA GA -3'	62.4	Híbrida en una región interna del gen <i>ccdB</i> en anti-sentido
cmR_F	5'- AGA CGG TGA GCT GGT GAT ATG GGA T -3'	61.4	Híbrida en una región interna del gen <i>cmR</i> en sentido
cmR_R	5'- CAT TCT GCC GAC ATG GAA GCC ATC A -3'	61.5	Híbrida en una región interna del gen <i>cmR</i> en anti-sentido
AtActina4_F	5'- CAC ACT TTC TAC AAT GAG CT -3'	50.1	Híbrida en una región en sentido del gen <i>Actina4</i>

AtActina4_R	5'- GCA GTG ATC TCT TTG CTC AT -3'	52.7	Hibrida en una región en anti-sentido del gen <i>Actina4</i>
OligoAp	5'- CGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'	51	Hibrida con poliA en la región 3' de los mRNA.

Tabla 2: Combinación de partidores usados para la amplificación por PCR de DNA. Se indica la combinación de partidores usados para amplificar fragmentos de DNA plasmidial, genómico, o cDNA de *E. coli*, *A. thaliana* y *N. tabacum* además del nombre y tamaño esperado del fragmento amplificado.

Pares de partidores	Templado	Nombre	Tamaño esperado (pb)
VvSDH_F VvSDH_R	DNA plasmidial cDNA tabaco cDNA Arabidopsis	VvSDH (CDS completo sin codón de término)	1098
pGWB8_F pGWB8_R	DNA plasmidial	VvSDH-his	1290
cmR_F cmR_R	DNA plasmidial	cmR	379
ccdB_F ccdB_R	DNA plasmidial	ccdB	241
cmR_F ccdB_R	DNA plasmidial DNAg Arabidopsis	cmR-ccdB	1039
18S_F 18S_R	cDNA tabaco	18S	200
AtActina4_F AtActina4_R	DNAg Arabidopsis	Actina	800
AtActina4_F AtActina4_R	cDNA Arabidopsis	Actina	700

VvSDH_F His3	DNAg Arabidopsis	VvSDH-his	1164
VvSDH_interF His3	cDNA Arabidopsis	SDHinter-his	809

Tabla 3: Programas de PCR utilizados. Se indica el nombre del programa de PCR, los ciclos, la temperatura y el tiempo para cada etapa del PCR.

Nombre	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)
VvSDH	1	94	05:00
	35	94	00:30
		60	00:50
		72	01:00
	1	72	01:00
pGWB8_FR VvSDHF-His SDHinter-His	1	94	05:00
	35	94	00:30
		56	00:50
		72	01:00
	1	72	01:00
cmR_FR ccdB_FR cmR_F-ccdB_R	1	94	05:00
	35	94	00:30
		60	00:50
		72	01:00
	1	72	10:00
18S_FR	1	94	05:00
	30	94	00:40
		58	00:30

		68	00:50
	1	68	10:00
Actina	1	94	10:00
	35	94	00:25
		54	00:25
		72	00:30
	1	72	05:00
RT-PCR	1	70	05:00
		4	05:00
		25	05:00
		42	60:00
		70	15:00

3.8 DETECCIÓN DE VvSDH-HIS

Se extrajeron las proteínas totales de tabacos transformados transitoriamente con pGWB8-VvSDH, se cuantificaron (sección 3.8.1) y luego se analizaron mediante electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), western blot y dot blot (secciones 3.8.2, 3.8.3 y 3.8.4 respectivamente).

3.8.1 Extracción de proteínas totales a partir de hojas de *N. tabacum*

agroinfiltradas

Luego de tres días se recolectaron hojas agroinfiltradas de *N. tabacum*, se masó 1 g de tejido, se congeló en N₂ líquido y se almacenó en tubos Falcon de 15 ml a -80°C.

Posteriormente se molió el tejido en mortero y N₂ líquido y se homogeneizó con 2 ml de buffer de extracción frío [PVPP 2% (p/v), Tris 50 mM, ácido cítrico monohidratado 7 mM, cisteína HCl monohidratada 6 mM, ácido ascórbico 6 mM, PEG 8000 1 mM; pH 8,3]. La mezcla se centrifugó durante 25 min a 13000 g a 4°C (Muir y cols., 2011). La fracción de proteínas totales solubles se puso en un tubo Falcon de 15 ml y fue almacenado a -20°C para posteriores análisis. Para determinar la concentración de proteínas totales se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976), ocupando cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µg/ml para generar una curva estándar.

3.8.2 SDS-PAGE

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% (p/v) [1,7 ml de agua destilada, 1,25 ml de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 25 µl de SDS 20% (p/v), 2 ml de solución acrilamida 30% (p/v)/ bis-acrilamida 0,8% (p/v), 50 µl de APS 10% (p/v) y 5 µl de TEMED]. El gel concentrador fue preparado al 4% (p/v) [1,54 ml de agua destilada, 625 µl de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 125 µl de SDS 20% (p/v), 335 µl de solución acrilamida 30% (p/v)/ bis-acrilamida 0,8% (p/v), 25 µl de APS 10% (p/v) y 5 µl de TEMED].

La electroforesis en condiciones denaturantes se realizó sumergiendo los geles en buffer de corrida [Tris-HCl 250 mM, pH 8,8, glicina 200 mM y SDS 20% (p/v)]. Las muestras fueron mezcladas con buffer de carga 2X [Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 2% (v/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v), y SDS 4% (p/v)], luego incubadas a 70°C por 10 min y cargadas en el gel. 50 µg de proteína obtenidos de la transformación con pGWB8 y pGWB8-VvSDH y 0,5 µg de proteína control (His-

AtA6PR purificada; Wurman, 2013) fueron cargadas y corridas por 60 min a un potencial de 80 V y luego por 90 min a un potencial de 100 V. Los geles se revelaron mediante tinción Coomassie, tiñéndolos durante 1 h y luego destiñendo con solución de desteñido [metanol, ácido acético y agua destilada] durante 24 h o transferidos a una membrana de nitrocelulosa.

3.8.3 Western blot

Para determinar la presencia y el tamaño de la proteína de fusión VvSDH-His en hojas de tabaco transformadas transitoriamente se realizó un ensayo de western blot anti-His. Para ello se transfirieron las proteínas resueltas en el gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo Trans-Blot® SD “Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell” de Bio-Rad. La transferencia fue efectuada durante 20 min a un potencial de 15 V, posteriormente la membrana fue lavada con agua destilada y luego incubada con Rojo de Ponceau [Rojo de Ponceau 0,1 % (p/v), ácido acético 5 % (v/v)] durante 5 min en agitación. Se lavó nuevamente la membrana con agua destilada y luego se incubó durante 2 h con TBS-T [Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 140 mM y Tween 20 0,1% (p/v)] y 5% (p/v) leche Svelty. Se lavó la membrana 3 veces por 10 min con TBS-T y luego se incubó la membrana con TBS-T, 5% (p/v) leche y el anticuerpo primario His (1/3000, anticuerpo monoclonal anti poli-His producido en ratón, Sigma-Aldrich®) durante 16 h a 4°C. Posteriormente se lavó 3 veces la membrana durante 10 min con TBS-T y se incubó con TBS-T, leche 5% (p/v) más el anticuerpo secundario (fosfatasa alcalina 1/6000, anticuerpo anti IgG de ratón producido en cabra, Sigma-Aldrich®) durante 1 h en agitación. Se lavó la membrana con TBS-T 3 veces por 10 min, luego se



lavó 2 veces por 5 min con buffer alcalino [Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5mM] y se incubó por 30 min con 10 ml de solución buffer alcalino más 66 µl NBT (50 µg/µl) y 33 µl BCIP (25 µg/µl). La reacción de revelado se detuvo con 400 µl de EDTA 0,5 M.

3.8.4 Dot blot

Para determinar la presencia de VvSDH-His en hojas de tabaco transformadas transitoriamente, se realizó el ensayo de dot blot anti-His. Para ello se colocó en una membrana de nitrocelulosa 10 µg del extracto de proteínas totales de la fracción soluble obtenidos de tabacos transformados con pGWB8 y pGWB8-VvSDH y 1 µg de proteína His-AtA6PR purificada (Wurman, 2013), se dejó secar la membrana a temperatura ambiente y luego se incubó en 5 ml de TBS-T [Tris 10 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM y Tween 20 0,05% (v/v)] durante 20 min. Se bloqueó la membrana con 5 ml de solución de bloqueo [5% (p/v) leche en TBS-T] por 1 h y luego se incubó con 5 ml de buffer de dilución [TBS-T, leche 2,5% (p/v)] más el anticuerpo primario His (1/3000, anticuerpo monoclonal anti poli-His producido en ratón, Sigma-Aldrich®) durante 1 h en agitación y a temperatura ambiente. Se lavó la membrana 3 veces por 10 min con TBS-T y luego se incubó con TBS-T, leche 2,5% (p/v) más el anticuerpo secundario (fosfatasa alcalina 1/5000, anticuerpo anti IgG de ratón producido en cabra, Sigma-Aldrich®) durante 1 h en agitación. Se lavó la membrana con TBS-T 3 veces por 10 min y se incubó por 30 min con 10 ml de solución buffer alcalino más 66 µl NBT (50 µg/µl) y 33 µl BCIP (25 µg/µl). La reacción se detuvo con agua destilada (Seepiban y col., 2015).

4. RESULTADOS

4.1 Clonación de VvSDH en pGWB8, un vector binario para la expresión de VvSDH-His en plantas

Para evaluar la funcionalidad de la sorbitol deshidrogenasa de vid (VvSDH) mediante la complementación de mutantes *sdh-* de *A. thaliana*, se generó el vector de destinación pGWB8-VvSDH que posee el CDS de *VvSDH* fusionado a un tag de histidina (6X-His) C terminal.

4.1.1 Extracción de DNA plasmidial a partir de *E. coli*

Se realizó la extracción de DNA plasmidial a partir de células de *E. coli* que poseían los vectores pCR8-VvSDH (Araya, 2013; ver Anexo) y pGWB8 (sección 3.2.1). Se cuantificaron las muestras obtenidas (sección 3.6.1) y luego se utilizaron éstas para realizar la recombinación entre vectores, utilizando la tecnología Gateway.

4.1.2 Recombinación del vector pCR8-VvSDH con el vector de destinación pGWB8

Se realizó la recombinación entre los vectores de entrada y destinación (sección 3.2.2) y luego se transformaron células de *E. coli* (sección 3.2.3). Se realizaron minipreparaciones de 6 colonias positivas para la selección con el antibiótico kanamicina y se realizó un PCR amplificando el CDS de *VvSDH* utilizando los partidores VvSDH_F y R (ver Tabla 2 y Tabla 3, VvSDH). Los productos de PCR fueron cargados en un gel de agarosa, visualizando las bandas del tamaño esperado de 1098 pb aproximadamente (Figura 4).

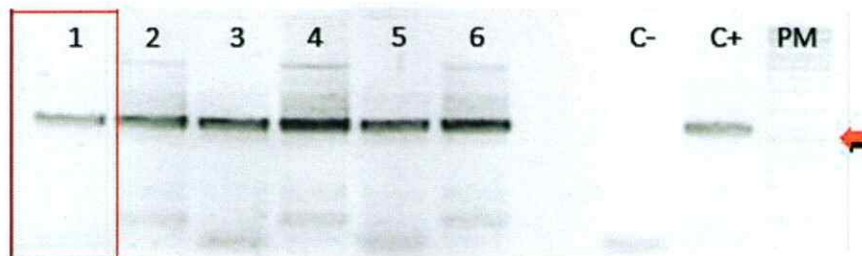


Figura 4: PCR de minipreparaciones de *E. coli* transformadas con pGWB8-VvSDH. Se observan bandas en los carriles del 1 al 6 de aproximadamente 1098 pb, correspondientes al tamaño esperado para el CDS de *VvSDH* obtenido a partir de PCR de 6 minipreparaciones de *E. coli* transformantes. El carril C+ corresponde al vector pCR8-VvSDH purificado usado como templado, mientras que el carril C- corresponde al control negativo de PCR usando como templado agua. La flecha roja indica los 1000 pb del marcador de peso molecular (PM). El cuadro rojo enmarca la minipreparación utilizada en los siguientes experimentos.

Se envió a secuenciar las 6 minipreparaciones y se obtuvo que aquella perteneciente a la colonia 1 poseía un 100% de identidad nucleotídica con la secuencia obtenida por Araya (2013) no presentaba su codón de término y poseía la secuencia que codifica para el epítipo de histidina en el extremo 3' de *VvSDH* (ver Anexo).

4.1.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con pGWB8 y pGWB8-VvSDH y verificación por PCR

Se transformó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 (sección 3.2.4) con pGWB8 y con el clon número 1 de pGWB-VvSDH (sección 4.1.2) por golpe térmico. Se seleccionaron 4 colonias transformantes, resistentes al antibiótico kanamicina para ambos casos, y se

realizó un PCR de colonia amplificando fragmentos de los genes *cmR* (usando los partidores *cmR_F-R*), *ccdB* (con los partidores *ccdB_F-R*) y la combinación *cmR-ccdB* (usando los partidores *cmR_F-ccdB_R*) para corroborar la presencia del vector vacío (Figura 5 A, B y C), y amplificando el CDS de *VvSDH* (Figura 6) para verificar la presencia del vector pGWB8-*VvSDH* (partidores pGWB8_F-R, Tabla 2).

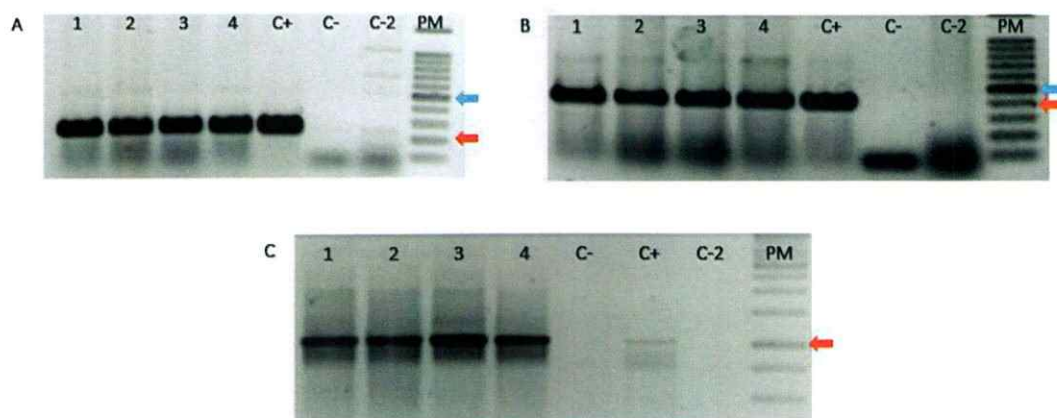


Figura 5: PCR de colonia de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con pGWB8. A. Amplificado de un fragmento del gen *ccdB*. Se observan bandas del tamaño esperado de 241 pb. La flecha roja indica los 200 pb del marcador de peso molecular (PM). **B.** Amplificado de un fragmento del gen *cmR*. Se observan bandas de 379 pb aproximadamente. La flecha roja indica los 400 pb del PM. La flecha azul para los paneles A y B indica los 500 pb del PM. **C.** Amplificado de combinación de *cmR-ccdB*, observándose bandas del tamaño esperado de 1039 pb. La flecha indica los 1000 pb. Para los paneles A, B y C, los carriles 1 al 4 representan las colonias independientes de *A. tumefaciens* transformadas, C+ corresponde al control positivo del PCR (pGWB8 purificado como templado), C- corresponde al control negativo del PCR (agua como templado) y C-2 corresponde a un segundo control negativo del PCR (pGWB8-*VvSDH* purificado como templado).

Como se observa en la Figura 5 A, B y C, las 4 colonias analizadas dieron positivas para el PCR usando los respectivos pares de primarios, corroborando así la presencia del vector vacío, pGWB8, en *A. tumefaciens*.

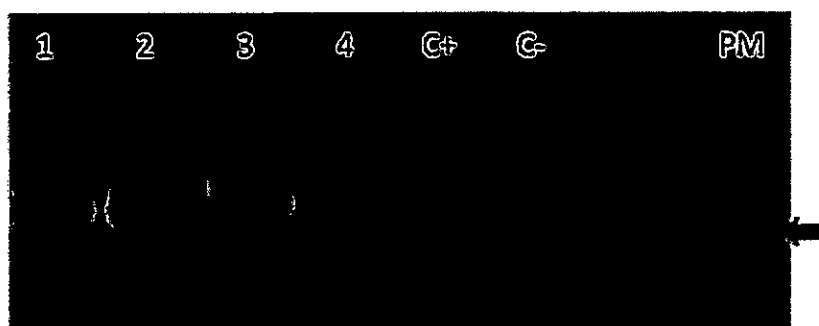


Figura 6: Amplificado de CDS de *VvSDH* a partir de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con pGWB8-*VvSDH*. Carriles del 1 al 4 corresponden a colonias independientes de *A. tumefaciens* transformadas. Se observa una banda del tamaño esperado de 1290 pb aproximadamente. El carril C+ corresponde al control positivo de PCR (usando pGWB8-*VvSDH* purificado como templado) y el carril C- corresponde al control negativo del PCR, usando agua como templado. La flecha indica los 1000 pb del marcador de peso molecular (PM).

La Figura 6 demuestra que las colonias analizadas poseen efectivamente el vector pGWB8-*VvSDH*, presentando así el CDS de *VvSDH* y el epítipo de histidina. Por lo tanto, mediante técnicas moleculares (PCR y secuenciación) se comprueba la obtención del vector pGWB8-*VvSDH*, con lo cual se cumple el objetivo específico 1 de este Seminario de Título.

4.2 Determinación de la funcionalidad del vector pGWB8-VvSDH mediante la transformación transitoria de hojas de *Nicotiana tabacum*

4.2.1 Evaluación de la expresión del gen *VvSDH*

Una vez corroborada la presencia de los vectores en *A. tumefaciens* (sección 4.1.3) se realizaron cultivos líquidos (sección 3.2.4) y se transformaron transitoriamente paneles de hojas de *N. tabacum* por agro-infiltración (sección 3.3) para evaluar la expresión del gen de una forma rápida y efectiva. Tres días post infiltración se recolectó el tejido agroinfiltrado y se procedió a extraer el RNA total (sección 3.5.1), corroborando la calidad e integridad de éstos por electroforesis en condiciones denaturantes (sección 3.6.2) (Figura 7 A). Posteriormente al tratamiento con DNasa, se realizó la síntesis de cDNA (sección 3.7.1 y 3.7.2 respectivamente) y se verificó su integridad mediante PCR de un fragmento del gen *18S* (Figura 7 B).

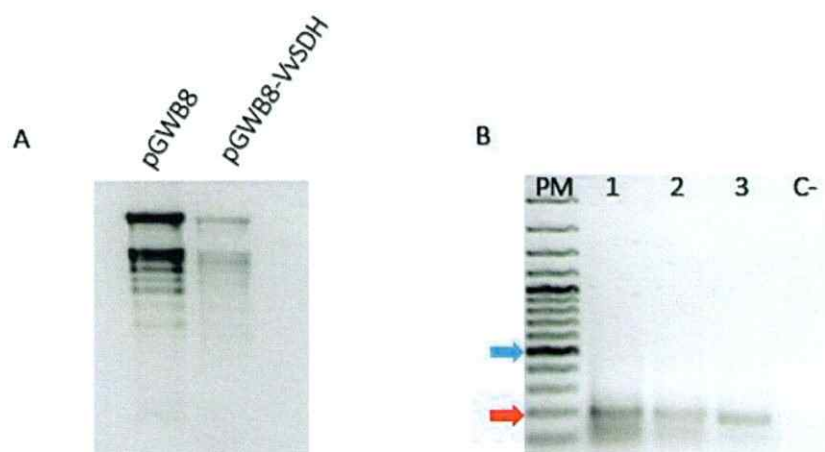


Figura 7: Obtención y verificación de la calidad de RNA total extraído de tabaco agro-infiltrado. **A.** Electroforesis en condiciones denaturantes de muestras de RNA total extraídas desde hojas de tabaco transformadas transitoriamente con pGWB8 y pGWB8-VvSDH. **B.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de un fragmento del gen *18S* obtenidos a partir del cDNA sintetizado desde RNA. Se observa en los 3 carriles la amplificación de una banda de 200 pb, correspondientes al tamaño esperado para este fragmento. Carril 1 corresponde al producto de PCR proveniente de tabaco transformado con pGWB8, carril 2 corresponde al producto de PCR proveniente de tabaco transformado con pGWB8-VvSDH, carril 3 corresponde al producto de PCR proveniente de tabaco silvestre (no-transformado) y C- corresponde al control negativo del PCR usando como templado agua. La flecha roja indica la banda de 200 pb y la flecha azul indica los 500 pb del marcador de peso molecular (PM).

Luego de verificar la calidad e integridad del cDNA, se utilizó éste para determinar la expresión del gen *VvSDH* mediante un PCR, utilizando los partidores *VvSDH_F* y *VvSDH_R* (Tabla 2).

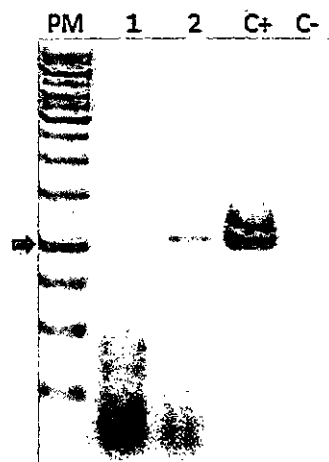


Figura 8: Determinación de la funcionalidad transcripcional de pGWB8-VvSDH. Productos de RT-PCR para la amplificación de *VvSDH* utilizando como template cDNA sintetizado a partir de RNA de hojas de tabaco transformadas con pGWB8 (carril 1) y pGWB8-VvSDH (carril 2). C+ corresponde al control positivo del PCR (DNA plasmidial pGWB8-VvSDH purificado como template) y C- corresponde al control negativo del PCR (usando agua como template). La flecha roja indica 1000 pb del marcador de peso molecular (PM).

Se observa en la Figura 8 la presencia de una banda solo en el carril 2 de un tamaño aproximado de 1098 pb correspondientes al CDS de *VvSDH*, demostrando la expresión del gen luego de agro-infiltrar hojas de tabaco con pGWB8-VvSDH. Mientras que en el carril 1 no se observan bandas, corroborando que el constructo pGWB8 es un control negativo de transformación.

4.2.2 Determinación de la traducción del gen *VvSDH-His*

Corroborada la expresión del transcrito, se procedió a verificar la traducción de éste. Para ello se transformaron hojas de tabaco (sección 3.3) con ambos vectores, de manera

independiente. Luego de 3 días post-infiltración se recolectó el tejido y se extrajeron las proteínas totales de la fracción soluble e insoluble (sección 3.9.1). La verificación de la presencia de la proteína VvSDH-His se realizó en primer lugar mediante un gel de poliacrilamida y western blot (Figura 9 A y B respectivamente) y posteriormente por *dot-blot* (Figura 10 A y B), utilizando un antisuero primario anti-His (sección 3.9.2).

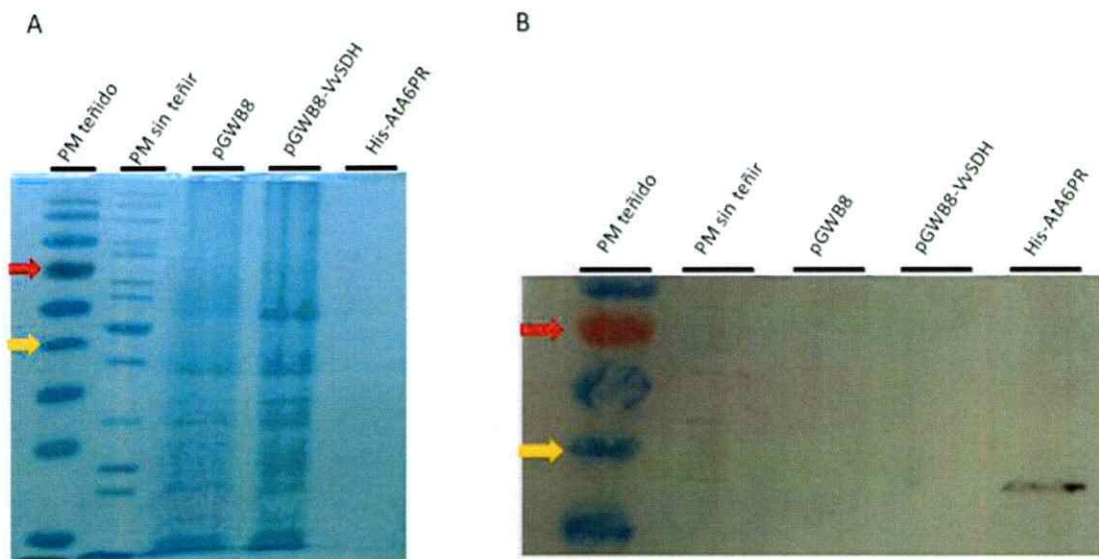


Figura 9: Ensayo de western blot anti-His. Extractos crudos de proteínas totales de la fracción solubles fueron obtenidos a partir de hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* portando pGWB8-VvSDH o pGWB8. Proteínas (50 μ g) fueron cargadas en un gel de poliacrilamida (A) y luego sometido a ensayo de western blot (B) usando un antisuero primario anti-His. Control positivo del ensayo, proteína recombinante His-AtA6PR purificada (Wurman, 2013). La flecha roja indica los 70 kDa y la flecha naranja indica los 40 kDa de marcador de peso molecular.

En la Figura 9 A, se muestra el patrón de bandas en el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de extractos crudos de proteínas solubles de tabacos transformados con pGWB8

y pGWB8-VvSDH, se cargó además en el gel el control positivo His-AtA6PR purificada, carril donde no se observa una banda, pero si se observa la señal luego de realizar el ensayo de western blot. En la Figura 9 B, se visualiza solo el control positivo del ensayo, correspondiente a la proteína recombinante His-AtA6PR purificada de 35 kDa (Wurman, 2013). Sin embargo, e inesperadamente, no se observan bandas en el carril pGWB8-VvSDH (el tamaño esperado de VvSDH-His es 39,25 kDa). En el carril pGWB8 igualmente no se observan bandas, lo que es esperado, ya que plantas transformadas solo con el vector no deberían expresar ninguna proteína que pueda ser reconocida por el anticuerpo-primario. Una posible explicación de la ausencia de bandas en la muestra pGWB8-VvSDH es la dilución que sufren todas las proteínas al ser resueltas en un gel de poliacrilamida (ver Discusión). Por lo tanto, se procedió a realizar un análisis de *dot blot* con los mismos extractos proteicos, que concentra todas las proteínas en una superficie muy reducida.

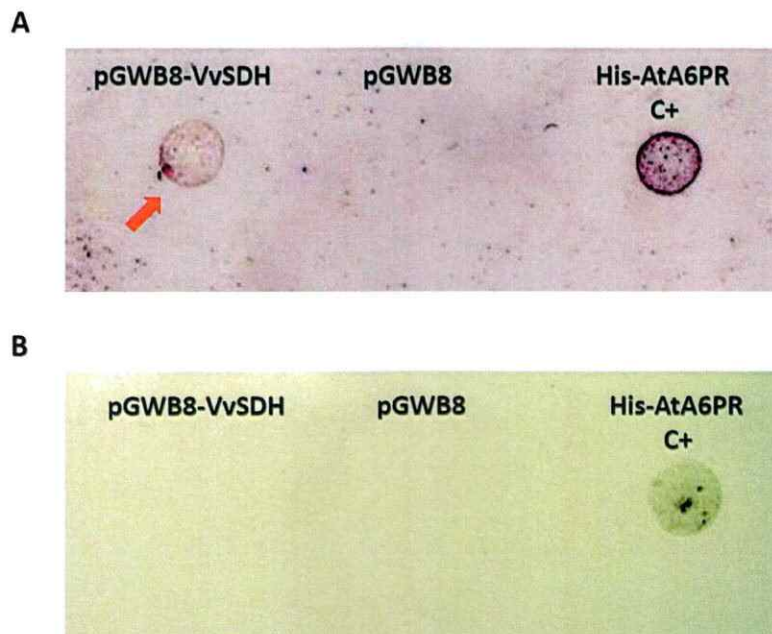


Figura 10: Ensayo de dot blot anti-His. Extractos crudos de proteínas totales de la fracción solubles (A) e insoluble (B) fueron obtenidos a partir de hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* portando pGWB8-VvSDH o pGWB8. 10 μ g de proteínas fueron depositadas en una membrana de nitrocelulosa y sujetas a un ensayo de dot-blot usando un antisero primario anti-His. Flecha roja indica la posición donde se encuentra el halo correspondiente a la proteína de fusión VvSDH-His, control positivo del ensayo, proteína recombinante His-AtA6PR purificada (Wurman, 2013).

En Figura 10 A, se observa la presencia de la proteína VvSDH-His en forma de un halo indicado por la flecha roja, lo que demuestra que la proteína de fusión si está siendo expresada en hojas de tabaco transformadas con pGWB8-VvSDH, mientras que no se observa un halo en aquellas hojas transformadas con el vector vacío (pGWB8). Se realizó además el mismo ensayo de dot blot con la fracción insoluble de proteínas para descartar que la proteína de interés VvSDH-His estuviese en el pellet, de acuerdo a esto,

se observa en la Figura 10 B solo la señal del control positivo His-AtA6PR, determinando que la proteína de fusión VvSDH-His se encuentra en la fracción soluble de proteínas. Por lo tanto, mediante técnicas moleculares se comprueba que pGWB8-VvSDH es funcional a nivel transcripcional y traduccional, con lo cual se cumple el objetivo específico 2 de este Seminario de Título.

4.3 Transformación estable de plantas silvestres y mutantes *sdh*- de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión floral con pGWB8-VvSDH y análisis molecular de plantas transformantes

Para determinar la funcionalidad de la proteína sorbitol deshidrogenasa de vid (VvSDH) se realizó posteriormente la transformación estable de 4 líneas de *A. thaliana* (sección 3.4) ecotipos Col-0; silvestre, *sdh1-1*, *sdh1-3* y *sdh1-4*, mediante inmersión floral. Posteriormente, se sembraron aproximadamente 4000 semillas T0 de cada línea transformada en medio de selección con higromicina (25 µg/ml).

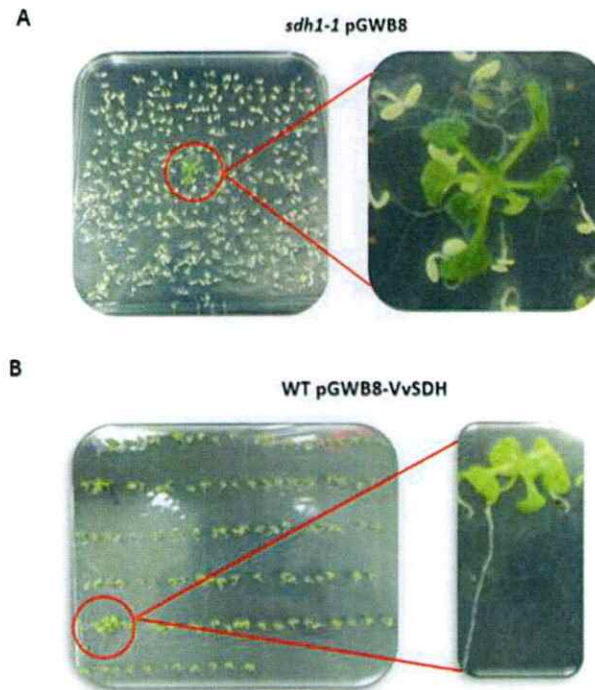


Figura 11: Siembra de semillas T0 de *Arabidopsis thaliana* transformadas con pGWB8 (A) o pGWB8-VvSDH (B) en medio de selección. Semillas de *Arabidopsis* transformantes (T0) fueron sembradas en medio MS, 3% de sacarosa y 25 μ g/ml de higromicina. A y B son imágenes referenciales que muestran cómo se visualizan las plantas resistentes al antibiótico, 14 días post-siembra. A corresponde a plántulas de la línea *sdh1-1* transformadas con pGWB8, B corresponde a plántulas de la línea silvestre (WT) transformadas con pGWB8-VvSDH. El círculo rojo encierra aquellas plantas resistentes al antibiótico, y se muestra además un acercamiento de éstas.

En la Figura 11 se muestran cómo se ven las semillas de *A. thaliana* transformantes sembradas en medio de selección (MS con higromicina). Se observa que todas las semillas germinan pero solo algunas logran crecer y desarrollar hojas verdaderas y un

crecimiento en el largo de la raíz, lo cual es el primer indicio de que estas plantas son transformantes.

4.3.1 Extracción de DNA genómico

Se realizaron extracciones de DNAg (sección 3.5.2) de hojas caulinares de plantas resistentes a higromicina de 4 semanas, transformadas con pGWB8 como control negativo, y con pGWB8-VvSDH. Se verificó la calidad de los ácidos nucleicos obtenidos mediante la amplificación por PCR (ver Tabla 3) de un fragmento del gen *Actina* (partidores AtActina4_F y R, Tabla 2) y se visualizaron los resultados en geles de agarosa (Figura 12).

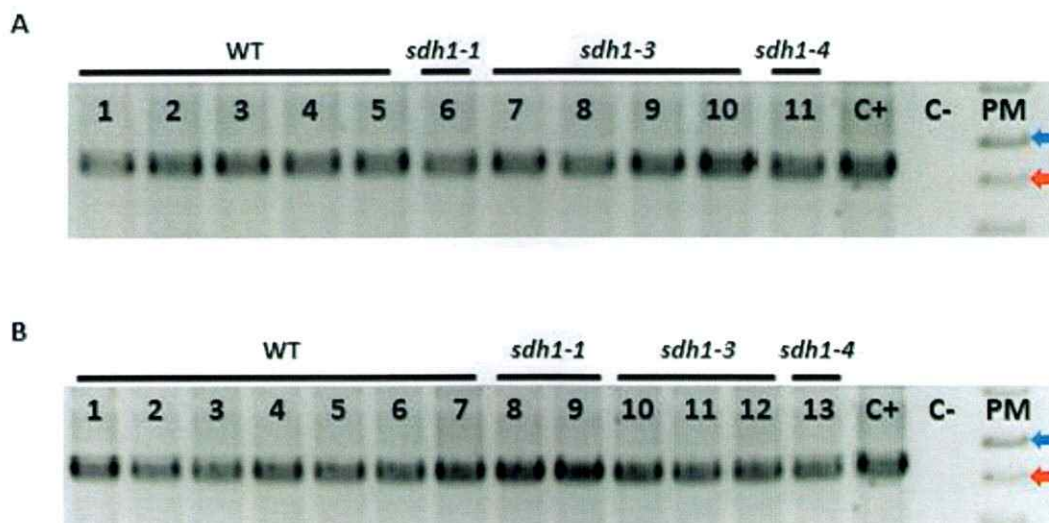


Figura 12: Amplificación por PCR de un fragmento del gen *Actina* de *A. thaliana* transformadas con pGWB8 (A) o pGWB8-VvSDH (B). A. Amplificados de PCR usando como templado DNAg de plantas transformadas con pGWB8. B. Amplificados de PCR usando

como templado DNAg de plantas transformadas con pGWB8-VvSDH. Se observan bandas en todos los carriles, tanto en A como en B del tamaño esperado de 800 pb aproximadamente. C+ corresponde al control positivo del PCR usando DNAg de plantas silvestres no-transformadas, C- corresponde a un control negativo de PCR usando como templado agua. La flecha roja indica los 750 pb del marcador de peso molecular (PM) y la flecha azul los 1000 pb.

Una vez corroborada la integridad y calidad del DNA, se amplificaron fragmentos de DNA de los vectores por PCR, para determinar la presencia de pGWB8 y pGWB8-VvSDH en el genoma de las plantas transformadas. Para plantas transformadas con pGWB8, se amplificó la combinación de los genes *cmR-ccdB* (ver Tabla 2) y para plantas transformadas con pGWB8-VvSDH, se amplificó el gen *VvSDH* fusionado al tag de *histidina* usando la combinación de partidores VvSDH_F-His3 (ver Tabla 2). Los resultados se muestran en la Figura 13.

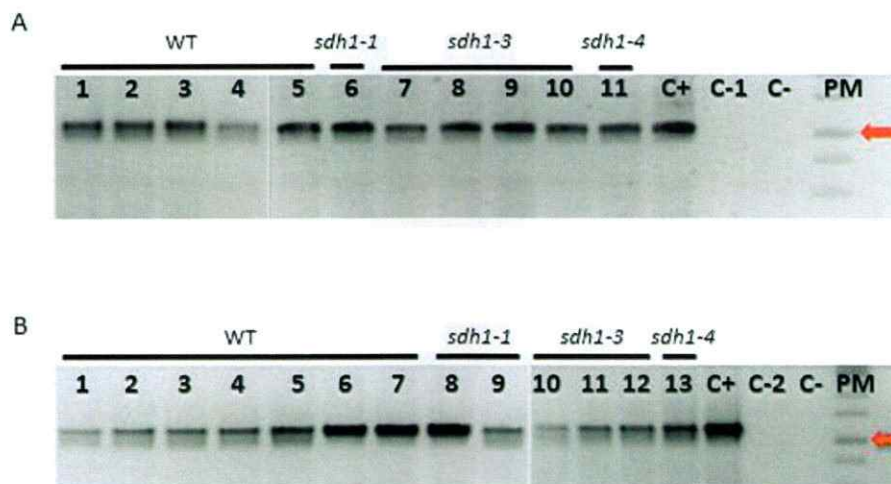


Figura 13: Amplificación por PCR de los genes *cmR-ccdB* y *VvSDH-His* de *A. thaliana*

transformadas con pGWB8 (A) o pGWB8-VvSDH (B), respectivamente. **A** Amplificados de PCR de los genes *cmR-ccdB*, usando como templado DNAg de plantas transformadas con pGWB8. Se observan bandas del tamaño esperado en todos los carriles de 1039 pb aproximadamente. C+ corresponde al control positivo, usando como templado pGWB8 purificado, C-1 corresponde a un control negativo de PCR usando como templado pGWB8-VvSDH purificado y C- es un control negativo usando como templado agua. **B.** Amplificados de PCR del gen *VvSDH-His*, usando como templado DNAg de plantas transformadas con pGWB8-VvSDH. Se observan bandas del tamaño esperado de 1164 pb en todos los carriles. C+ corresponde al control positivo, usando como templado pGWB8-VvSDH purificado, C-2 corresponde a un control negativo de PCR usando como templado pGWB8 purificado y C- es un control negativo usando como templado agua. La flecha roja indica los 1000 pb del marcador de peso molecular (PM).

De esta manera, se verificó la presencia de los genes *cmR-ccdB* y *VvSDH-His*, demostrando que la transformación de plantas de *A. thaliana* con ambos vectores fue realizada exitosamente.

4.3.2 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Con la extracción de DNAg y la amplificación de genes claves se determinó que las plantas transformadas con los vectores habían integrado los transgenes al genoma vegetal. Para determinar si éstos estaban siendo expresados, se realizó la extracción de RNA total (sección 3.5.3) de plantas transformantes con pGWB8-VvSDH, se cuantificaron (sección 3.6.1) y se determinó la calidad de los RNA mediante electroforesis en condiciones denaturantes (sección 3.6.2; Figura 14). Luego, se sintetizó el cDNA que fue usado como templado para amplificar un fragmento del gen *Actina* y el

gen *VvSDH* con o sin el epítipo de *histidina*. Los resultados se muestran en la Figura 15 y 16 respectivamente.

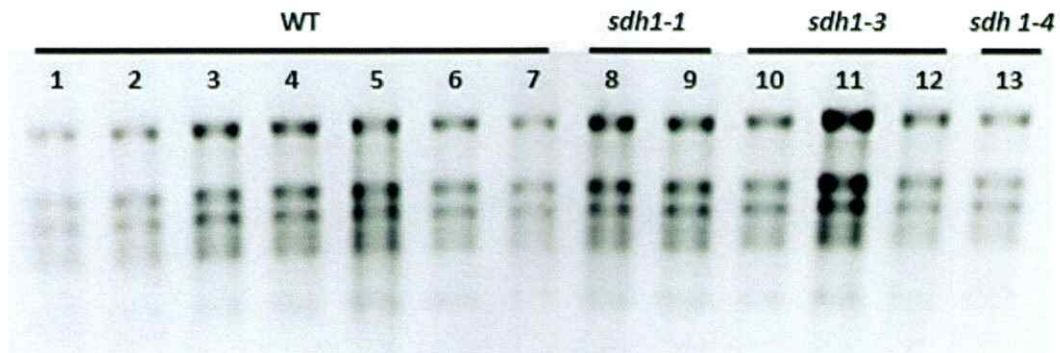


Figura 14: Verificación de la calidad de RNA totales. Electroforesis en condiciones denaturantes de muestras de RNA total extraídos desde hojas caulinares de *A. thaliana* transformantes que portan pGWB8-VvSDH. Carriles 1 al 7 corresponde a RNAs de la línea silvestre (WT), carril 8 y 9 corresponde a RNAs de la línea *sdh1-1*, carril 10 al 12 corresponde a RNAs de la línea *sdh1-3* y carril 13 corresponde a RNA de la línea *sdh1-4*.

A partir de la Figura 14 se puede determinar que los RNAs extraídos son de buena calidad, aunque no uniformes en concentración, además se obtuvo mediante cuantificación de éstos (A_{260} / A_{230} y A_{260} / A_{280} , sección 3.6.1), valores entre 2 y 2,1, lo que permite proseguir con la síntesis de cDNA.

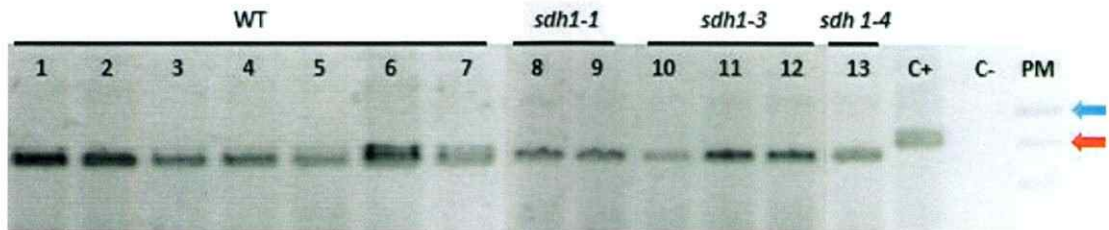


Figura 15: Amplificación por PCR de un fragmento del gen *Actina* de *A. thaliana* transformantes que portan pGWB8-VvSDH. Amplificados de PCR de un fragmento del gen *Actina*, usando como templado cDNA de plantas transformantes. Se observan bandas del tamaño esperado en todos los carriles de 700 pb aproximadamente. C+ corresponde al control positivo, usando como templado DNAg de *A. thaliana* silvestre, C- corresponde a un control negativo de PCR usando como templado agua. La flecha roja indica los 750 pb y la flecha azul indica los 1000 pb del marcador de peso molecular (PM).

En la Figura 15 se observa la amplificación de un fragmento del gen *Actina* del tamaño esperado de 700 pb en todos los carriles, lo que permite verificar la correcta síntesis del cDNA de cada planta transformante con pGWB8-VvSDH.

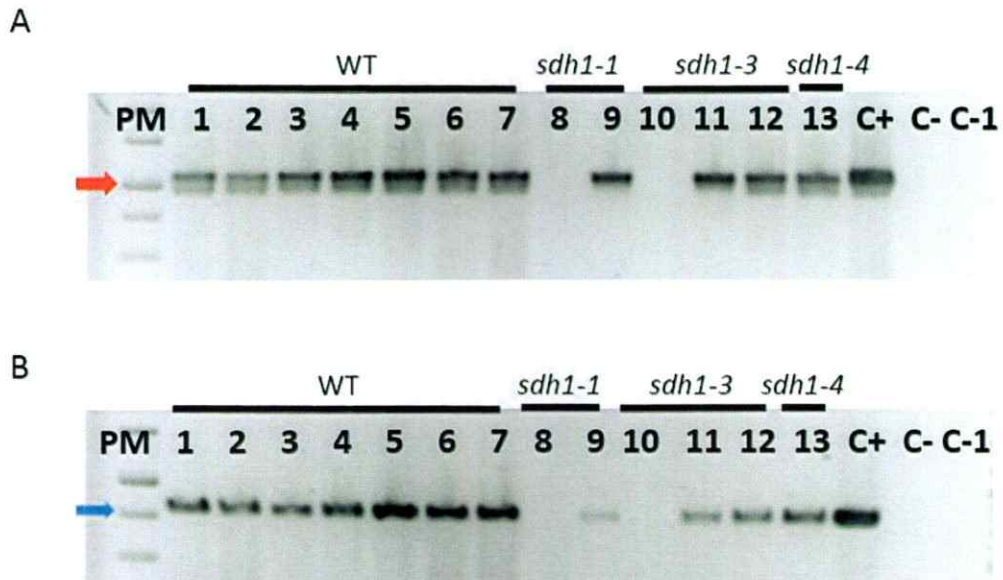


Figura 16: Amplificación de *VvSDH* (A) y *VvSDH-His* (B) por RT-PCR en *Arabidopsis* transformados con pGWB8-*VvSDH*. A. Amplificado de *VvSDH* por RT-PCR utilizando partidores *VvSDH_F* – R. Se observan bandas del tamaño esperado de 1098 pb en todos los carriles, exceptuando el 8 y 10. B. Amplificado de *VvSDH-His* por RT-PCR utilizando partidores *VvSDH_interF* – His3. Se observan bandas del tamaño esperado de 809 pb en todos los carriles, exceptuando el 8 y 10. Para A y B se usó como templado cDNA (10 ng/μl) de plantas transformantes con pGWB8-*VvSDH*, C+ corresponde al control positivo, usando como templado pGWB8-*VvSDH* purificado, C- corresponde a un control negativo de PCR usando como templado DNAg de una planta silvestre no-transformada y C-1 es un control negativo usando como templado agua. La flecha roja indica los 1000 pb del marcador de peso molecular (PM) y la flecha azul indica 750 pb.

La amplificación de *VvSDH* y *VvSDH-His* se realizó utilizando distintas concentraciones de cDNA (5, 10, 15 y 25 ng/μl), para descartar que la ausencia de amplificación del fragmento de DNA en los carriles 8 y 10 (Figura 16 A y B) se debiese a un problema de

concentración de templado. Esto fue corroborado ya que no se observaron bandas en los carriles antes mencionados a las concentraciones utilizadas.

Mediante la amplificación de *VvSDH-His* a partir de cDNA sintetizado de plantas transformadas con el vector de interés se demostró que éste está siendo expresado por las plantas transformantes, dando por cumplido el objetivo específico 3 de este Seminario de Título y parcialmente el objetivo específico 4.

4.3.3 Porcentaje de eficiencia de la transformación de *A. thaliana*

Se calculó el porcentaje de eficiencia de la transformación de las plantas transformadas con pGWB8 en base al número de plantas PCR positivas y pGWB8-*VvSDH*, en base al número de plantas RT-PCR positivas (Tabla 4, respectivamente), valores mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4: Tabla resumen de plantas de *A. thaliana* transformantes. Se indica el vector utilizado, líneas de *A. thaliana* transformadas, número aproximado de semillas sembradas en medio MS con higromicina y las resistentes al antibiótico. Además, se indica el número de plantas transformantes positivas verificadas por PCR y RT-PCR y el porcentaje de eficiencia de la transformación.

Vector	Línea	Nº semillas sembradas (aprox)	Nº semillas resistentes a higromicina	PCR positivas	RT-PCR positivas	% de eficiencia
pGWB8	WT	4000	5	5	NA	0,125
	<i>sdh1-1</i>	4000	1	1	NA	0,025
	<i>sdh1-3</i>	4000	4	4	NA	0,1
	<i>sdh1-4</i>	4000	1	1	NA	0,025
pGWB8-	WT	4000	7	7	7	0,175

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE

VvSDH	<i>sdh1-1</i>	4000	2	2	1	0,025
	<i>sdh1-3</i>	4000	3	3	2	0,05
	<i>sdh1-4</i>	4000	1	1	1	0,025

NA: no aplica

5. DISCUSIÓN

La transformación de sorbitol a fructosa es llevada a cabo por la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH), principalmente en órganos sumideros de especies pertenecientes a la familia *Rosaceae* (Bielecki, 1982). Sin embargo, se ha encontrado que dicha enzima no solo está presente en especies de esta familia, sino que también en otras familias como *Brassicaceae* (Nosarzewski & Downie, 2012), *Vitaceae* (Conde y col., 2015), entre otras. En *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*), se ha descrito la enzima sorbitol deshidrogenasa (AtSDH, At5g51970), localizada en citoplasma (Mandujano, 2010) y se ha observado que mutantes para esta enzima toleran de mejor manera el déficit hídrico (Aguayo y col., 2013).

En el presente Seminario de Título se trabajó con el gen *VvSDH* de *Vitis vinifera* (Araya, 2013), que codifica para una posible SDH. Para determinar la funcionalidad de la proteína se transformaron plantas de *Arabidopsis* silvestres y deficientes en la enzima AtSDH con el fin de revertir el fenotipo de las mutantes. Para ello, se construyó el vector de expresión pGWB8-VvSDH, el cual fue analizado molecularmente y se utilizó para transformar en una primera instancia plantas de tabaco con el fin de determinar la funcionalidad del vector de una manera rápida, obteniéndose que el transgen (*VvSDH-His*) es expresado y traducido a proteína. De forma paralela se transformaron plantas de *Arabidopsis* silvestres y mutantes para la enzima (*sdh1-1*, *1-3* y *1-4*), las cuales fueron analizadas molecularmente, donde se determinó que las plantas obtenidas tenían integrado el gen y éste estaba siendo transcrito.

5.1 Clonación de VvSDH en pGWB8, un vector binario para la expresión de VvSDH-His en plantas.

Para poder transformar las plantas de interés y determinar la funcionalidad de la enzima VvSDH, se construyó el vector de expresión pGWB8-VvSDH, el cual permite la expresión constitutiva del gen de interés ya que está bajo el promotor 35S. Además posee un epítipo de histidina que permite reconocer la proteína de fusión generada y posee dos marcadores de selección, kanamicina para la selección en bacterias y el gen de resistencia a higromicina que permite la selección en plantas (Nakagawa y col., 2007 y 2009). Luego de realizar los análisis moleculares, se obtuvo que al menos un clon presentaba las características necesarias/deseadas para la transformación de plantas (Figura 4, carril 1), cumpliendo de esta forma el objetivo específico 1.

Se obtuvieron células de *E. coli* y *A. tumefaciens* transformado con el vector generado, las cuales se corroboraron por PCR, amplificando el gen de interés con diferentes pares de partidores (ver Tabla 2) obteniendo bandas del tamaño esperado al utilizar colonias de *E. coli* y *A. tumefaciens* como templado (Figuras 4 y 6 respectivamente), lo cual indicaría la correcta construcción del vector binario. Se transformaron también células de *A. tumefaciens* con el vector binario vacío con el fin de tener un control negativo para la transformación de plantas. Las colonias obtenidas fueron igualmente sometidas a análisis moleculares, donde se amplificaron fragmentos de los genes *cmR* y *ccdB* (Figura 5A, B, C), obteniendo las bandas de los tamaños esperados. El gen *cmR* que codifica para la resistencia al antibiótico cloranfenicol, es utilizado para la selección en bacterias,

no así en plantas, y el gen *ccdB*, es un gen letal que tiene como blanco la DNA girasa, y es utilizado para la selección de *E. coli* transformantes que contienen el DNA recombinante (Loris y col., 1999), por lo que plantas transformadas con el vector vacío generarían líneas que servirían como control de transformación, además permitiría descartar que el vector tiene un efecto negativo al momento de transformar plantas.

5.2 Análisis de la funcionalidad de pGWB8-VvSDH mediante transformación transitoria de hojas de tabaco

Se realizó el análisis de funcionalidad del vector binario transformando en primer lugar hojas de tabaco de manera transitoria, y posteriormente las líneas de Arabidopsis establemente. La transformación transitoria tiene la ventaja de obtener los resultados de forma efectiva y en un menor periodo de tiempo con respecto a la transformación estable. Se requiere de un total de 4 días, los que incluye los 3 días post-infiltración para la recolección de tejido infiltrado y un día para los análisis moleculares (Sparkes y cols., 2006), mientras que si solo se realizara la transformación estable en Arabidopsis, el tiempo estimado es de 3 meses; se deben obtener líneas transformantes (T1) para evaluar la integración del gen en el genoma de la planta y luego determinar si está siendo expresado.

5.2.1 Expresión del gen *VvSDH*

Realizada la transformación transitoria de hojas de tabaco con los vectores pGWB8 y pGWB8-VvSDH, la extracción de RNA total, el RT-PCR para las muestras y la posterior amplificación del gen *VvSDH*, utilizando partidores específicos para el gen

(ver Tabla 2), se observó que éste estaba siendo expresado solo en las hojas infiltradas con pGWB8-VvSDH (Figura 8, carril 2). Este resultado es esperado, ya que aquellas plantas transformadas con el vector vacío no poseen la secuencia codificante de la SDH de vid, por lo que no se esperaba la amplificación de *VvSDH* (Figura 8, carril 1), solo presenta las secuencias *ccdB* y *cmR* (Loris y col., 1999).

5.2.2 Traducción del gen *VvSDH-His*

Se volvió a transformar hojas de tabaco con los vectores ya mencionados para determinar si *VvSDH-His* estaba siendo traducido. Como primer abordaje para la determinación de la presencia de la proteína, se realizó un western blot usando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal anti poli-His. Sin embargo, no se observó la banda correspondiente a la proteína *VvSDH-His* de 39,25 kDa (Figura 9 B). La ausencia de una banda podría deberse a varios factores. Primero, en la agro-infiltración, no todas las células son transformadas, reduciendo la acumulación de proteínas exógenas. Segundo, el método de extracción de proteínas utilizado permite extraer las proteínas totales de la fracción solubles, teniendo entonces una mezcla de proteínas y la proteína de interés en muy bajas concentraciones. Tercero, en un ensayo de SDS-PAGE, las proteínas presentes son diluidas al ser resueltas en el gel. Cuarto, el método de extracción utilizado pudo no ser 100% eficiente, ya que al momento de centrifugar las muestras, parte de la proteína de interés pudo haber quedado en el pellet. Sin embargo, esto puede ser descartado ya que al realizar el ensayo de *dot blot* con la fracción insoluble, no se observó una señal en la sección donde se cargaron las proteínas de plantas transformadas con el vector pGWB8-VvSDH (Figura 10 B). Sin embargo, la

técnica utilizada (western blot) no presentó problemas de ejecución, ya que sí fue posible observar la banda correspondiente al control positivo (His-AtA6PR purificada) (Figura 9 B). Como alternativa para detectar la presencia de VvSDH-His, se podría purificar la proteína de interés mediante una columna afinidad que une al epítipo de poli-histidina y luego realizar el ensayo de western blot, pero este procedimiento requería de un mayor tiempo.

Por estas razones, se realizó un ensayo de *dot blot*, usando igualmente el anticuerpo monoclonal anti poli-His para la detección de VvSDH-His. Esta técnica que consiste en depositar solo una gota de la muestra de proteínas en la membrana de nitrocelulosa favorece que en un área menor se concentren todas las proteínas y fue aquí donde sí se observó la presencia de un halo en la membrana (Figura 10 A, flecha roja), lo cual indica que la proteína de fusión si está siendo expresada en hojas de tabaco transformadas con pGWB8-VvSDH, no así en hojas transformadas con pGWB8. Por otro lado, la utilización del control His-AtA6PR nos permite determinar que el anticuerpo utilizado es específico para el epítipo de histidina. Sin embargo, no es posible comparar la intensidad de los halos observados, ya que el control corresponde a proteína purificada, mientras que la muestra en estudio es una mezcla de proteínas solubles totales, que contiene la proteína de interés VvSDH-His.

Le técnica del *dot blot* tiene la ventaja de poder realizarla en un menor tiempo comparado con el ensayo de western blot. Sin embargo, no entrega información del tamaño de la proteína, sino que solo da cuenta de la presencia o ausencia de ésta (Seepiban, 2015).

5.3 Transformación estable de plantas silvestres y mutantes *sdh-* de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión floral con pGWB8-VvSDH y análisis molecular de plantas transformantes

Al transformar plantas silvestres y mutantes *sdh-* de *A. thaliana* se obtuvo un total de 10 líneas transformantes con pGWB8 y 13 líneas transformantes con pGWB8-VvSDH procedentes de aproximadamente 4000 semillas por línea sembradas en medio de selección. Cada planta de *A. thaliana* resistente al antibiótico fue confirmada mediante PCR, donde se obtuvo que todas aquellas plantas transformantes portando pGWB8 habían integrado la región del T-DNA que contiene los genes *cmR* y *ccdB* (Figura 13 A), mientras que para las líneas transformantes portando pGWB8-VvSDH se observó que éstas habían integrado a su genoma el gen *VvSDH-His* (Figura 13 B). Corroboradas las líneas transformantes portando pGWB8-VvSDH, se determinó si el transgen estaba siendo expresado, para lo cual se sintetizó el cDNA para cada línea y se confirmó mediante PCR. Se obtuvo un total de 11 líneas RT-PCR positivas (ver Tabla 4). Sin embargo, para las líneas *sdh1-1* 8 y *sdh1-3* 10 (Figura 16 A y B) no se observó la banda esperada, lo cual estaría indicando que a pesar de haber sido integrado el T-DNA en el genoma, éste no está siendo expresado. Se puede afirmar esta conclusión ya que sí se

observa en la Figura 14 (integridad RNA) y la Figura 15 (PCR *Actina*), que los ácidos nucleicos RNA y cDNA respectivamente son de buena calidad.

Se recolectaron las semillas T1 de 21 de las 23 transformantes. Sin embargo, las líneas WT pGWB8 5 y *sdh1-3* pGWB8-VvSDH 11 no generaron semillas, lo cual puede explicarse debido a la forma en la que se integra el DNA en el genoma de la planta, el cual es al azar (Krysan y col., 1999). Por lo tanto, en aquellas plantas que no generaron semillas, el T-DNA pudo haber interrumpido una secuencia clave para el desarrollo de los gametos; al igual que aquellas plantas que no están expresando el gen *VvSDH* (líneas *sdh1-1* 8 y *sdh1-3* 10 (Figura 16 A y B) esto puede deberse al sitio de inserción en el que quedó posicionado.

Al transformar establemente *A. thaliana* se obtienen tasas de transformación de entre un 0.5–3% de eficiencia (Clough & Bent, 1998). Para las líneas transformantes obtenidas en el desarrollo del Seminario de Título, se calculó el porcentaje de eficiencia de la transformación, obteniendo valores entre 0,025–0,175% (Tabla 4). Como son eventos que ocurren al azar y por la cantidad de semillas T0 sembradas en medio de selección, es esperado el porcentaje obtenido y aunque el porcentaje de eficiencia fue bajo, se obtuvo al menos 1 planta transformante en todas las líneas transformadas.

6. CONCLUSIONES

En el presente Seminario de Título se realizaron los pasos iniciales para determinar si VvSDH cumple el rol de una SDH *in vivo* mediante la complementación de mutantes *sdh-* de *A. thaliana*. Las conclusiones son:

1. Se clonó VvSDH en el vector de expresión pGWB8 y se determinó su funcionalidad transformando transitoriamente hojas de tabaco, donde se observó mediante RT-PCR la expresión de VvSDH y posteriormente detectando la presencia de la proteína VvSDH-His mediante dot blot.
2. De las 3 líneas *sdh-* y las plantas silvestres de *A. thaliana* transformadas mediante inmersión floral de manera independiente con pGWB8 y pGWB8-VvSDH (10 plantas cada una), se obtuvo 1 línea *sdh1-1*, 4 líneas *sdh1-3*, 1 línea *sdh1-4* y 5 líneas silvestres transgénicas para pGWB8, mientras que se obtuvo 1 línea *sdh1-1*, 2 líneas *sdh1-3*, 1 línea *sdh1-4* y 7 líneas silvestres transgénicas para pGWB8-VvSDH. Analizadas molecularmente mediante PCR, se confirmó la integración del transgen y por RT-PCR se determinó la expresión de este.

7. PROYECCIONES

Para determinar el rol de VvSDH *in vivo* se complementaron plantas silvestres y *sdh-* de *A. thaliana*, sin embargo, en este Seminario de Título solo se analizó molecularmente estas plantas.

Para corroborar que VvSDH es efectivamente una sorbitol deshidrogenasa *in vivo*, las plantas transformantes deben ser sometidas a estrés hídrico, con la finalidad de revertir la tolerancia a este estrés y por ende comportarse como plantas silvestres. Para ello, es necesario obtener primero líneas que sean homocigotas para la inserción (T3), ya que de esta forma, se estaría realizando los ensayos con plantas genéticamente más uniformes. Aun así, se pueden realizar ensayos preliminares de sequía con plantas de las líneas T2, donde se tendría una mezcla de homocigotas y heterocigotas, los cuales podrían entregar las primeras aproximaciones de cómo se están comportando las plantas transformantes y de verificar si se revierte su fenotipo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo, M. F., Ampuero, D., Mandujano, P., Parada, R., Muñoz, R., Gallart, M., Altabella, T., Cabrera, R., Stange, C., Handford, M. (2013).** Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 205–206:63–75
- Aguayo, M. F., Cáceres, J. C, Fuentealba, M, Muñoz, R, Stange, C, Cabrera, R, Handford, M. (2015).** Polyol specificity of recombinant *Arabidopsis thaliana* sorbitol dehydrogenase studied by enzyme kinetics and in silico modeling. *Frontiers in Plant Science* 6: 91
- Araya, J. (2013).** Purificación y caracterización de VvSDL, una enzima de *Vitis tinifera* (vid) capaz de oxidar sorbitol, Tesis de Magister en Ciencias Biológicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Beruter, J., Feusi, M., Rueedi, P. (1997).** Sorbitol and sucrose partitioning in the growing apple fruit. *J Plant Physiol* 151:269–276
- Bialeski, R. L. (1982)** Sugar alcohols. In FA Loewus, W Tanner, *Plant Carbohydrates I. Intracellular Carbohydrates, Encyclopedia of Plant Physiology New Series.* Springer-Verlag, New York, 13A: 158-192
- Blakley, R. L. (1951).** The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. *Sorbitol dehydrogenase. Biochem J* 49: 257-271
- Bradford, M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Brown, P. y Hu, H. (1996).** Phloem Mobility of Boron is Species Dependent: Evidence for Phloem Mobility in Sorbitol-rich Species. *Annals of Botany* 77: 497-505
- Clough, S. J., y Bent, A. F. (1998).** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 735–743
- Conde, A., Regalado, A., Rodrigues, D., Costa, J. M., Blumwald, E., Chaves, M. M., Gerós, H. (2015).** Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 66: 3 889–906.
- Conde, C., Silva, P., Agasse, A., Lemoine, R., Delrot, S., Tavares, R., Gerós, H. (2007).** Utilization and Transport of Mannitol in *Olea europea* and Implications for Salt Stress Tolerance. *Plant Cell Physiol.* 48: 42–53

- Doehlert, D. C.** (1987). Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* 84: 830–834.
- Galinski, E. A. y Truper, H.G.** (1994). Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev* 15: 95-108.
- Gibeaut, D. M., Hulett, J., Cramer, G. R., Seeman, J. R.** (1997). Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiol* 115: 317-319
- Guo, Z. X., Pan, T. F., Li, K. T., Zhong, F. L., Lin, L., Pan, D. M., Lu, L. X.** (2012). Cloning of NAD-SDH cDNA from plum fruit and its expression and characterization. *Plant Physiol Biochem.* 57: 175-180.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Kaiser, C., Jörnvall, H., Eklund, H., Höög, J., Ramaswamy S.** (2001). Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chemico-biological interactions.* 130–132: 351–358.
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A.** (2002). GATEWAY™ Vectors for Agrobacterium-mediated Plant Transformation. *TRENDS in Plant Science*, 7: 193-195.
- Krysan, P., Young, J., y Sussman, M.** (1999). T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11: 2283–2290.
- Kuo, T. M., Doehlert, D. C., Crawford, C. G.** (1990). Sugar metabolism in germinating soybean seeds. Evidence for the sorbitol pathway in soybean axes. *Plant Physiol.* 93: 1514–1520.
- Lewis, D. H.** (1984). Physiology and metabolism of alditols. Storage carbohydrates in vascular plants, DH Lewis, ed Cambridge, UK: Cambridge University Press, 157–179
- Lo Bianco, R., Rieger, M., Sung, 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.** (1987). Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiologia Plantarum* 70: 553–557.
- Loris, R., Dao-Thi, M-H, Bahassi, M., Van Melderren, L., Poortmans, F., Liddington, R., Couturier, M. y Wyns, L.** (1999) Crystal Structure of CcdB, a Topoisomerase Poison from *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 285: 1667-1677
- Mandujano, P.** (2010). Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDL una probable sorbitol deshidrogenasa. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

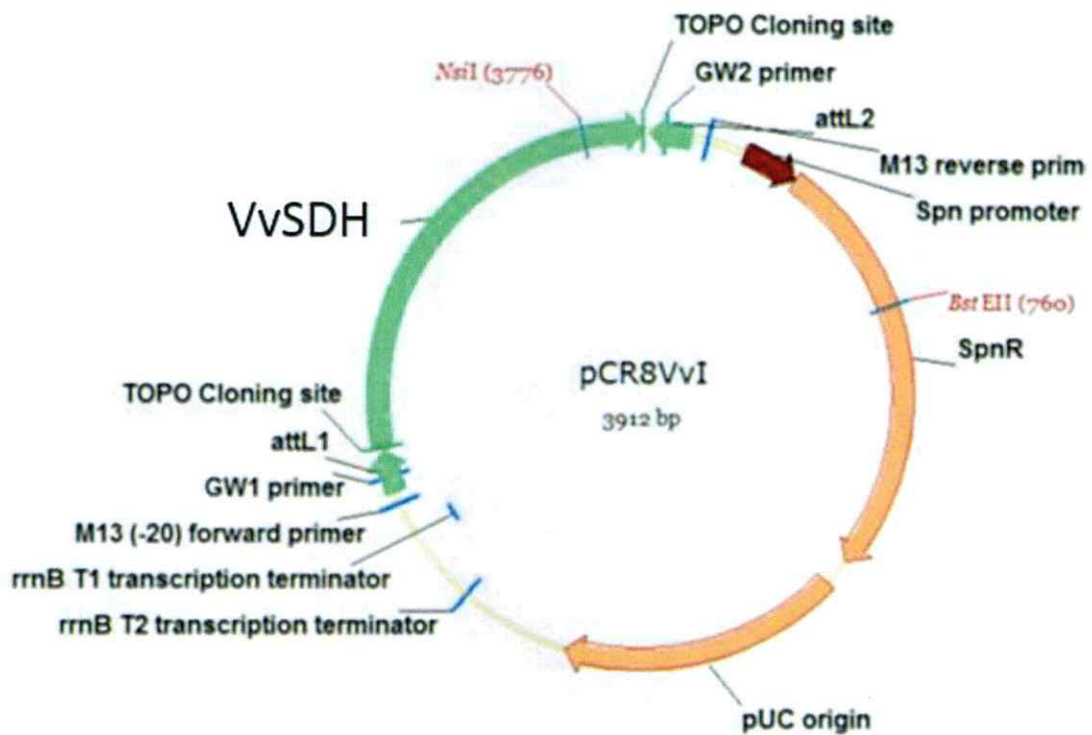
- Muir, R., Ibáñez, A., Uratsu, S., Ingham, E., Leslie, Ch., McGranahan, G., Batra, N., Goyal, S., Joseph, J., Jemmis, E., y Dandekar, A. (2011).** Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). *Plant Molecular Biology*, 75: 555–565.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Plant Physiol* 15: 473–497.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T. (2007).** Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 104: 34–41.
- Nakagawa, T., Ishiguro, S., Kimura, T. (2009).** Gateway vectors for plant transformation. *Plant biotechnology*, 26: 275–284.
- Negm, F. B. y Loesher, W. H. (1979).** Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant Physiol*. 64: 69–73.
- Noiraud, N., Maurousset, L., Lemoine, R. (2001).** Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol Biochem*. 39: 717–728.
- Nosarzewski, M., Downie, B., Wu, B., Archbold, D. D. (2012).** The role of SORBITOL DEHYDROGENASE in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*. 39: 462–470.
- Ohta, K., Moriguchi, R., Kanahama, K., Yamaki, S., Kanayama, Y. (2005).** Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochem*. 66: 2822–2828.
- Oura, Y., Yamada, K., Shiratake, K., 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., Chung, W. I. (2002).** Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. *Plant Science* 162: 513–519.
- Pharr, D. M., Stoop, J. M. H., Williamson, J. D., Studer-Feusi, M. E., Massel, M. O., Conkling, M. A. (1995).** The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery. *Hort Sci* 30: 1182–1188
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., Sauer N. (2007).** Differential Regulation of Sorbitol and Sucrose Loading into the Phloem of *Plantago major* in Response to Salt Stress. *Plant Physiol* 144: 1029–1038.

- Sarthy, A., Schopp, C., Idler, K.** (1994). Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 140: 121-126.
- Seepiban, Ch., Charoenvilaisiri, S, Kumpoonsiri, M., Bhunchoth, A., Chatchawankanphanich, O, Gajanandana, O.** (2015). Development of a protocol for the identification of tospoviruses and thrips species in individual thrips. *Journal of Virological Methods*. 222: 206-213
- Shen, B., Jensen, R. G., Bohnert, H. J.** (1997). Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant Physiol*. 115: 527-532.
- Smirnoff, N. y Cumbes, Q.** (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057–1060.
- Sola-Carvajal, A., García-García, M., García-Carmona, F. y Sánchez-Ferrer, A.** (2012) Insights into the evolution of sorbitol metabolism: phylogenetic analysis of SDR196C family. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 147.
- Sparkes, I., Runions, J., Kearns, A., Hawes, Ch.** (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *NATURE PROTOCOLS*. 1: 2019-2025
- Stoop, J.M., Williamson, J.D., Pharr, D.M.** (1996). Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci*. 1:139–144.
- Tang, Y.** (2011). Construcción y verificación de vectores para sobre expresar VvSDH1, una posible sorbitol deshidrogenasa de *Vitis vinifera* (vid), Seminario de Título, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Wurman, J.** (2013), Generación de un anticuerpo para el estudio de AtA6PR, una enzima involucrada en el metabolismo del sorbitol en *Arabidopsis thaliana*. Seminario de Título, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Yamada, K., Oura, Y., Mori, H., Yamaki, S.** (1998). Cloning of NAD dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit and gene expression. *Plant Cell Physiol*. 39: 1375–1379.
- Zimmermann, M. y Ziegler, H.** (1975). List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In *Encyclopedia of Plant Physiology*. 480–503.

ANEXO

Esquemas de los vectores generados y usados durante el desarrollo del Seminario de Título.

- A) Esquema de pCR8-VvSDH: Vector de entrada obtenido por Araya (2013) durante su Tesis de Magister. El CDS de VvSDH se inserta entre los sitios de clonamiento (TOPO Cloning site), y entre los sitios de recombinación attL1 y attL2.



- B) Esquema de pGWB8-VvSDH: Vector de destinación generado luego de la recombinación entre el vector pCR8-VvSDH y pGWB8. El CDS de VvSDH se inserta entre los sitios de recombinación attR1 y attR2. El vector posee un epítipo de Histidina (6XHis) después del sitio attR2, permitiendo generar una proteína de fusión que será expresada bajo el promotor constitutivo 35S.

