



**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN DE  
CÍTRICO INVOLUCRADO EN LA RESPUESTA DE ESTRÉS ABIÓTICO”**

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

**MÓNICA ESTER PAZ USTILOVSKY**

**Directores del Seminario de Título**

Dr. Pablo Valenzuela Valdés

Dr. Erwin Krauskopf Poblete

Dr. Mario Roseblatt Silber

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

Dra. Claudia Stange  
Presidenta Comisión

Dra. Lorena Norambuena



Santiago de Chile, abril de 2009

UCH-FC  
Biotecnología  
P348  
C.1



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN DE  
CÍTRICO INVOLUCRADO EN LA RESPUESTA DE ESTRÉS ABIÓTICO”**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



**Mónica Ester Paz Ustilovsky**

Directores de Memoria: Dr. Pablo Valenzuela Valdés

Dr. Erwin Krauskopf Poblete

Profesor patrocinante: Dr. Mario Roseblatt Silber

FUNDACIÓN CIENCIA PARA LA VIDA

Abril, 2009  
Santiago - Chile



En este momento, cuando una etapa tan significativa de mi vida llega a su fin, corresponde echar una rápida mirada al camino.

Desde el comienzo de mis estudios secundarios supe y sentí que lo que más me gustaba era la biología. Afortunadamente mi elección no fue errada, ni tampoco el área que elegí en la universidad, aún cuando su extensión y complejidad exigía un arduo y agotador estudio. Sin embargo, no tengo duda alguna que el esfuerzo se pagó con creces. Fue una experiencia tremendamente provechosa, que me abrió

las puertas a un mundo de una dimensión y proyección asombrosa.

Debo agregar que la docencia en mi carrera de la Universidad de Chile fue de primer nivel. Y por último, valoro grandemente el estudio compartido con tantos compañeros, entre los cuales construí amistades sólidas y duraderas.

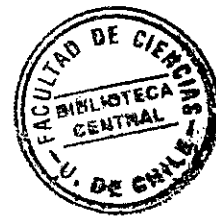
Luego, llegó el momento de empezar el trabajo de preparación a la tesis final.

Tuve la fortuna de formar parte de una investigación en la Fundación Ciencia Para La Vida, donde encontré un ambiente cálido de participación mutua y real compañerismo. Este clima fue de gran ayuda para mí y me permitió, además, formar amistades que espero persistan durante mucho tiempo. Es así como la colaboración de los compañeros me permitió superar dificultades que toda investigación científica presenta. Finalizando, quiero agregar algo que me parece importante. Pienso que el paso desde el conocimiento a la realidad se logra a través de la práctica. Al unir ambos factores se consigue sólo entonces comprender la naturaleza trascendental de las ciencias biológicas.



*"Lo que sabemos es una gota de agua;  
Lo que ignoramos es el océano"*

ISAAC NEWTON



A mi familia y amigos...



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a los doctores Pablo Valenzuela y Mario Rosemblatt por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi tesis en la Fundación Ciencia Para La Vida.

También mis agradecimientos para el Dr. Erwin Krauskopf, por sus enseñanzas, apoyo y estrictez. A mis compañeros del laboratorio de Forestal con los que compartí ideas e interesantes discusiones de gran ayuda para el desarrollo de la investigación. Les agradezco su ayuda y consejo fundamentales para mi tesis.

Agradecimientos a toda la gente de la Fundación Ciencia Para La Vida por crear un ambiente tan amigable y acogedor, por medio de su cooperación, apoyo y también de su alegría. Entre ellos encontré amigos verdaderos, que siento permanecerán en mi vida a través del tiempo.

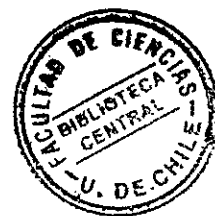
No puedo dejar de mencionar a mis amigos del Colegio y la Universidad, todos ellos presentes en las interminables horas de estudio. Gracias por su confianza, su amistad y por los buenos momentos pasados en su compañía.

Y en especial muchas gracias a mi familia, por estar siempre ahí apoyándome, incentivándome y dándome fuerzas para seguir adelante. A mis hermanas, a mis padres que de no haber sido por ellos nada de esto hubiese sido posible. A mis abuelos, especialmente a mi abuela y amiga Teti que con su sabiduría siempre fue un aporte y un estímulo en toda mi vida académica.

## ÍNDICE



AGRADECIMIENTOS.....	I
ÍNDICE .....	II
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	V
RESUMEN .....	IX
ABSTRACT .....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Cultivo de Cítricos.....	1
1.2 Estrés Abiótico en Plantas .....	3
1.3 Estrés Salino.....	5
1.4 Genes involucrados en tolerancia a estrés salino .....	7
1.4.1 Genes <i>CBF</i> .....	7
1.4.2 Proteína de Estrés Universal (USP) .....	8
1.5 Hipótesis.....	12
1.6 Objetivo General.....	12
1.7 Objetivos Específicos.....	12
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1 Cepas bacterianas .....	13
2.2 Medios de cultivo .....	14
2.3 Buffers y soluciones.....	14
2.4 Antibióticos .....	15
2.5 Material vegetal y condiciones de crecimiento .....	15
2.6 Desinfección y germinación de semillas de porta injerto <i>Citrus macrophylla</i> ..	15
2.7 Mantenimiento y crecimiento de cepas bacterianas.....	16



2.8	Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> Novablue.....	16
2.9	Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> Novablue.....	17
2.10	Vectores .....	18
2.11	Purificación de ADN plasmidial .....	19
2.12	Digestión de ADN mediante endonucleasas de restricción .....	19
2.13	Ligación de fragmentos de ADN .....	19
2.14	Purificación de fragmentos de ADN provenientes de un gel.....	20
2.15	Partidores .....	20
2.16	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	21
2.17	Preparación de ARN total de <i>Citrus limon</i> .....	22
2.18	Trascrición reversa .....	23
2.19	Obtención de los extremos del gen <i>CBF</i> mediante 3' <i>RACE</i> ( <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> ).....	24
2.20	Análisis de ADN y ARN mediante electroforesis en geles de agarosa .....	24
2.21	Secuenciación de ADN y su análisis.....	25
2.22	Construcción y análisis de una biblioteca de ADN complementario (ADNc).....	25
2.22.1	Purificación de ARN mensajero (ARNm).....	25
2.22.2	Síntesis de ADN complementario (ADNc) .....	25
2.22.3	Purificación del ADNc .....	26
2.22.4	Ligación del ADNc al vector y empaquetamiento en fago lambda.....	27
2.22.5	Titulación y amplificación de la biblioteca.....	27
2.22.6	Amplificación de las genotecas .....	28
2.22.7	Hibridación y rastreo .....	28
2.22.8	Preparación de una sonda radiactiva .....	29
2.22.9	Identificación de los clones de interés .....	30
2.22.10	Excisión <i>in vivo</i> del plasmidio pBluescript a partir del vector Uni-Zap XR.	30
2.22.11	Obtención de clones recombinantes .....	31
3	RESULTADOS .....	32
3.1	Estrategias de aislamiento de un gen <i>CBF</i> de <i>Citrus limon</i> .....	32
3.1.1	Amplificación del fragmento a utilizar como sonda.....	35
3.2	Nuevas estrategias para aislar genes <i>CBF</i> , Amplificación y detección de un gen <i>usp</i> de <i>Citrus limon</i> .....	39

3.3	Análisis bioinformático .....	44
3.4	Estudio de la expresión de los dos genes <i>usp</i> aislados de <i>Citrus limon</i> variedad Citrumelo. ....	51
4	DISCUSION.....	60
5	CONCLUSIONES.....	67
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68







## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Plasmidios utilizados durante el desarrollo de esta tesis.....	18
Figura 2. Análisis electroforético de ARN total de <i>Citrus limon</i> . ....	33
Figura 3. Selección de recombinantes mediante complementación $\alpha$ .....	34
Figura 4. Amplificación del dominio AP2 de <i>Citrus limon</i> mediante PCR a partir de ADN complementario. ....	36
Figura 5. Detección mediante sonda radioactiva de placas de lisis sobre membranas de nitrocelulosa. ....	37
Figura 6. Selección de clones recombinantes.....	39
Figura 7. Esquema del procedimiento utilizado para obtener el fragmento 3' del gen CBF de <i>Citrus limon</i> . ....	40
Figura 8. Amplificación del gen <i>usp</i> de <i>Citrus limon</i> , injerto FINO 49 mediante PCR a partir de ADN complementario. ....	41
Figura 9. Genes <i>Clusp</i> aislados a partir de injertos y portainjertos.....	43
Figura 10. Alineamiento de los genes <i>Clusp</i> de cítricos.....	45
Figura 11. Alineación de los genes <i>Clusp</i> de Citrumelo. ....	47
Figura 12. Comparación de secuencia aminoacídica predecida de USP aisladas desde el portainjerto Citrumelo. ....	47
Figura 13. Alineación de diferentes proteínas USP y comparación de la estructura secundaria predicha para <i>Clusp88</i> y <i>Mj0577</i> .....	50
Figura 14. Experimento controlando los parámetros de luz y temperatura.....	52
Figura 15. Análisis electroforético del gen constitutivo NADH deshidrogenasa.....	53
Figura 16. Diseño de partidores específicos para diferenciar las secuencia <i>Clusp</i> de Citrumelo.....	54
Figura 17. Estandarización del número de ciclos del RT-PCR.....	55

Figura 18. Análisis electroforético de la expresión del fragmento amplificado CIUsp de Citrumelo 88 y 89 en plantas de Citrumelo sometidas a 250 mM de NaCl.	56
Figura 19. Análisis electroforético de la expresión del fragmento amplificado CIUsp de Citrumelo 88 y 89 en plantas control. ....	57
Figura 20. Análisis electroforético del gen constitutivo NADH deshidrogenasa.....	58
Figura 21. Análisis electroforético de la expresión del fragmento amplificado <i>Clusp</i> de Citrumelo 88 y 89 en plantas de Citrumelo sometidas a 400 mM de manito.	59
Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados en este trabajo.....	21
Tabla 2. Relación de identidad entre secuencias de <i>Clusp</i> . ....	46
Tabla 3. Relación de identidad entre secuencias USP de diferentes especies y Citrumelo .....	48



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
Amp	Ampicilina
ARN	Acido ribonucleico
BrEt	Bromuro de etidio
CTAB	Bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio
CBF	Factor de unión de repetidos de cisteína
DIECA	Dietilditiocarbamato
DO	Densidad óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acido etilen-diaminotetraacético
g	Fuerza de gravedad
h	Hora
IPTG	Isopropil tio- $\beta$ -D-galactósido
Kan	Kanamicina
kb	Kilobases
kD	Kilo Dalton
mL	Mililitro
L	Litro

LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
mM	Milimolar
MS	Medio Murashige-Skoog
ng	nanógramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVP	Polivinilpirrolidona
RPM	Revoluciones Por Minuto
seg	Segundos
TAE	Amortiguador Tris-acetato-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tet	Tetraciclina
Tm	Temperatura de hibridización
ton	toneladas
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad
ufp	Unidades formadoras de placas
µg	Microgramo
µL	Microlitro
USP	Proteína de estrés universal
UV	Ultravioleta
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

## RESUMEN

Debido a la importancia económica y al crecimiento en las exportaciones que han alcanzado los cítricos en los últimos años en Chile, los agricultores han visto la necesidad de incrementar la producción de estos frutos. Por esto se están comenzando a cultivar terrenos en el norte de nuestro país donde existen propiedades climáticas muy ventajosas. Sin embargo, estos suelos presentan un nivel de aridez y salinidad desfavorable para el cultivo de cítricos. Es por ello, que mediante herramientas biotecnológicas sería posible adaptar plantas de cítricos a estas condiciones y aumentar la comercialización de frutos de cítricos en Chile. Por esto, esta tesis propone aislar y caracterizar un gen de cítricos involucrado en la respuesta a estrés abiótico.

Inicialmente, se intentó aislar genes CBF (C-repeat binding factor) de *Citrus limon*, que codifican para una familia de factores de transcripción que inducen la expresión de múltiples genes que otorgan a la planta tolerancia al congelamiento, sequía y altas concentraciones de sal.

A pesar de los intentos para aislar un gen CBF, los resultados fueron negativos. Sin embargo, durante estos esfuerzos se identificó un gen (*usp*) que codifica para una Proteína de Estrés Universal (USP), el cual fue posteriormente aislado desde dos diferentes tipos de portainjertos (*Citrus microphylla* y Citrumelo) y desde un tipo de injerto, "FINO 49". Experimentos de expresión de este gen en portainjerto Citrumelo, bajo condiciones de estrés salino, indicaron una expresión rápida y continua a través del tiempo. También se comprobó que el estrés causado por la sal a la planta es un estrés iónico y osmótico. Nuestros resultados en plantas control permitieron sugerir también que el gen *usp* de Citrumelo muestra un comportamiento atípico sujeto a una periodicidad diaria sugerente a un ritmo interno o externo.

## ABSTRACT

The increasingly global demand for citrus, made it necessary to intensify the Chilean productive capacity for this product. Growers have therefore started to use the land resources in the northern part of the country whose climate is excellent for this crop. Nevertheless, the aridity and salinity of the soil are higher than the optimum for cultivation of citrus plants. The use of biotechnological tools would enable the adaptation of Citrus plants to those conditions and in this way, to increase the marketing of citrus fruits in Chile. This circumstance motivated this thesis, whose aim was to characterize and isolate a *Citrus* gene involved in abiotic stress response.

Initially the isolation of CBF (C-repeat binding factor) genes of *Citrus limon* was pursued. These genes encode a family of transcription factors which induce the expression of multiple genes which provide drought, salt and freezing tolerance to the plant.

Despite several efforts to isolate the CBF genes, the results were negative. However, during these efforts, another gene (*usp*) which encodes a Universal Stress Protein (USP) was identified. This gene was eventually isolated from two rootstocks (*Citrus macrophylla* and Citrumelo) and from a graft, "FINO 49". The *usp* gene, found in the Citrumelo rootstock, express rapidly and continuously under salt stress. In addition we observed that the salt stress is caused by both osmotic and ionic damages. Our results in control plants let us to suggest that the *usp* gene of citrumelo shows an atypical behavior subject to a daily periodicity, suggesting an internal or external rhythm.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Cultivo de Cítricos

Los cítricos, con más de 145 especies, son uno de los frutos de mayor importancia económica a nivel mundial.

Las áreas de cultivo con mayor relevancia, se encuentran en zonas con clima mediterráneo subtropical como es el caso de Chile, California, España y Australia al igual que en climas subtropicales húmedos como Brasil, Argentina y Uruguay.

La superficie mundial de cítricos bordea los 7,4 millones de hectáreas, de las cuales casi dos tercios provienen de países del hemisferio norte, donde destacan EE.UU, China, México y España. Mientras que en el hemisferio sur las principales plantaciones de cítricos se encuentran en Brasil, Argentina y Sudáfrica (ODEPA, 2006).

En la actualidad Chile tiene una superficie que supera las 17.000 hectáreas plantadas con cítricos, lo que representa cerca del 8% de la superficie de los frutales del país. Más del 80% de las plantaciones de cítricos se encuentran ubicadas entre las regiones de Valparaíso y O'Higgins. Los naranjos, limoneros, mandarinas, pomelos, limas y tangerinas lideran esas áreas cultivadas. Es necesario subrayar el hecho que, desde 1999, las exportaciones de cítricos en nuestro país han aumentado aproximadamente tres veces su volumen, dando buenos dividendos a la economía chilena (ODEPA, 2005). Este ha impulsado que la actividad en esta área sea intensificada. Para lograr ese objetivo se requiere una ampliación de la superficie cultivable. Al norte de la III región, en los valles de Huasco, Elqui, Limarí y Copiapó las temperaturas de los microclimas que forman estos valles son considerablemente más apropiadas para una óptima calidad del fruto, confiriéndole a la fruta un mejor sabor,

color y aroma. Sin embargo, la principal limitación al cultivo de cítricos en esas zonas es la alta concentración de sales presente en los suelos y aguas de riego. Como estos frutales son muy sensibles a la salinidad, especialmente al ión cloro, existe el riesgo de acumulación de sales en los tejidos provocando toxicidad y amenazando la producción de estos frutales a mediano y largo plazo (Maas, 1993).

Algunos de los síntomas causados por NaCl en los cítricos son la reducción del crecimiento de las raíces, disminución de la floración, disminución del tamaño de las hojas y crecimiento dispar de los brotes. Por su parte, la toxicidad por ion  $\text{Cl}^-$  causa quemaduras necróticas y una apariencia de bordes secos en las hojas (el síntoma visible más común de lesiones salinas). Los síntomas de la toxicidad por ion  $\text{Na}^+$  se manifiestan ocasionalmente produciendo un bronceado en la hoja junto con una reducción del crecimiento de ésta. Al aumentar la salinidad los árboles comienzan a perder hojas y a disminuir su frondosidad. Los síntomas causados por la salinidad siempre se manifiestan en el ápice del árbol, en donde la caída de hojas es evidente, observándose ramas completamente desfoliadas (Boman & Stover, 2002).

En resumen, los efectos producidos por altas concentraciones de sales en cultivos de cítricos dan como resultado un menor rendimiento, calidad y tamaño de la fruta. Todos estos antecedentes en conjunto hacen sumamente interesante desarrollar una investigación sobre una posible vía de tolerancia a suelos con alto contenido de sales. Esto permitiría aprovechar terrenos descartados por sus condiciones de aridez y salinidad, incrementando así las extensiones cultivables de esta especie.



## 1.2 Estrés Abiótico en Plantas

En general, la planta al no poseer capacidad de movilización, está sometida a un gran número de factores estresantes a lo largo de su ciclo vital. Los factores de estrés se clasifican en dos grandes grupos: bióticos y abióticos. Entre los factores bióticos pueden mencionarse la competencia, la herbivoría, la alelopatía, y patógenos en general (como bacterias, hongos y virus).

El estrés abiótico, dependiendo de la naturaleza del agente causante, puede dividirse en físicos y químicos. Entre los factores físicos se pueden mencionar el estrés por déficit o exceso de agua, alta o baja temperatura, anaerobiosis, salinidad, radiación UV y otros. Entre los factores químicos están los contaminantes ambientales  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_2$ , CFC,  $\text{O}_3$ , metales pesados y toxinas (Tadeo, 2000).

Cuando la planta se ve enfrentada a un estado de estrés, reacciona reduciendo sus funciones fisiológicas y su vigor. Luego reacciona activando mecanismos que le permitirán enfrentar el estrés, pasando así a una fase de resistencia. En ella se activan los mecanismos defensivos por medio de un ajuste del metabolismo celular a las nuevas condiciones activando los procesos de reparación de la maquinaria celular dañada. Si el estrés es atenuado, la planta puede regenerarse recuperando sus funciones fisiológicas. Sin embargo, si el período de estrés se prolonga demasiado la resistencia de la planta se daña, pasando a una condición de agotamiento, hasta la muerte (Hasegawa y col., 2000; Taiz & Zeiger, 2002).

El daño que provocan la sequía, la salinidad elevada y el frío es similar, causando una disminución en el potencial hídrico de la célula, afectando cada aspecto de la fisiología de la planta y su metabolismo.

La adaptación de las plantas al estrés ambiental es dependiente de la activación de una gran cascada de genes envuelta en la percepción del estrés, la transducción de la señal y la expresión de genes y metabolitos específicos (Wang y col, 2003). Los genes que participan en esta red se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su función (Fowler & Thomashow, 2002; Kreps y col., 2002; Seki y col., 2004). El primer grupo comprende genes que participan en la tolerancia a estrés como chaperonas, proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), proteínas anticongelantes, proteínas de unión a ARNm, enzimas claves para la biosíntesis de osmolitos (como prolina, canales de agua, glucosa y transportadores de prolina), enzimas detoxificadoras, enzimas del metabolismo de los ácidos grasos, inhibidores de proteinasas, ferritinas, y proteínas transportadoras de lípidos. El segundo grupo comprende a todos los factores proteicos que están involucrados en promover la regulación de la transducción de señales y en el control de la expresión genética que funciona en la respuesta a estrés. Este grupo incluye varios factores de transcripción como genes MYC, MYB y CBF (C-repeat binding factor) o DREB (dehydration responsive element-binding factor). Varios de los mecanismos regulatorios transcripcionales funcionan en la vía de transducción de señales de estrés de sequía, frío y exceso de sal (Seki y col., 2003). Estos factores de transcripción pueden regular varios genes inducibles por estrés cooperativamente o por separado, y pueden conformar una red genética. Dentro de este grupo también se encuentran las MAP y GTP quinasas, proteínas fosfatasa, enzimas que están involucradas en el metabolismo de los fosfolípidos y otras moléculas de señalización (Shinozaki y col., 1996a; 1997b; Ingram y col., 1996; Bray, 1997; Liu y col., 2000; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006).

### 1.3 Estrés Salino

Se podría decir que el estrés salino es una de las mayores limitantes para la productividad de los cultivos. Se ha estimado que aproximadamente el 7% de la superficie de la tierra posee suelos naturalmente salinos (Ghassemi y col., 1995) y la mitad de los suelos de regadío son afectados por la salinidad. Se estima que en el año 2050 la salinidad afectará al 50% de las tierras cultivables (Wang y col., 2003). Es así como las diferentes especies vegetales se han clasificado de acuerdo a su respuesta frente a un medio salino. Las halófitas, que toleran concentraciones de sales elevadas sin daños aparentes y las glicófitas que sólo toleran bajas concentraciones de sales y que incluye a la mayoría de las plantas.

Para lograr tolerancia a la salinidad, se requiere una respuesta adaptativa de la planta que debe interconectar algunos aspectos importantes en su actividad como:

1) Prevenir o reparar el daño o detoxificación, 2) Reestablecer la homeostasis iónica y osmótica y 3) Reanudar su crecimiento (Zhu, 2001; Xiong L y Zhu JK, 2002).

Altas concentraciones de sal generan en la planta especies reactivas de oxígeno (EROS), que son una de las causas del daño generado por estrés salino. Estas especies disparan la señal de detoxificación, que son complejas respuestas moleculares, a través de la expresión de proteínas y producción de osmolitos como manitol, glicinbetaina, fructanos y prolina entre otros, que remueven las ROS o previenen el daño de las estructuras celulares. Se ha encontrado una amplia correlación entre la habilidad de las plantas por adaptarse a altos niveles de salinidad y al aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa, ascorbato peroxidasa y la glutatión reductasa (Mittler & Zilinskas, 1994). Una célula vegetal expuesta a un medio altamente salino equilibra su potencial hídrico perdiendo agua, lo

que produce la disminución del potencial osmótico y de turgencia, lo que se traduce en un incremento en la concentración de solutos intracelulares (Lichtentaler, 1995). El estrés por NaCl rompe con la homeostasis iónica de las plantas al provocar un exceso tóxico de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma y una deficiencia de iones como el  $\text{K}^+$  (Puebla & Del Viso, 2004). Una elevada concentración de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , debe ser impedida o reducida debido a que estos iones producen una interferencia en la absorción de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$ , y al mismo tiempo pueden alcanzar niveles citosólicos tóxicos para el metabolismo celular. La homeostasis iónica, depende de las proteínas de membrana que regulan el flujo de iones, como las bombas de protones (ATPasas y pirofosfatasas), transportadores secundarios y canales iónicos (Niu y col., 1995). Además, el estrés causado por elevados niveles de NaCl provoca una alta concentración de  $\text{Na}^+$  en el espacio intra o extracelular activando los canales de calcio, lo que produce un aumento de éste en el citosol. El  $\text{Ca}^{+2}$  actúa como intermediario produciendo la señal para la transcripción de numerosos genes que están involucrados en la cascada de señalización SOS (Salt Overly Sensitive) produciendo una respuesta adaptativa que regula la homeostasis iónica.

## 1.4 Genes involucrados en tolerancia a estrés salino

### 1.4.1 Genes CBF

En numerosas especies vegetales como canola, trigo, tomate entre otras (Jaglo y col., 2001; Choi y col., 2002; Zhang y col., 2004) se han encontrado genes denominados CBF (C-repeat binding factor) o DREB (dehydration responsive element-binding factor), que presentan una alta homología en su secuencia. Estos genes codifican para factores de transcripción los cuales participan en la tolerancia a estrés por frío, sequía y salinidad.

Las proteínas CBF poseen un dominio conservado de unión a ADN de aproximadamente 60 aminoácidos (AP2/ERF), presente también en algunas proteínas de *Arabidopsis* que actúan en respuesta a etileno y en otros genes con función desconocida. Esta familia de genes AP2/ERF reúne al menos 144 miembros en *Arabidopsis thaliana*, uniéndose específicamente a secuencias CRT (C-repeat)/ DRE (dehydration responsive element, secuencias conservadas de 5 pares de bases rica en citosina (CCGAC) y activando la transcripción de los genes cuando la planta es sometida a algún estrés por frío, exceso de salinidad o sequía (Baker y col., 1994; Stockinger y col., 1997; Riechmann y col., 2000).

Algunos genes de *A. thaliana* como *rd29A*, *kin1*, *cor6.6/kin2*, *cor47/rd17*, *cor15a*, y *erd10* son activados por CBF/DREB durante estrés producido por salinidad, sequía y bajas temperaturas. Estos genes contienen el motivo CRT/DRE en su promotor repetida múltiples veces dentro de ellos (Kasuga y col., 2004; Yamaguchi- Shinozaki, 2006).

En las proteínas codificadas por los factores de transcripción CBF se describieron unas secuencias aminoacídicas conservadas, denominadas "secuencias

señal CBF" PK(K/R)PAGRxKFxETRHP y DSAWR, que las distingue del resto de las proteínas que poseen el dominio AP2, ubicándose antes y después de este dominio (Jaglo y col., 2001).

Se han descrito cuatro genes CBF/DREB en *Arabidopsis thaliana*, que poseen un alto nivel de similitud entre sus secuencias. *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* poseen los mismos patrones de expresión induciéndose rápidamente en tratamientos a bajas temperaturas. El gen *CBF4*, en cambio, se expresa bajo condiciones de deshidratación pero no por bajas temperaturas (Gilmour y col., 1998; Medina y col., 1999; Haake y col., 2002). En otras especies como algodón se observó que el gen *tipo CBF/DREB (GhDREB1)* es inducido por bajas temperaturas, sequía y también por exceso de NaCl (Huang y col., 2006). Estudios realizados en *A. thaliana* demostraron que la sobreexpresión de *CBF1* y *CBF3* en la planta aumentaba la tolerancia a sequía, salinidad y bajas temperaturas (Jaglo-Ottosen y col., 1998; Kasuga y col., 1999; Hsieh, 2002).

Se puede concluir que esta clase de genes representa uno de los componentes centrales en la aclimatación a los diferentes tipos de estrés abióticos en las plantas.

#### **1.4.2 Proteína de Estrés Universal (USP)**

La superfamilia de proteínas de estrés universal (USP) abarca un conservado grupo de proteínas que han sido encontradas en bacterias, arqueas, hongos, protozoos y en escasas plantas. La revisión bibliográfica indica que la mayoría de los estudios publicados se refieren a proteínas USP en bacterias y no en plantas. Sin embargo, llama la atención su tolerancia frente a diferentes tipos de estrés.

Ahora bien, *Escherichia coli* posee cinco pequeñas proteínas USP (UspA, UspC, UspD, UspF y UspG) y una proteína USP del tipo en tandem (UspE) que se desarrolló por un fenómeno de duplicación. Se ha reportado que estas seis proteínas USP de *E. coli* están relacionados con motilidad, adhesión y resistencia a estrés oxidativo. Estas funciones pueden ser independientes para cada proteína o estar sobrelapadas (Nachin y col., 2005).

Se ha determinado también que la expresión del gen *uspA* de *Escherichia coli* aumenta considerablemente su expresión cuando es inducida por estrés tales como falta de oxígeno, estrés osmótico, daño por luz UV, presencia de agentes tóxicos y escasez de nutrientes en el medio de cultivo (Nystrom & Neidhart 1992, 1993 y 1994). Al contrario, cepas mutantes de *E.coli* en el gen *uspA* frente a estrés reducen sustancialmente las tasas de supervivencia celular. Esto evidenció que la proteína UspA, producía una importante resistencia al estrés (Sousa & McKay, 2001).

La función bioquímica precisa que cumple UspA es desconocida, pero se sabe que es de vital importancia para el crecimiento celular durante la fase estacionaria, ya que mutantes de *E.coli* desprovistas de UspA mueren prematuramente durante esta fase (Nystrom & Neidhart, 1994 y 1996).

Una delección de los genes *uspA*, *uspC*, *uspD* o *uspE* provocan un aumento de la sensibilidad ante la exposición a la luz UV lo cual causa daños al ADN. De otro modo, células desprovistas de UspG, son sensibles a desacopladores respiratorios (CCCP: carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona). Sin embargo, no son afectadas por agentes que dañan al ADN. Esto indicaría que las funciones de las proteínas USP pueden ser diferentes (Sousa & McKay, 2001; Kvint y col., 2003; Nachin y col., 2005).

. En bacterias, las proteínas USP se han clasificado en dos tipos basado en la proteína MJ0577 de *Methanococcus jannaschii* (1JMH) que une ATP y la proteína de

estrés universal de *Haemophilus influenzae* (1JMV), que tiene un 68% de identidad con UspA de *Escherichia coli*, que no une ATP (Zarembinski y col., 1998; Sousa & McKay, 2001).

Un análisis estructural y filogenético realizado a un conjunto de 44 proteínas de *Arabidopsis thaliana* con similitud al dominio UspA de bacterias, permitieron establecer que todas las secuencias provenientes de plantas surgen del ancestro 1JMH el cual estaría involucrado en posibles respuestas relacionadas a estrés (Kerk y col., 2003).

En plantas sólo se han identificado escasas secuencias que codifican para miembros de la familia USP, que las hacen altamente similares a la clase 1JMH de *Methanococcus jannaschi*. Un ejemplo de esto es el gen *ER6*, encontrado en *Lycopersicon esculentum*. Este gen es inducido y regulado en respuesta a etileno en frutos de maduración tardía con un patrón de expresión constitutivo en hoja y raíz (Zegzouti y col., 1999). Asimismo, en *Vicia faba*, se describió *VfENOD*, un gen que participa en los procesos de transducción de señales en la interacción planta-patógeno en la zona de fijación de nitrógeno +3 de la raíz durante la nodulación (Hohnjec y col., 2000; Becker y col., 2001) También se identificó *AsD243* en la leguminosa *Astragalus sinicus*, posiblemente implicado en la señalización dependiente de ATP durante el desarrollo de nódulos en la raíz. *AsD243* se expresa constitutivamente en toda la planta y en todas las etapas de nodulación, esto hace pensar a los autores que este gen podría estar también relacionado en la respuesta al estrés en la planta (Chou y col., 2006). Otro parálogo de la familia USP corresponde a *OsUsp1* en *Oryza sativa*. Se comprobó que su rápida inducción es requerida temprana y transitoriamente en la adaptación a estrés por hipoxia (Sauter y col., 2002).



Finalmente el exceso de salinidad de los suelos en el norte de nuestro país para el cultivo de cítricos, nos lleva a la búsqueda de genes que otorguen a estas plantas la tolerancia necesaria ante el estrés por salinidad.

El gen CBF reúne todas las características adecuadas y por lo tanto se elige como primera opción de estudio. Luego de un periodo prolongado dedicado a obtener este gen, por medio de diferentes técnicas y estrategias, sin resultados positivos, se encuentra un nuevo gen (USP) que, según la información recopilada, está altamente involucrado en las respuestas de tolerancia a estrés abiótico, razón por la cual nuestra investigación se vuelca al estudio de este gen.

### **1.5 Hipótesis**

El genoma de *Citrus limon* posee genes participantes en la tolerancia a estrés por salinidad.

### **1.6 Objetivo General**

- Aislar y caracterizar un gen de cítrico involucrado en la respuesta a estrés abiótico.

### **1.7 Objetivos Específicos**

- Construcción de una genoteca de ADNc a partir de ARN mensajero total de *Citrus limon*.
- Identificación y aislamiento de un gen de estrés abiótico de *Citrus limon*.
- Estudio de expresión de los genes de tolerancia a estrés salino identificados en *Citrus* bajo condiciones de estrés salino, manitol y en plantas control.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se adquirieron en Sigma Chemical, Merck y Phytotechnology.

Las enzimas de restricción, T4 ADN ligasa, los desoxiribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, y los estándares de peso molecular de ácidos nucleicos (50 pb, y una mezcla de  $\lambda$  DNA/*Hind* III y  $\phi$ /X 174RF DNA/*Hae* III), se obtuvieron de Invitrogen. La Taq ADN polimerasa y la Go-Taq ADN polimerasa se obtuvieron de Promega. La DNAsa TURBO, respectivo *buffer* de DNAsa TURBO 10X y reactivo de inactivación de DNAsa se obtuvieron de Ambion.

La Bactotripton, extracto de levadura y agar fueron adquiridos en Laboratorios Difco. Los kit comerciales que se utilizaron para la purificación de productos de PCR, ADN plasmidial y ADN a partir de geles son de E.Z.N.A. Omega Bio-tek.

Los kit comerciales para la construcción de la librería de cDNA; *kits* "cDNA Synthesis Kit", "ZAP-cDNA® Synthesis Kit" y "ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit", se obtuvieron de Stratagene®.

### 2.1 Cepas bacterianas

Para la mantención y multiplicación de los vectores durante la tesis, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* Nova Blue [*endA1 hsdR17* ( $r_{K12}^- m_{K12}^+$ ) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F* (Tet<sup>R</sup>)] (Novagen). En la construcción de la biblioteca de ADNc se utilizaron las cepas XL1-Blue MRF' [ $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZAM15 Tn10* (Tetr)]] y SOLR™ [e14-(McrA-)  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5* (Kanr) *lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1*  $\lambda$ R [F' *proAB lacIqZAM15* Su- (nosupresiva)] (Stratagene).

## 2.2 Medios de cultivo

**LB:** Bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L. Para medio sólido se adicionó agar 15 g/L.

**SOC:** Bactotripton 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L, glucosa 1 M y MgCl<sub>2</sub> 0,1 M

**MS:** Sales MS (macroelementos, microelementos y quelatos de hierro) 4,3 g/L, mioinositol 0,1 g/L, sacarosa 50 g/L. Para medio sólido se usó sacarosa 30 g/L y agar-agar 7 g/L.

**NZY:** MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 2 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, NZ amina (caseína hidrolizada) 10 g/L. Se ajustó el pH hasta 7,5. Para medio sólido se adiciona agar 15 g/L. Para medio agar de superficie NZY se adiciona 0,7% agarosa.

## 2.3 Buffers y soluciones

Buffer SM	NaCl 100 mM, MgSO <sub>4</sub> 8 mM, gelatina 0.01%, Tris- HCl (pH 7,5) 50 mM.
Buffer extracción ADN	(NaCl 1,42 M, EDTA 20 mM, ácido ascórbico 5 mM, DIECA 4 mM, CTAB 2%, PVP40 2%, Tris-HCl (pH8,0) 100 mM, suplementado con 3 µL de β-mercaptoetanol.
Buffer extracción ARN	(CTAB 2%, PVP30 2%, Tris-HCl 100mM (pH8,0), EDTA 25mM, NaCl 2 M, espermidina 0,5g/L, β-mercaptoetanol al 2% y ácido ascórbico 8 mM.
Solución de Denaturación	NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M
Solución de Neutralización	NaCl 1,5 M y Tris-HCl (pH 8,0) 0,5 M.
SSC	NaCl 150 mM, 15 mM citrato trisódico.
TAE	Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM (pH 8,3)

## 2.4 Antibióticos

Las soluciones de antibióticos se prepararon en H<sub>2</sub>O miliQ (agua desionizada bidestilada) y fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm de diámetro de porosidad (Millipore). Los antibióticos se prepararon en las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp, 100 mg/mL), kanamicina (Kan, 50 mg/mL) y tetraciclina (Tet, 75 mg/mL).

## 2.5 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las plantas utilizadas para el desarrollo de esta tesis fueron: árboles de la especie *Citrus limon*, variedad FINO 49, portainjerto Citrumelo (año plantación octubre 2003), adquiridos en el vivero Deliplant; semillas de portainjerto *Citrus macrophylla*, adquiridos en la Pontificia Universidad Católica de Chile y plántulas de portainjerto de Citrumelo adquiridos en vivero Deliplant.

## 2.6 Desinfección y germinación de semillas de porta injerto *Citrus macrophylla*.

Semillas de *Citrus macrophylla* se desinfectaron mediante lavado en 1 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 20% y tween 10% durante 5 min, seguido de un lavado con etanol 95% durante 3 min. Finalmente se realizaron 5 lavados con agua miliQ estéril para luego colocar las semillas en frascos estériles con 25 mL agar en medio MS. Luego los frascos se transfirieron a una cámara de crecimiento con un foto periodo de 16 h luz/8 h oscuridad y un rango de temperatura entre 20-25°C.

## **2.7 Mantención y crecimiento de cepas bacterianas**

Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C durante 16 horas en placas de medio LB agar suplementado con el antibiótico correspondiente al vector utilizado. Para cultivos en medio líquido LB se incubó igualmente a 37°C pero con agitación constante. A partir de estos cultivos se prepararon alícuotas con un 20% v/v en glicerol para su almacenaje a -80°C.

## **2.8 Preparación de células competentes de *Escherichia coli* Novablue**

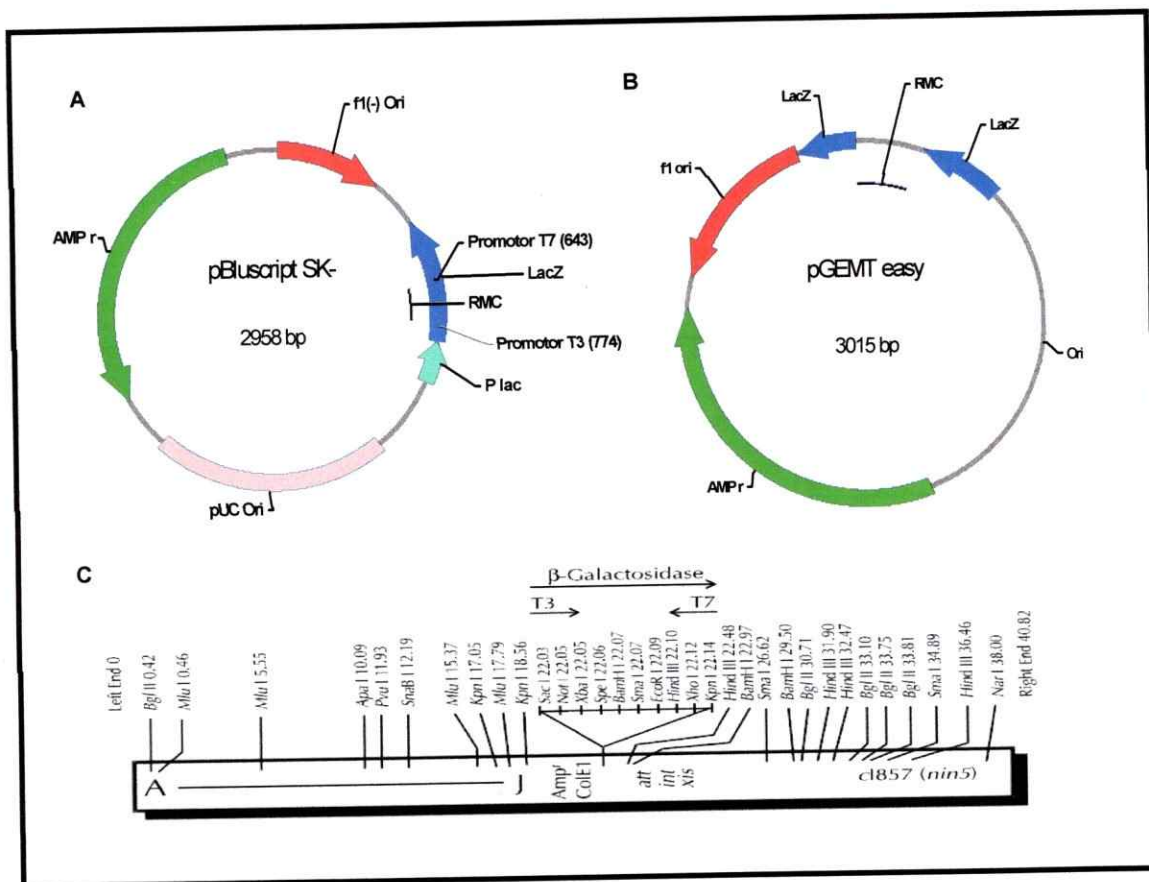
El protocolo utilizado fue el descrito por Sambrook (Sambrook y col, 1989). Para esto se utilizaron bacterias de *E. coli* NovaBlue con las cuales se inoculó 5 mL de medio LB sin antibiótico, incubándose toda la noche a 37°C con agitación constante a 250 rpm. Al día siguiente este cultivo primario se utilizó para inocular 500 mL de medio LB estéril y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 0,6-0,8$ . Luego, el cultivo fue centrifugado a 3.500 x g durante 10 min a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante fue eliminado y el sedimento bacteriano resuspendido en 250 mL de NaCl 10 mM frío y estéril. A continuación se centrifugó nuevamente a 3.500 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento bacteriano resuspendido en 250 mL de CaCl<sub>2</sub> 75 mM frío y estéril, incubándose en hielo durante 30 min. A continuación se centrifugó nuevamente en las condiciones ya descritas y el sedimento fue resuspendido en 60 mL de CaCl<sub>2</sub> 75 mM. Luego, se agregó glicerol hasta una concentración final 15% v/v y se incubó 3 horas en hielo. Finalmente, la suspensión se dividió en alícuotas las que fueron congeladas en mezcla de hielo seco/etanol y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su uso. Todo el proceso de preparación fue realizado bajo campana de flujo laminar para asegurar la esterilidad del proceso.

## 2.9 Transformación de células competentes de *Escherichia coli* Novablue

El protocolo de transformación utilizado fue el descrito por Inoue (Inoue y col, 1991). Brevemente, un volumen de 100  $\mu\text{L}$  (aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/mL) de células Novablue competentes y 10  $\mu\text{L}$  del producto de ligación o 10 ng de ADN plasmidial circular purificado se incubaron a 4°C por 30 min. Luego se sometieron las bacterias a un shock térmico de 1 min a 42 °C y se dejó reposar 2 min en hielo. Se agregó 1 mL de medio SOC (Sambrook y col, 1989) estéril y se incubó con agitación durante 1 hora a 37 °C. El cultivo se centrifugó a 10.000 x g durante 1 min y las bacterias se resuspendieron en aproximadamente 200  $\mu\text{L}$  del mismo cultivo. Las bacterias se sembraron en placas de LB-agar que contenían un antibiótico de selección pertinente al vector en uso, por ejemplo Amp 50  $\mu\text{g/mL}$  para pGEM-T® Easy. Se seleccionaron colonias por complementación  $\alpha$  cuando la transformación fue realizada con el vector pGEM-T® Easy, o pBluescript SK®. Para la complementación  $\alpha$  las placas debieron ser preparadas agregando sobre su superficie 50  $\mu\text{L}$  de X-GAL 50 mg/mL y 10  $\mu\text{L}$  de IPTG 1 M.

## 2.10 Vectores

Los plasmidios utilizados durante el desarrollo de esta tesis se esquematizan en la Figura 1.



**Figura 1. Plasmidios utilizados durante el desarrollo de esta tesis.**

**A.** pBluescript SK® (-) (Stratagene) contiene el gen *lacZ*, el cual permite la selección de los clones recombinantes. Además, contiene los promotores de transcripción T3 y T7, flanqueando los sitios de inserción,  $AMP^r$  (gen de resistencia a ampicilina);  $f1 ori$  (origen de replicación del fago f1).

**B.** pGEM-T® Easy se compone de  $AMP^r$  (gen de resistencia a ampicilina);  $f1 ori$  (origen de replicación del fago f1);  $lacZ$  (región codificante para la  $\beta$ -galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento múltiple); T (timidinas no apareadas en los extremos 3' de cada hebra para la inserción de los amplificadores de PCR).

**C.** UNI-ZAP XR ( $\lambda$ -ZAP II, bacteriófago utilizado como vector de clonación, digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*) para la construcción de la genoteca.



### **2.11 Purificación de ADN plasmidial**

El ADN plasmidial fue purificado mediante el Kit E.Z.N.A. Plasmid Miniprep de Omega Bio-tek, utilizando el protocolo recomendado por el fabricante basado en el método de purificación por lisis alcalina (Sambrook y col, 1989). El kit comienza a partir desde una pella concentrada de bacterias obtenido desde un cultivo bacteriano (2 -5 mL) crecido durante la noche (8-10 horas) a 37°C con agitación constante y 10.000 x g por 1 min.

### **2.12 Digestión de ADN mediante endonucleasas de restricción**

La cantidad necesaria de ADN, sea este plasmidial o un producto de PCR, se incubaba con las condiciones que el fabricante recomienda para la enzima de restricción. Además, se agregó la enzima de restricción en una relación de 5 unidades por microgramo de ADN a digerir y el volumen final de reacción se completó con agua miliQ estéril. Todas las enzimas usadas fueron incubadas a 37°C.

### **2.13 Ligación de fragmentos de ADN**

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR o extraídos desde geles de agarosa, fueron ligados a los vectores de clonación en una relación 1:10 de vector con respecto al inserto de ADN. La reacción de ligación se realizó en 10 µL con 1 U de ligasa T4 (Invitrogen) en el tampón de ligación correspondiente. El volumen final de la reacción se completó con agua miliQ estéril. La mezcla se incubó durante la noche a 4°C o durante 1 h a temperatura ambiente. El producto de ligación se utilizó para transformar células *E. coli* competentes.

#### **2.14 Purificación de fragmentos de ADN provenientes de un gel**

Los fragmentos de ADN resultantes de las digestiones con enzimas de restricción se analizaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Seakem GTC agarose; Biowhittaker Molecular Applications). Para visualizar los fragmentos de ADN los geles fueron teñidos en BrEt 1µg/mL. El segmento del gel correspondiente al fragmento de ADN de interés se escindió y separó del resto del gel, luego se purificó mediante el Kit E.Z.N.A. Gel Extraction de Omega Bio-tek según el protocolo suministrado por el fabricante.

#### **2.15 Partidores**

Los partidores fueron diseñados y analizados utilizando el programa computacional OLIGO versión 4.1 (Primer Analysis Software, para análisis y diseño de partidores, de Wojciech Rychlik, National Biosciences, Inc., Plymouth, EE.UU), para obtener información acerca de posibles estructuras secundarias y parámetros termodinámicos para la reacción. Los partidores fueron sintetizados por Invitrogen. La temperatura de hibridación ( $T_m$ ), de cada partidor se calculó en base a la fórmula:

$$T_m = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

En la Tabla 1 se muestra la secuencia y la  $T_m$  de los partidores utilizados.

**Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados en este trabajo.**

Nombre del partidor	Secuencia	Tm (°C)
PR4F	5' aag aaa ccg gca ggc cgg aag aag aa 3'	56
PR9R	5' cca agc cga gtc agc gaa gtt 3'	56
G775	5' gac tcg agt cga cat cga ttt ttt ttt tt 3'	42
G702	5' gac tcg agt cga cat cg 3'	52
SecUSPF88-R2	5' cgc aat tgt aaa atg caa ga 3'	54
SecUSPF88-F	5' cta tgg agc gat caa agg 3'	56
SecUSPF89-R	5' tga tta cat cca ttt tat tat g 3'	58
CL-USP5'atgF	5' atg gcg acg gcg gag aca a 3'	64
CL-USP3R	5' aac gtt tag atg ttt aca taa ata ta 3'	62
CLCBFF1	5' cgt cac cca att tac aga gga 3'	62
Nad5F	5' gat gct tct tgg ggc ttc ttg tt 3'	68
Nad5R	5' ctc cag tca cca aca ttg gca tta 3'	70
M13F	5' gac gtt gta aaa cga cgg cc 3'	55
M13R	5' cac agg aaa cag cta tga cc 3'	55

### 2.16 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µL con 2 µL de tampón PCR 10X libre de Mg<sup>+2</sup>, 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1,6 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de cada partidor 10 µM (Tabla 1), 50 – 300 ng de templado, 0,2 µL de Taq ADN polimerasa 5 U/µL, completándose el volumen final con agua milliQ estéril. La mezcla final se incubó en un termociclador modelo PTC-200 MJ Research con una etapa de denaturación a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 30 s de denaturación a 94°C, 30 s de

hibridación entre 50 - 60°C, dependiendo de la T<sub>m</sub> del partidor utilizado y una etapa de elongación entre 20 s a 2 min, según el tamaño del fragmento a amplificar. En último lugar se terminó con una etapa de 10 min a 72°C. La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 600 µL.

La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit Cycle-Pure Kit de E.Z.N.A Omega Bio-Tek, de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante.

### **2.17 Preparación de ARN total de *Citrus limon*.**

El método se basó en el protocolo descrito por Chang (Chang y cols,1993). Todas las soluciones se prepararon en agua libre de nucleasas tratadas previamente con DEPC. Hojas sin nervaduras de *Citrus limon* fueron maceradas en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener aproximadamente 100 mg de un polvo homogéneo. Luego se le agregó 600 µL de tampón de extracción (CTAB 2%, PVP30 2%, Tris-HCl 100mM (pH8,0), EDTA 25 mM, NaCl 2 M, espermidina 0,5g/L) ambientado a 65°C y conteniendo β-mercaptoetanol al 2% y ácido ascórbico 8 mM. Se incubó con este tampón a 65°C por un mínimo de 5 min agitando cada cierto tiempo. Se realizaron dos extracciones con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), centrifugando cada vez a 13.000 x g por 5 min recuperando la fase superior luego de cada centrifugación. Luego el ARN se precipitó con ¼ de volumen de LiCl 10 M por toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente el precipitado se centrifugó a 20.000 x g durante 25 min a 4°C eliminándose el sobrenadante y secando el tubo a temperatura ambiente sobre papel filtro. Una vez seca, la pella se resuspendió en SDS 0,5% y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego se realizó una nueva extracción con cloroformo isoamílico (24:1). La fase acuosa rescatada se precipitó con 2 volúmenes

de etanol 100% por 45 min a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo se centrifugó a  $20.000 \times g$  y  $4^{\circ}\text{C}$  por 25 min, eliminándose el sobrenadante y volviendo a secar la pella manteniendo el tubo a temperatura ambiente sobre papel filtro. Finalmente la pella se resuspendió en  $30 \mu\text{L}$  de agua bidestilada tratada con DEPC. Las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El ARN obtenido fue tratado durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  con 2U de DNasa Turbo, Turbo DNase<sup>™</sup> Kit de Ambion. La reacción se detuvo utilizando  $0,1 \mu\text{L}$  del reactivo de inactivación de la DNasa por 2 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó por 1,5 min a  $10.000 \times g$  descartando el precipitado y conservando el sobrenadante que contiene el ARN tratado. Este fue cuantificado mediante fluorescencia, utilizando el kit Quant-iT<sup>™</sup> RNA Assay Kit de Invitrogen, siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante.

## **2.18 Transcripción reversa**

La transcripción reversa (RT) se realizó usando como templado ARN total en una concentración máxima de  $1 \mu\text{g}$ . Se utilizó  $1 \mu\text{L}$  del partidor reverso (oligo dT) a una concentración de  $10 \mu\text{M}$ . Se incubó el ARN y el partidor por 10 min a  $70^{\circ}\text{C}$ . Luego se incubó en hielo por 5 min, para completar la mezcla de reacción a un volumen de  $25 \mu\text{L}$  agregando  $5 \mu\text{L}$  del tampón 5X suministrado con la enzima,  $4 \mu\text{L}$  de dNTP ( $10 \mu\text{M}$ ), 25 unidades de inhibidor de RNasa (RNasin), 200 U de transcriptasa reversa M-MLV y agua DEPC. La mezcla de reacción se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 1 h.

### **2.19 Obtención de los extremos del gen CBF mediante 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)**

Se realizó 3' RACE para la obtención de la hebra complementaria al extremo 3' del ARN. La reacción se realizó utilizando el oligo(dT) adaptador G775 (Tabla1) (Frohman y col., 1988). Se prosiguió con el protocolo descrito en la sección 2.18 para la reacción de transcripción reversa. Para realizar el PCR, se utilizó el partidor sentido CLCBFF1 (Tabla 1) y el partidor inverso G702 (Frohman y col, 1988), prosiguiéndose con el protocolo para una reacción de PCR descrito en la sección 2.16.

### **2.20 Análisis de ADN y ARN mediante electroforesis en geles de agarosa**

Se utilizaron geles de agarosa (Sigma) a una concentración ajustada según el tamaño del fragmento a observar (entre 1% y 2%) en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM pH 8,3) y BrEt 0,2 µg/mL. Antes de introducir al gel, a las muestras se le agrega un décimo de volumen de solución de carga 10X (azul de bromofenol 0,25% p/v y glicerol 50% v/v en TE). El gel se corre en tampón TAE 1X durante el tiempo necesario para resolver los componentes de la muestra (30-60 min) a un voltaje aproximado de 90 volts. El gel fue observado y fotografiado mediante el uso de un transiluminador de luz UV. Se utilizó como estándar de peso molecular una mezcla de fragmentos de ADN provenientes de ADN de fago lambda digerido con *Hind* III y ADN de fago ΦX174 digerido con *Hae* III (Invitrogen).

## **2.21 Secuenciación de ADN y su análisis.**

Los segmentos de ADN aislados y clonados en el vector pGEM-T® Easy fueron secuenciadas por el centro de secuenciación de ADN MacroGen Online Sequencing System (<http://www.macrogen.com>, Seoul, Corea), utilizando partidores universales M13F y M13R. Los ensamblajes de las secuencias se realizaron con el programa Vector NTI Suite 8,0 (Invitrogen) y los análisis mediante el algoritmo Blast de la base de datos NCBI. Los alineamientos se realizaron utilizando el programa ClustalW.

## **2.22 Construcción y análisis de una biblioteca de ADN complementario (ADNc).**

### **2.22.1 Purificación de ARN mensajero (ARNm)**

La extracción de ARN total se realizó a partir de tejido de hojas de árboles de la especie *Citrus limon*, variedad FINO49 y portainjerto Citrumelo usando el protocolo descrito por Chang (Chang y col., 1993) (Sección 2.17).

Para purificar las fracciones de ARN poli-A+ a partir del ARN total, se utilizó una columna de oligo(dT)-celulosa del kit "Oligotex mRNA Midi Kit" (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

La determinación de la cantidad de ARN poli-A+ obtenido se realizó mediante espectrofotometría a 260 nm.

### **2.22.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

La preparación de la genoteca de ADNc se realizó a partir de 5 µg de ARN poliA+, utilizando los kits "cDNA Synthesis Kit", "ZAP-cDNA® Synthesis Kit" y "ZAP-

cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit”, de Stratagene® y siguiendo el protocolo descrito en el manual de instrucciones de Stratagene®.

La síntesis de la primera hebra de ADNc, se realizó utilizando el ARNm como molde, la enzima transcriptasa inversa (M-MLV) (Stratagene) (Sección 2.18) y utilizando un partidador-adaptador oligo(dT), el cual posee un sitio de corte para la enzima de restricción *XhoI*.

La síntesis de la segunda hebra de ADNc se realizó utilizando Rnasa H y DNA polimerasa I. Se ligaron adaptadores con sitios *EcoRI* en ambos extremos de los fragmentos sintetizados. Finalmente se digirieron con la enzima de restricción *XhoI*, con el fin de obtener un ADNc de doble hebra el que se insertó de manera unidireccional en el vector.

### **2.22.3 Purificación del ADNc**

El ADNc se fraccionó de acuerdo a su tamaño molecular en una columna de Sefarosa CL-2B eliminándose los fragmentos de ADNc con tamaño inferior a 400 pb. Se mezcló todo el ADNc, que correspondió a 14 µL mezclado junto a 3,5 µL de buffer de carga provisto en el kit, cargándose toda la muestra en el centro de la superficie de la columna. Se colectaron aproximadamente 12 fracciones desde que la tinción en la columna avanzó desde la graduación – 0,4 mL hasta 0,3 mL. Posteriormente se tomó una alícuota de cada una de las fracciones eluidas y se cargaron en un gel de poliacrilamida 5% con el propósito de determinar los tamaños de los fragmentos obtenidos.



#### 2.22.4 Ligación del ADNc al vector y empaquetamiento en fago lambda

El ADNc de todas las fracciones eluidas fue precipitado a -20°C por la noche con 2 volúmenes de etanol al 100%. Al día siguiente la suspensión se centrifugó a 10.000 xg durante 1 min a 4°C eliminándose el sobrenadante y lavando la pella con 200 µL de etanol al 80 %. Luego se volvió a centrifugar durante 1 min a 10.000 xg y el precipitado se dejó secar, resuspendiéndose en 4 µL de agua DEPC. Los fragmentos de ADNc fueron ligados al vector Uni-ZAP XR®.

Luego los vectores se empaquetaron en fago lambda Zap II mediante la adición de ADN (0,1-1,0 ng de DNA ligado) al extracto de empaquetamiento. Luego la mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió a cada tubo 500 µL de tampón SM y 20 µL de cloroformo, conservándose el sobrenadante luego de centrifugar durante 1 min a 10.000 xg. El sobrenadante que contenía el fago se almacenó a 4°C hasta su posterior titulación.

#### 2.22.5 Titulación y amplificación de la biblioteca

La titulación se realizó mediante recuento de placas de lisis en células *E. coli* XL1-Blue MRF'. Para calcular el título de la genoteca en unidades formadoras de placas por mL (ufp/mL). Se utilizó la siguiente formula:

$$\frac{\text{Unidades formadoras de placas}}{\text{mL}} = \frac{[\text{Número de placas} \cdot \text{Factor de dilución}] \cdot 1000 \mu\text{L}}{[\text{Volumen plaqueado} (\mu\text{L})] \text{ mL}}$$

Se determinó el porcentaje de recombinación de la genoteca mezclando 1µL de los vectores empaquetados en fago lambda Zap II con 200 µL de células *E. coli* XL1-Blue MRF' a una OD<sub>600</sub> de 0,5 con 2-3 mL de agar de superficie NZY a

aproximadamente 48°C al que se le adicionó 15 µL de IPTG 0,5M y 50 µL de X-gal [250mg/mL (en DMF)]. Esta mezcla se plaqueó sobre agar NZY y se dejó incubando por 6-8 horas a 37°C, tras lo cual se realizó el recuento de las placas de lisis recombinantes y no recombinantes en función del color.

#### **2.22.6 Amplificación de las genotecas**

La amplificación de la genoteca primaria se realizó inmediatamente para conseguir una genoteca estable con un título elevado y por lo tanto un mayor stock estable para ser almacenado a -80°C. Para ello células de XL1-Blue MRF' de *E. coli* se infectaron con los fagos. Luego de la formación de placas de lisis en agar de superficie NZY, los fagos amplificados se recuperaron mediante la elución con tampón SM. Después de agregar cloroformo (5%) y centrifugar por 10 min a 500 xg, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4°C en alícuotas (con 0,3% de cloroformo) y a -80°C (con 7% de DMSO).

La biblioteca amplificada fue titulada nuevamente realizando diluciones seriadas del fago, calculándose su título con la fórmula descrita anteriormente (Sección 2.22.5).

#### **2.22.7 Hibridación y rastreo**

El rastreo de la biblioteca se realizó siguiendo el protocolo suministrado por Stratagene. Para el primer rastreo se utilizaron 10 placas de 150 mm de diámetro de agar NZY con aproximadamente 600 placas de lisis. Luego se colocó sobre las placas una membrana de nitrocelulosa (Hybond™-XL Amersham Bioscience) por 2 min para que las partículas virales se transfieran a cada membrana. Las membranas fueron marcadas con una aguja para poder orientarlas correctamente en la placa antes de ser removidas. Posteriormente las membranas fueron sumergidas en una solución de

NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M por 2 min para ser denaturadas, luego se neutralizaron por 5 min en una solución de NaCl 1,5 M y Tris-HCl (pH 8,0) 0,5 M, lavándose posteriormente por 30 s en una solución de Tris-HCl (pH 7,5) y 2 x SSC. Las membranas se dejaron secando en papel Whatmann® 3MM y luego se entrelazó el ADN a las membranas utilizando un UV-crosslinker Bio-Link® BLX E254 (Vilber Lourmat) a 120,000 µJ durante 1 min.

#### **2.22.8 Preparación de una sonda radiactiva**

La sonda se preparó amplificando por PCR el dominio AP2 de *Citrus limon* con partidores específicos (Tabla 1) cambiando la concentración de los dNTPs usados. Las cantidades de dNTPs utilizados fueron las siguientes: 4 µL α-<sup>32</sup>P dCTP (3,33 µM), 3 µL dCTP (0,1mM) y 3 µL de una mezcla de dNTPs sin incluir dCTP (0,33 mM). Los volúmenes descritos fueron para reacciones con un volumen final de 50 µL. El producto de PCR fue purificado en una columna con resina ProbeQuant™ G-50 (Amersham Bioscience) para eliminar los remanentes de dNTPs que no se incorporaron a la sonda. La radioactividad de la sonda fue medida en Lumi-scint Luminometro/LSC (Bioscan, Inc).

Una vez preparada la sonda, las membranas se prehibridaron utilizando el protocolo descrito por Sambrook (Sambrook y col., 1989), por el cual se sumergen las membranas en 6 x SSC, 5 x de reactivo Denhardt's, SDS 0,5% y 100 µg/mL de ADN de espermio de salmón durante 1 h a 42°C. Transcurrido este tiempo, se agregó la sonda radioactiva, sobre la solución de prehibridación en la que estaban sumergidas las membranas, hibridándose toda la noche a 42°C. Al día siguiente se lavaron las membranas con dos lavados de 20 min a 42°C. El primer lavado se realizó con una solución de 2 x SSC y 0,1% SDS y el último lavado con una solución de 1x SSC, 0,1%

SDS. Luego, las membranas se colocaron sobre una placa radiosensible (Phosphorimager) (Personal Molecular Imager, BIORAD) durante aproximadamente 6 h. Las imágenes obtenidas fueron escaneadas en el Molecular Imager FX Pro Plus, BioRad Inc. y analizadas utilizando el programa Quantity One (versión 4.1).

#### **2.22.9 Identificación de los clones de interés**

Una vez que se obtuvo el resultado de las membranas, las placas de lisis positivas fueron localizadas en las placas por superposición de las membranas con el reverso de las placas. Las placas de lisis positivas fueron extraídas con un sacabocado de vidrio estéril (pipeta Pasteur). Luego éstas fueron guardadas en 500  $\mu$ L de tampón SM y 20  $\mu$ L de cloroformo a 4°C.

Fueron necesarios tres rastreos para aislar un clon único con mayor facilidad, siguiendo la misma metodología anteriormente descrita. En el segundo y tercer rastreo las placas utilizadas fueron de 90 mm de diámetro, realizándose duplicados de las membranas. En el segundo rastreo se plaquearon aproximadamente de 100-200 ufp. por placa y en el tercero 20- 30 ufp por placa.

#### **2.22.10 Excisión *in vivo* del plasmidio pBluescript a partir del vector Uni-Zap XR.**

Este proceso consistió en extraer y recircularizar el inserto que se encuentra en el vector Uni-Zap XR, generando el plasmidio pBluescript.

La obtención de los clones recombinantes se realizó transformando las bacterias directamente con el plasmidio. La escisión *in vivo* se realizó con la ayuda del fago helper ExAssist en células de *E. coli* cepa SOLR, el cual complementa el sistema

de escisión. Las colonias que crecen en las placas con LB ampicilina contienen el plasmidio pBluescript con el inserto de ADN clonado. Bacterias con el fago helper no crecen ya que no poseen resistencia a ampicilina. Las células SOLR son resistentes a la infección del fago lambda, lo que previene la infección del fago después de la escisión.

#### **2.22.11 Obtención de clones recombinantes**

Luego de obtener la genoteca de ADNc en forma de plasmidios, éstos se usaron para transformar células de *E. coli* cepa SOLR. Para esto se mezcló 1 mL de las bacterias resuspendidas en MgSO<sub>4</sub> 10 mM y 1 µL de la solución con los plasmidios de la genoteca. Las bacterias se sembraron en una placa Petri de 16 cm de diámetro con LB-agar con Amp (100 mg/mL), con IPTG 0,5 M y 50 µL de X-gal [250 mg/mL(en DMF)] en su superficie.

El plasmidio confiere, entre otras funciones, resistencia a ampicilina a la célula huésped y permite realizar una primera selección de las colonias recombinantes a través del cambio en la coloración mediante la complementación  $\alpha$ .

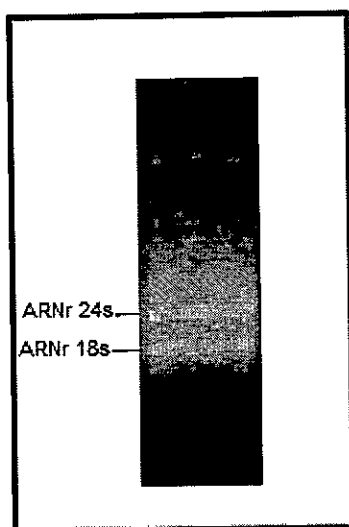
Las células recombinantes fueron identificadas por la formación de colonias blancas en las placas. La determinación del tamaño aproximado de los insertos de los clones recombinantes se realizó mediante PCR con partidores M13R y M13F descritos para el plasmidio en uso y los partidores utilizados para la sonda. El PCR fue realizado directamente en las células tomando con un asa estéril las colonias blancas de la placa de LB, resuspendiéndolas en 30 µL de agua destilada.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Estrategias de aislamiento de un gen CBF de *Citrus limon*.

Con el objetivo de aislar genes CBF y eventualmente otros involucrados en estrés abiótico en *Citrus limon*, se preparó una genoteca de ADNc de esta especie. Estos genes pueden ser inducidos por bajas temperaturas, deshidratación y estrés salino (Sección 1.4.1). La idea inicial era someter a los árboles a estrés salino, sin embargo, el tamaño del árbol y sus raíces no permitían realizarlo. Por este motivo, y dado que los genes CBF se expresan bajo diferentes tipos de estrés abiótico se decidió construir la biblioteca a partir de plantas sometidas a frío.

La biblioteca de ADNc se construyó a partir de ARN total de hojas extraídas de una planta de *Citrus limon* de aproximadamente 3 años de edad, que fue sometida a 4°C durante 30 min, según procedimiento descrito en la sección 2.18. El ARN extraído fue visualizado en un gel de agarosa al 1% para verificar su integridad. En la Figura 2 se observan las bandas que corresponden a los ARN ribosomales (ARNr 18S y ARNr 24S), indicando que la preparación contiene ARN sin apreciable degradación.



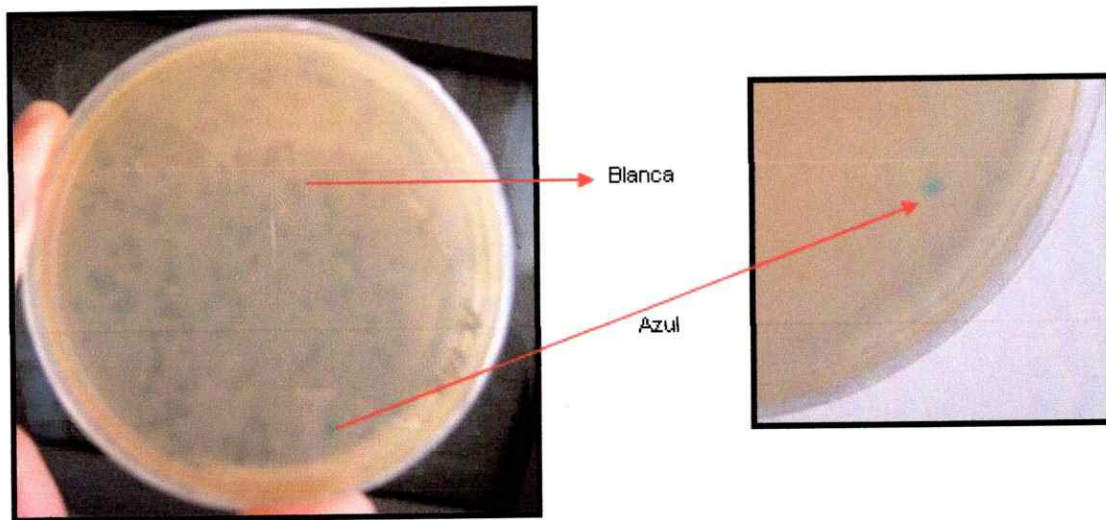
**Figura 2. Análisis electroforético de ARN total de *Citrus limon*.** Electroforesis de ARN en gel de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio extraído de planta de *Citrus limon* sometido a 4°C durante 30 min.

Un mg de ARN total se sometió a cromatografía en columna oligo(dT)-celulosa del kit "Oligotex mRNA Midi Kit" (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, obteniéndose la fracción enriquecida en ARN poli-A<sup>+</sup>.

A partir de 5 µg de ARN poli-A<sup>+</sup> se sintetizó el ADNc de doble hebra descrito en la sección 2.22.2. Para realizar una clonación direccional de los fragmentos generados se ligaron adaptadores a los extremos 5' y 3' del ADNc con los sitios de restricción *Xho* I y *Eco*R I. El ADNc obtenido se fraccionó en una columna de Sefarosa CL-2B según su peso molecular. Alícuotas de las fracciones obtenidas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida no denaturante con el propósito de seleccionar las fracciones que poseían los ADNc de tamaños superior a 400 pb. Sin embargo, por un problema de resolución del gel no fue posible visualizar los diferentes tamaños por lo que se utilizaron las 12 alícuota eluidas. Éstas se juntaron y precipitaron (sección 2.22.3), resuspendiéndose finalmente en agua DEPC para ser ligados al vector Uni-

ZAP XR<sup>®</sup> y luego los vectores fueron empaquetados usando el extracto Gigapack Gold III de Stratagene. Células de *E. coli* de la cepa XL1-Blue MRF fueron infectadas con los fagos recombinantes con lo cual se obtuvo una genoteca con un título de  $2.5 \times 10^6$  ufp/mL.

Al mismo tiempo se determinó el porcentaje de recombinantes de la biblioteca utilizando el cambio de coloración obtenido a través del sistema de complementación  $\alpha$ . Para eso se efectuó un recuento de las unidades formadoras de placa sin inserto correspondiente a las placas de lisis azules y aquellas con inserto correspondientes a las placas de lisis blancas. Se determinó que la genoteca presentó un 98% de clones recombinantes (Figura 3). La genoteca se amplificó (Sección 2.22.5), utilizando células XL1-Blue MRF', obteniéndose un título de  $5,7 \times 10^7$  ufp/mL



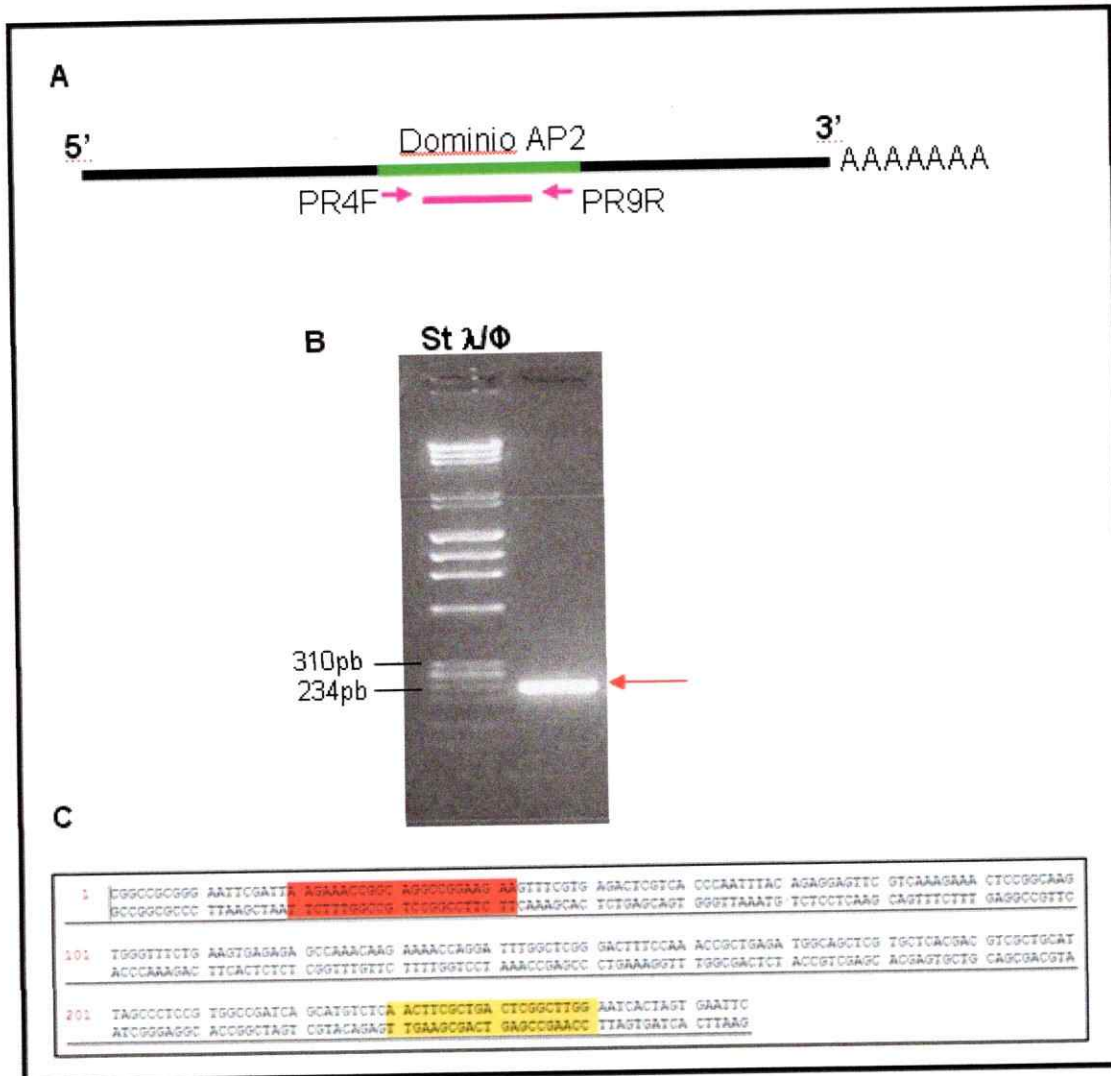
**Figura 3. Selección de recombinantes mediante complementación  $\alpha$ .** Siembra de células XL1 – Blue MRF' infectadas con los fagos que llevan empaquetada la librería en placas NZY que poseen además IPTG y X-gal. Placas de lisis azules no presentan inserto y placas de lisis blancas corresponden a las recombinantes.



### 3.1.1 Amplificación del fragmento a utilizar como sonda

Para proceder a rastrear la genoteca, en búsqueda de un ADNc correspondiente a un gen CBF, se requirió preparar una sonda adecuada. Se decidió utilizar un oligo capaz de hibridar con el dominio AP2 de los genes CBF. Para esto se utilizaron los partidores PR4F y PR9R (Tabla 1). Estos fueron diseñados a partir del alineamiento de secuencias CBF de varias especies, en regiones donde existe un mayor grado de similitud entre éstas (Gamboa y col., 2007). El templado utilizado para amplificar el dominio AP2 fue ADNc sintetizado por transcripción reversa de ARN desde hojas de una planta de *Citrus limon* sometida a 4°C durante 30 min, procedimiento descrito en la sección 2.18. Se obtuvo un amplificado de aproximadamente 260 pb el cual fue clonado en el vector pGEM-T® Easy y luego transformado *E. coli* NovaBlue. Finalmente fue secuenciado confirmándose la identidad de este fragmento, con la región central de los genes CBF, perteneciente al dominio AP2 descritos en otras especies (Figura 4).

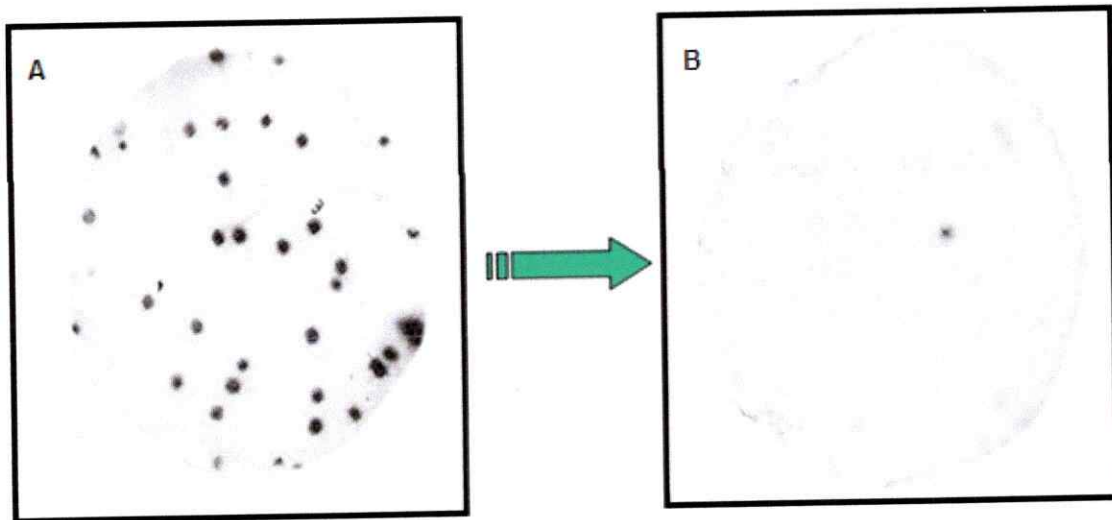
El marcaje de la sonda con P<sup>32</sup> se realizó según lo descrito en la sección 2.22.8.



**Figura 4. Amplificación del dominio AP2 de *Citrus limon* mediante PCR a partir de ADN complementario.**

**A.** Esquema del procedimiento utilizado para obtener el dominio AP2 de *Citrus limón* mediante la utilización de los partidores PR4F y PR9R. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en presencia de bromuro de etidio amplificando un producto de 260 pb aproximadamente perteneciente al dominio AP2. St corresponde al estándar de tamaño de ADN correspondiente a una mezcla de ADN de  $\lambda$  digerido con *HindIII* y ADN de  $\phi$ X174 digerido con *HaeIII*. **C.** Secuencia del sitio AP2 amplificado mostrando en colores las zonas de unión de los partidores; en color rojo el partidor PR4F y en amarillo el partidor PR9R.

A continuación se realizó un rastreo de la genoteca utilizando 10 membranas de 150 mm de diámetro que contenían ADN de aproximadamente  $5 \times 10^4$  fagos, que fueron hibridados con la sonda radioactiva (Sección 2.22.7).. Como resultado, se detectaron 12 clones, los cuales fueron extraídos y almacenados en tampon SM y cloroformo a 4°C Los candidatos escogidos tras la primera hibridación fueron sometidos a una nueva selección donde se utilizaron 12 placas de agar NZY en las que se plaquearon de 100 a 200 ufp en cada una de ellas. Se realizó un duplicado de membrana para cada una de las placas (Sección 2.22.9). Los resultantes de éste segundo rastreo se comprobaron con una tercera y última hibridación en la que solo se plaquearon de 20 a 30 ufp en cada placa, donde también se realizaron duplicados. Como resultado final se detectó la presencia de un solo clon (Figura 5)..

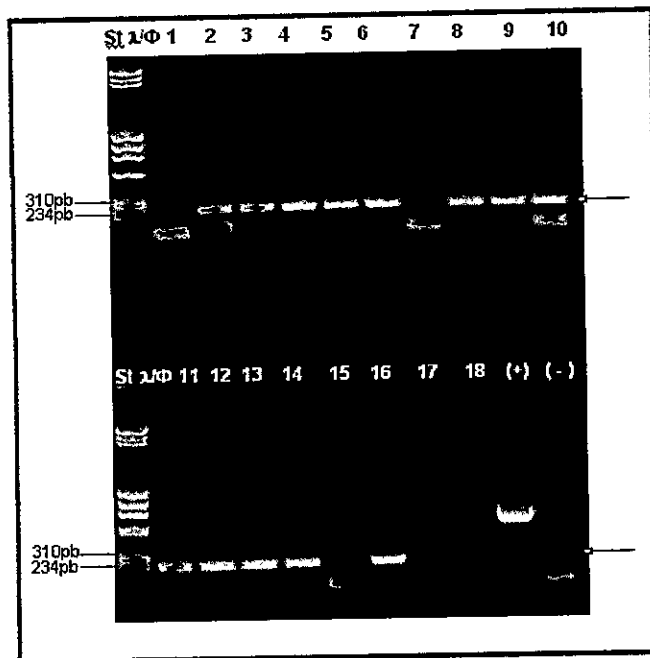


**Figura 5. Detección mediante sonda radioactiva de placas de lisis sobre membranas de nitrocelulosa.**  
Membranas hibridadas con sonda radioactiva del segundo (A) y tercer rastreo (B).

El ADN de los fagos seleccionados en el rastreo, fue extraído y recircularizado desde el vector Uni-Zap XR<sup>®</sup>, mediante la escisión *in vivo* de pBluescript<sup>®</sup>. La escisión se realizó utilizando el fago *helper* ExAssist. Con estas preparaciones plasmidiales se transformaron células SOLR de *E. coli* y se crecieron por la noche en una estufa a 37°C en placas de LB amp para la obtención del ADN plasmidial. Se seleccionaron los clones recombinantes a través del sistema de complementación  $\alpha$ .

Se seleccionaron 18 colonias blancas al azar. Luego se realizó una reacción de PCR con los partidores universales M13F y M13R (Tabla 1) presentes en pBluescript SK<sup>®</sup> (-). A continuación se realizó un PCR anidado con los partidores específicos PR4F y PR9R (Tabla 1). Los fragmentos obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa al 1,5% (Figura 6). Los 18 clones dieron origen a un amplificado de aproximadamente 260 pb.

Dos clones fueron seleccionados, purificados y clonados en el vector pGEM-T<sup>®</sup> Easy. Luego, fueron transformadas en *E. coli NovaBlue* y su ADN plasmidial fue secuenciado (Sección 2.21). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las existentes en la base de datos de Genbank y se encontró obtuvieron que tenían alta homología con una proteína tipo celulosa sintasa-like D4 de *Arabidopsis thaliana*, y ninguna homología con el factor de transcripción CBF que se buscaba.



**Figura 6. Selección de clones recombinantes.**

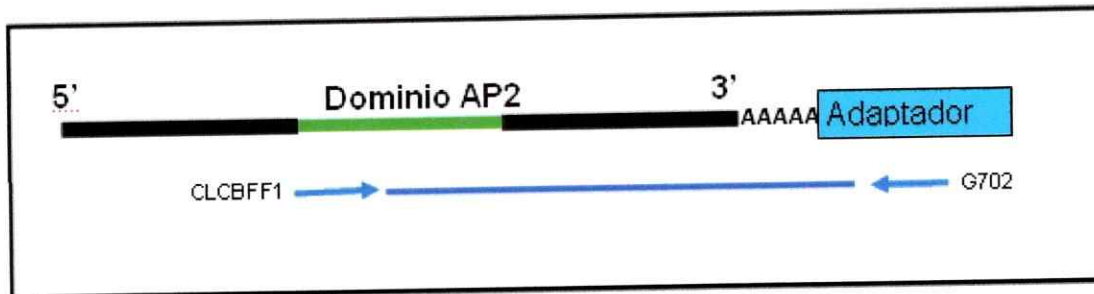
Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en presencia de bromuro de etidio, de productos de PCR de clones seleccionados por complementación  $\alpha$ . Los carriles 1 al 18 presentan un amplificado de 260 pb aprox. Control (+) amplificación de una secuencia conocida para verificar eficiencia del PCR. Control (-) corresponde a la mezcla de PCR sin templado. St corresponde al estándar de tamaño de ADN correspondiente a una mezcla de ADN de fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III y ADN de  $\phi$ X174 digerido con *Hae*III.

### 3.2 Nuevas estrategias para aislar genes CBF,. Amplificación y detección de un gen *usp* de *Citrus limon*.

Debido a que el rastreo de la biblioteca de ADNc construida no permitió aislar la secuencia completa de un gen CBF de *Citrus limon*, se realizó un cambio de estrategia. Ya que el dominio AP2 había sido amplificado previamente, se optó por utilizar la técnica *RACE* para aislar los extremos del gen CBF como se describió en la sección 2.19.

Para la obtención del extremo 3' del gen CBF se generó el ADN complementario a partir de ARN total de *Citrus limon* usando el partidor G775, el cual

corresponde a un oligo-dT con una secuencia adaptadora adherida. El PCR se realizó con el el partidor CLCBFF1 específico y complementario al dominio AP2 del gen, (Tabla 1, Figura 7) y el partidor G702 que es complementario a la secuencia adaptadora del partidor G775.(Tabla 1)

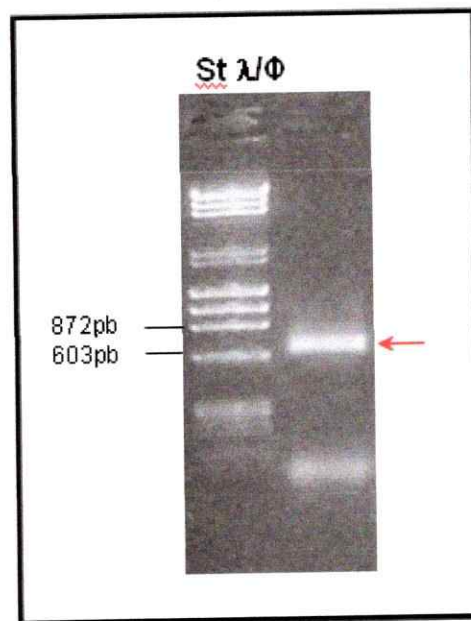


**Figura 7. Esquema del procedimiento utilizado para obtener el fragmento 3' del gen CBF de *Citrus limon*.**

Se intentó la obtención del extremo 3' del gen CBF de *Citrus limon* con la técnica 3'RACE haciendo modificaciones en los parámetros del PCR, tales como variaciones de la Tm y el tiempo de elongación. Se logró la amplificación de varias bandas con tamaños de aproximadamente 300 a 800 pb. Estas bandas fueron clonadas en el vector pGEM-T® Easy y luego transformadas en *E. coli* NovaBlue. Finalmente fueron secuenciadas. Ninguna de las secuencias obtenidas correspondió al gen deseado. Un ejemplo de ello fue la amplificación de una secuencia que tenía su mayor homología con la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) de *Citrus clementina* x *Citrus reticulata*.

A pesar de que se realizaron aproximadamente 10 intentos de amplificar el extremo 3' del gen CBF de *Citrus limon* injerto FINO 49 con la técnica RACE, no se obtuvieron los resultados esperados. Sin embargo, en uno de estos intentos se logró amplificar un fragmento de 729 pb el cual al ser secuenciado tenía homología con una

Proteína de Estrés Universal (USP) (Figura 8). Luego de analizar los antecedentes bibliográficos de esta proteína, solo había dos estudios indicando su presencia en plantas (Sauter y col., 2002; Kerk y col., 2003). La gran mayoría de los artículos concentraba su importancia en bacterias (ver introducción). En éstas se habría demostrado que la proteína USP aumentaba su expresión cuando eran sometidas a diferentes tipos de estrés. En plantas, como *Oryza sativa*, se reportó que la rápida inducción de *OsUSP1* es requerida temprana y transitoriamente en la adaptación a estrés por hipoxia (Sauter y col., 2002). Dado estos antecedentes (Sección 1.4.2) los que nos confirmaban que esta proteína podría participar en estrés abiótico, decidimos analizar su expresión en cítricos.



**Figura 8. Amplificación del gen *usp* de *Citrus limon*, injerto FINO 49 mediante PCR a partir de ADN complementario.**

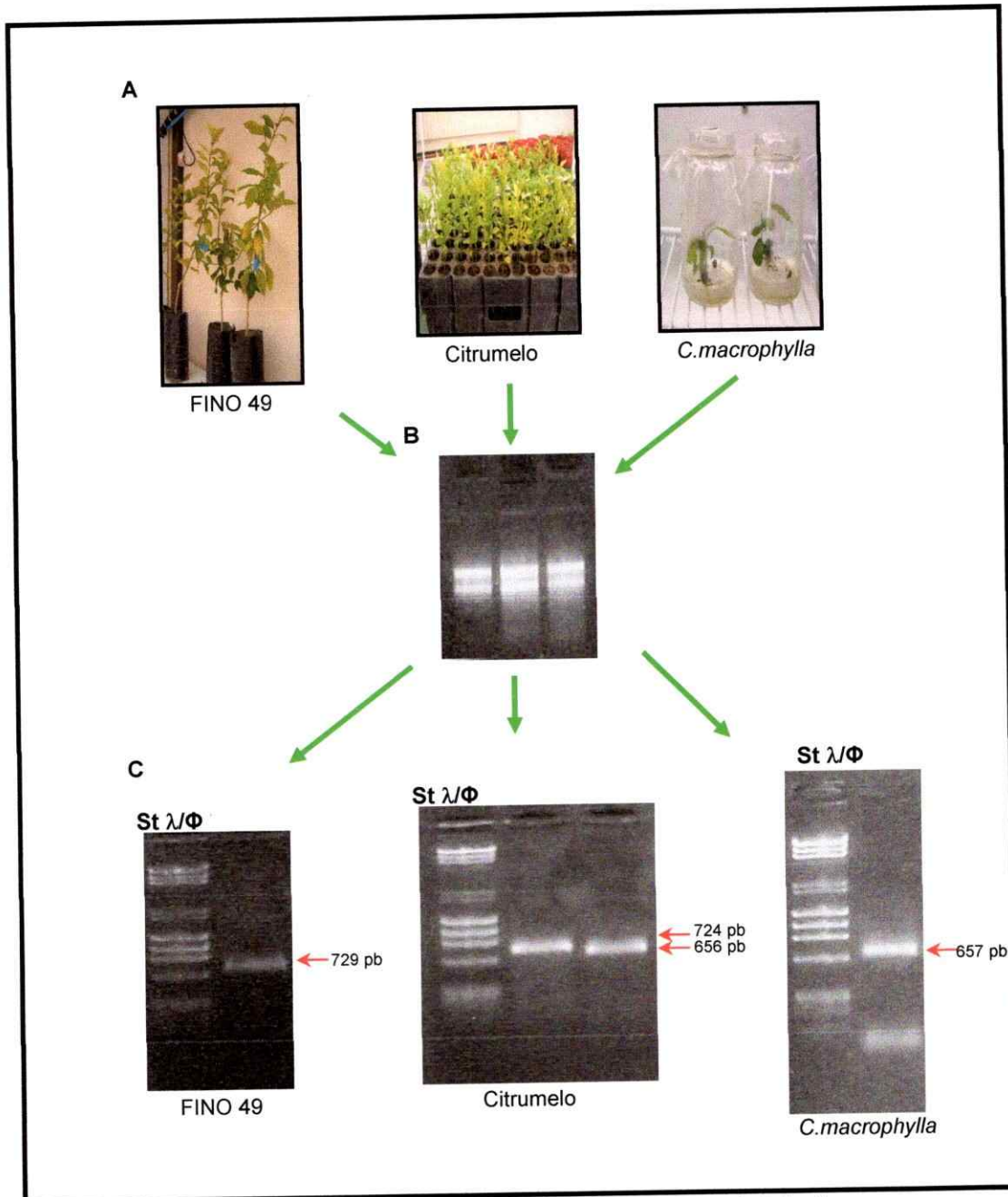
Electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en presencia de bromuro de etidio. Producto amplificado de aproximadamente 720 pb con los partidores CICBFF1 y G702 que correspondió finalmente al gen *usp* de *Citrus limon* de FINO 49.

Si bien es cierto que el gen *usp* amplificado fue aislado desde el injerto variedad "FINO 49" de *Citrus limon*, el objetivo de esta tesis es el efecto del NaCl en la planta y ésta, como se mencionó anteriormente, afecta directamente al portainjerto de los cítricos. Por esta razón se decidió aislar este gen desde dos portainjertos: *Citrus macrophylla* y Citrumelo. El primero fue cultivado *in vitro* a partir de semillas crecidas en medio MS. A partir del portainjerto Citrumelo se obtuvieron plántulas crecidas en tierra. Usando la secuencia *usp* de *Citrus limon* FINO 49 ya aislada y secuenciada se diseñaron dos partidores: CL-USP5'atgF, partidor que comienza en el codón de inicio de la secuencia y CL-USP3R (Tabla 1), partidor inverso ubicado en la región 3'UTR del gen *usp*.

De cada uno de los dos portainjertos se aisló ARN total desde sus hojas y a partir de estos se generó ADNc mediante transcripción reversa. Luego, con la pareja de partidores diseñada se realizó un PCR, que en el caso de *Citrus microphylla*, produjo una banda de 657 pb y en el caso del portainjerto Citrumelo se observaron dos bandas de diferentes tamaños una de 656 pb y la otra de 724 pb (Figura 9). Estas bandas fueron clonadas en el vector pGEM-T® Easy, transformadas en *E. coli* y luego secuenciadas por ambos lados confirmándose su identidad correspondiente a una proteína USP. Para poder diferenciar los dos genes *usp* del portainjerto Citrumelo, al de 724 pb se lo denominó *Clusp88* y el de 656 pb *Clusp89*.

Para verificar que las diferencias de tamaño observadas no hayan sido creadas por un error en los procesos de amplificación, se secuenció más de un clon y por ambas hebras de ADN, confirmándose finalmente que *Clusp88* y *Clusp89* correspondían a dos genes diferentes que variaban principalmente en su 3'UTR.



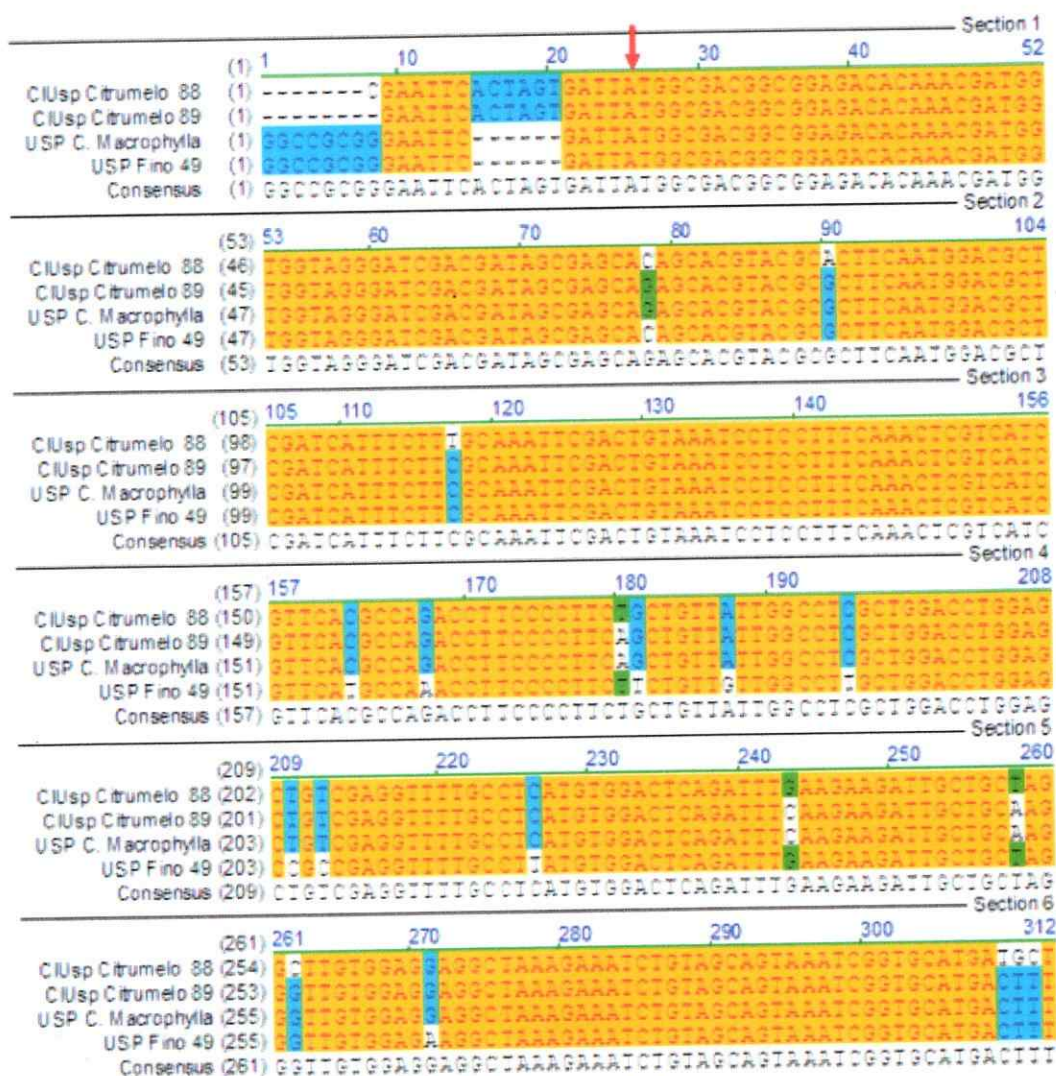


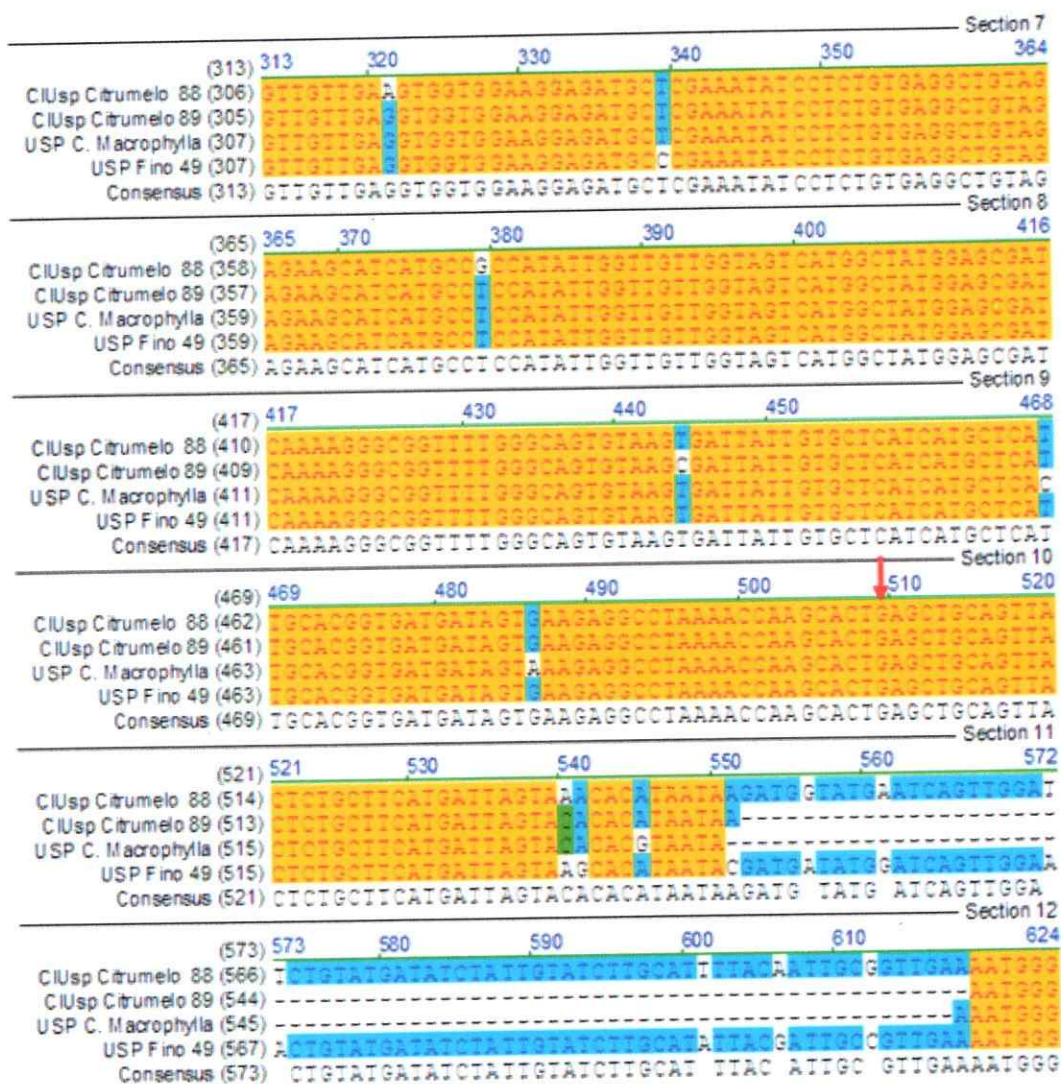
**Figura 9. Genes *Clusp* aislados a partir de injertos y portainjertos.**

**A.** Plantas de injerto FINO 49, portainjerto Citrumelo y portainjerto *C. macrophylla*. **B.** Electroforesis de ARN extraído de las plantas de la figura A en gel de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio. **C.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en presencia de bromuro de etidio, de los productos amplificados de aprox. 725 pb para FINO 49, dos fragmentos de aproximadamente 650 y 720 pb para Citrumelo (previamente separados por electroforesis en geles y cargados nuevamente por separado) y un fragmento de aproximadamente 650 pb para *C. macrophylla*. St  $\lambda\Phi$  corresponde al estándar de tamaño de ADN correspondiente a una mezcla de ADN de fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III y ADN de fago  $\phi$ X174 cortado con *Hae*III.

### 3.3 Análisis bioinformático

Una vez secuenciados estos cuatro fragmentos de ADNc amplificados se analizaron alineándolos entre si lo que permitió establecer un alto grado de homología, en especial en la región codificante. Esto se observa en la Tabla 2, siendo el porcentaje de identidad nucleotídica entre las secuencias mayor a 81,5% para todos los casos comparados (Figura 10).





**Figura 10. Alineamiento de los genes *Clusp* de cítricos.**

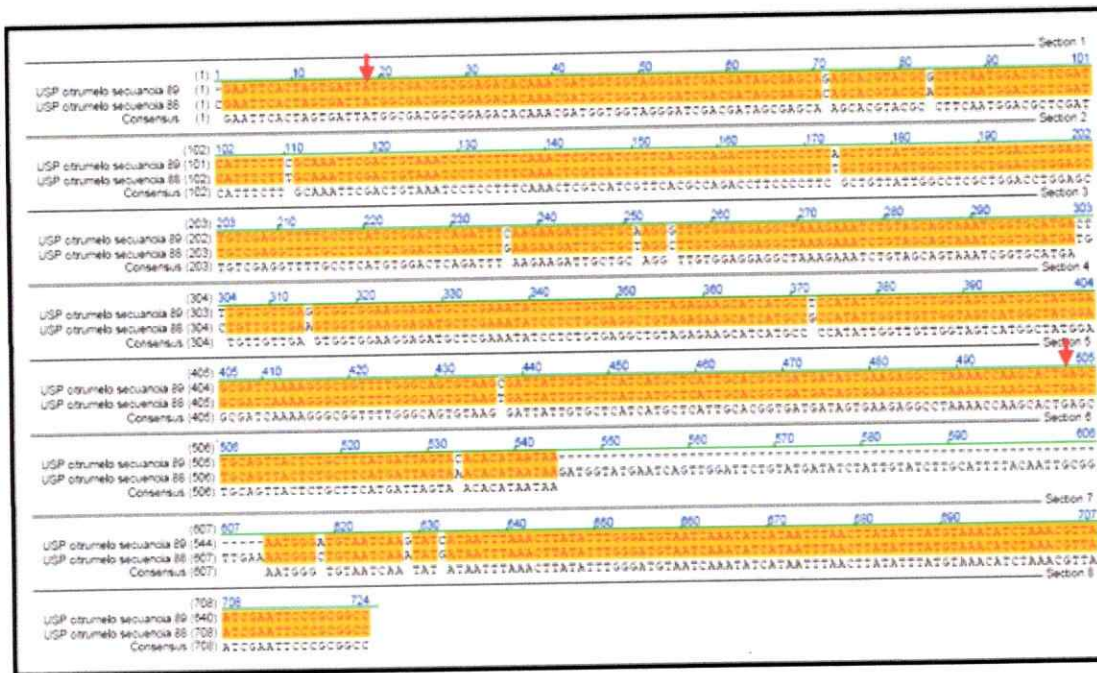
Alineación de secuencias nucleotídicas de *usp* de Citrumelo; *Clusp88* y *Clusp89*; *C. macrophylla* y FINO 49. En amarillo se muestran las bases conservadas, en verde las semi conservadas y en celeste las con conservación mayor a un 50%. Las flechas rojas indican el inicio y término de la región codificante.

**Tabla 2. Relación de identidad entre secuencias de *Clusp*.**

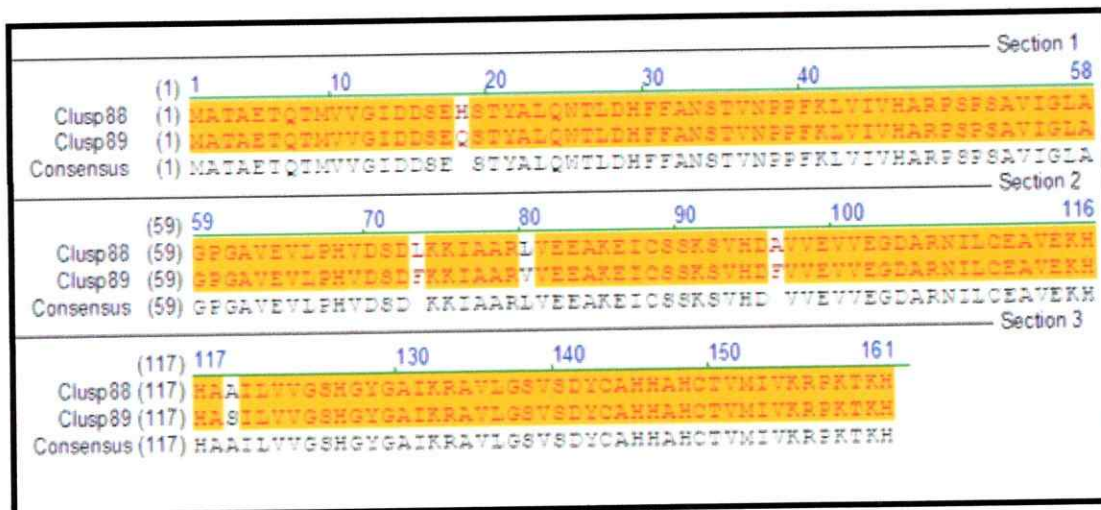
Secuencias comparadas	% identidad nucleotídica total	% identidad nucleotídica (ORF)	% identidad nucleotídica (3'UTR)
Citrumelo89/ <i>C. microphylla</i>	92,2%	99,4%	79,6%
Citrumelo88/ FINO49	91,5%	96,3%	86,5%
Citrumelo88/ citrumelo89	88,3%	97,3%	62%
<i>C. microphylla</i> / FINO49	85,7%	96,7%	60,2%
Citrumelo88 / <i>C. macrophylla</i>	84,7%	97,1%	62,6%
Citrumelo89/FINO49	81,5%	96,9%	54,7%

Un alineamiento entre las regiones codificantes de los genes *Clusp88* y *Clusp89* reveló un alto grado de identidad, con 10 bases diferentes. Donde se observó una mayor variación fue en la región 3'UTR, que presentaba un 62% de identidad. De hecho *Clusp88* posee en su región 3'UTR una inserción de 67 pb que no se observa en *Clusp89* (Figura 11).

Finalmente se estableció que el *usp* de la variedad Citrumelo está compuesto por 486 pares de bases que codifican para 161 aminoácidos. El 3'UTR de *Clusp88* está formado por 221 pares de bases y su 5'UTR por 17 pares de bases, a diferencia de *Clusp89* que su 3'UTR está formado por 175 pares de bases y su 5'UTR por 16 pares de bases (Figura 12).



**Figura 11. Alineación de los genes *Clusp* de Citrumelo.**  
Alineación de secuencias de *usp* de citrumelo. Se marcan con una flecha roja el inicio y el término de la región codificante.



**Figura 12. Comparación de secuencia aminoacídica precedida de USP aisladas desde el portainjerto Citrumelo.**  
Alineación de la secuencia completa de la región codificante de Clusp88 y Clusp89 del portainjerto Citrumelo de *Citrus limon* en el dominio formado por 161 aminoácidos.

Una vez conocida la secuencia de *usp* de Citrumelo fué de interés compararlo con la secuencia de *usp* de otras plantas. Las secuencias utilizadas en este análisis fueron de *Arabidopsis thaliana* (NM\_130339); *Vicia faba* (AJ271816); *Astragalus sinicus* (DQ199645); *Brassica rapa* (EU186344); *Oryza sativa* (AF491815); *Methanococcus jannaschii* (NP\_247556) y CIUsp88 de *Citrus limon*.

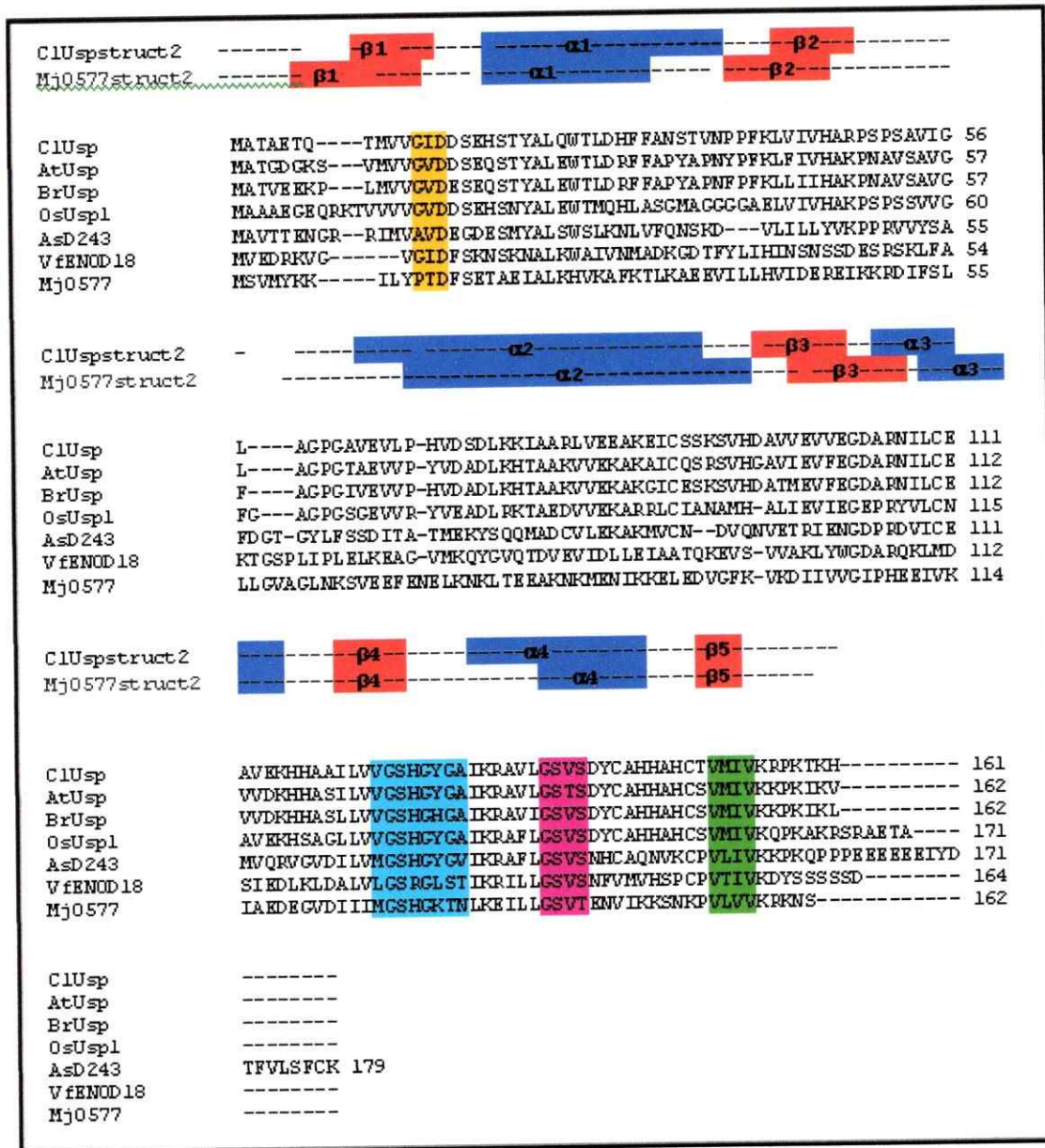
Al comparar la secuencia aminoacídica de Clusp88 con las secuencias USP de las otras especies de plantas, se estableció que posee una mayor identidad con *A. thaliana* (71%), seguido por *Brassica rapa* con 70,4% (Tabla 3).

Además se identificaron los aminoácidos conservados, semi-conservados y aquellos involucrados en la interacción con ATP. Por otra parte, la comparación de secuencias evidencia que la región de dimerización está altamente conservada en Clusp 88 y otras USP de plantas (Figura 13).

**Tabla 3. Relación de identidad entre secuencias USP de diferentes especies y Citrumelo**

<b>Especie vegetal</b>	<b>Secuencias comparadas</b>	<b>% de identidad aminoacídica total</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CIUsp/AtUsp	71%
<i>Brassica rapa</i>	CIUsp/BrUsp	70,4%
<i>Oryza sativa</i>	CIUsp/OsUsp1	56,4%
<i>Astragalus sinicus</i>	CIUsp/AsD243	29,7%
<i>Vicia faba</i>	CIUsp/VfENOD18	29,7%
<i>Methanococcus jannaschii</i>	CIUsp/Mj0577	24,4%

Mediante la utilización de SSpro (Prediction of protein secondary structure, <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>) de la Universidad de California, Irvine, se realizó una predicción de la estructura secundaria de Clusp88 la que fue comparada con la estructura de la proteína tipo USP de *Methanococcus jannaschii* Mj0577 (Zarembinski y col., 1998). Como resultado se determinó que la distribución de las hélices alfa y las cadenas beta de las USP eran similares en ambas especies (Figura 13).



**Figura 13. Alineación de diferentes proteínas USP y comparación de la estructura secundaria predicha para Clusp88 y Mj0577.**

Alineamiento múltiple de la deducida secuencia de aminoácidos de proteínas USP ó Proteínas tipo USP de *Arabidopsis thaliana* (AtUsp), *Brassica rapa* (BrUsp), *Oryza sativa* (OsUsp1), *Astragalus sinicus* (AsD243), *Vicia faba* (VfENOD18) y MJ0577 de *Methanococcus jannaschii*. Las barras de color indican los residuos orientados a la adenina (gris), al fosfato (celeste y rosado), a la ribosa de ATP (celeste) o están localizados en el dominio de dimerización (verde). En los colores azul y rojo se muestra la distribución predicha para las hélices alfa y cadenas beta de ClUsp88 y Mj05577.



### 3.4 Estudio de la expresión de los dos genes *usp* aislados de *Citrus limon* variedad Citrumelo.

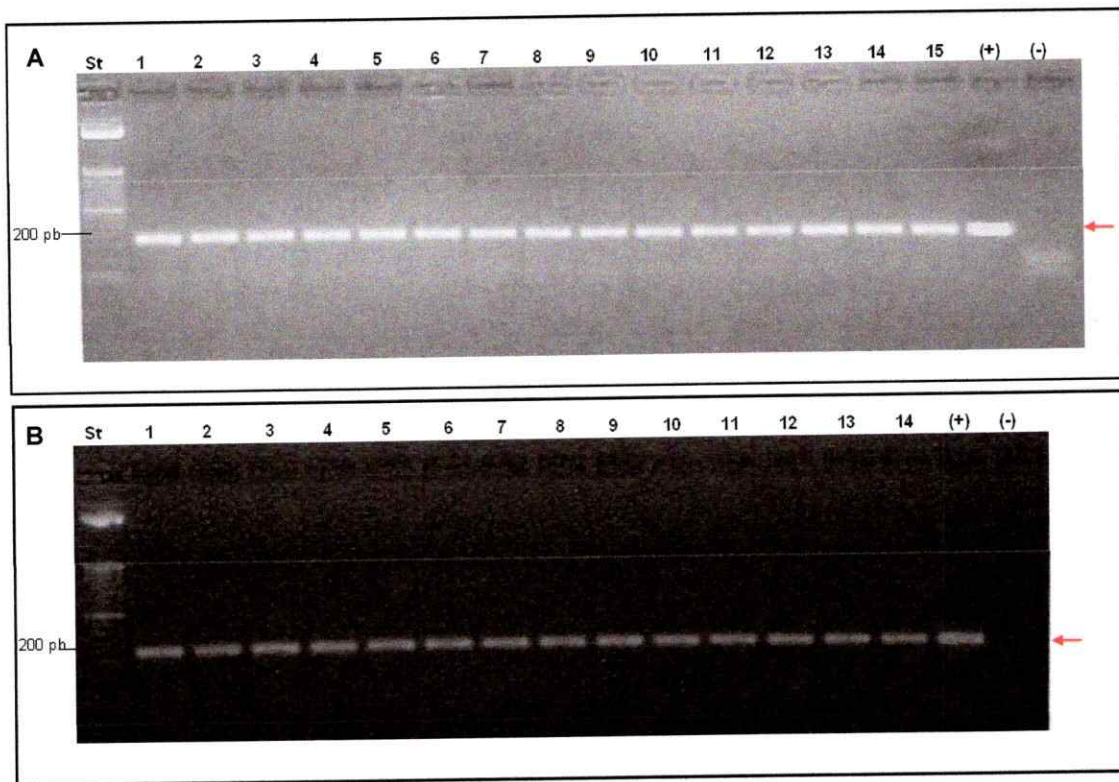
Una vez aislados los dos genes *usp*, fue interesante estudiar como se expresaban los transcritos de ambos genes (*Clusp88* y *Clusp89*) bajo condiciones control y de salinidad elevada. Para este objetivo se utilizó la técnica de RT-PCR como una forma semi cuantitativa de estudio de la expresión de los genes *Clusp*. Los experimentos fueron realizados con plantas de *Citrus limon*, portainjerto Citrumelo de aproximadamente diez meses de vida. Para esto, las raíces de las plantas fueron sumergidas en una solución 250 mM de NaCl durante 24 horas. Se extrajo ARN total de las plantas cada una hora durante 12 horas y luego a las 24 horas de cumplido el tratamiento. Además a una de las plantas después de haber estado 12 horas expuesta en la solución de 250 mM de NaCl se lavó su raíz para posteriormente colocar en una solución sin NaCl durante 12 horas más, periodo después del cual se extrajo ARN total de esta planta. Al mismo tiempo se colocaron como control, plantas de Citrumelo de 10 meses de vida en agua y se extrajo muestra en los mismos intervalos de tiempos. Estos experimentos fueron realizados en cámaras de cultivo *in vitro* con control de horas, luz y temperatura, (16 h luz /8 h oscuridad) (Figura 14). Cada uno de estos experimentos fue realizado en tres ocasiones con una población de plantas. El ARN total se analizó en geles de agarosa con lo cual se estableció una calidad adecuada y se cuantificó con el objeto de uniformar la cantidad de ARN total que se someta a RT-PCR. Para confirmar la calidad y presencia del ADN complementario en todos los tiempos, se realizó una amplificación con partidores específicos para el gen constitutivo de la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (*Nad5F* y *Nad5R*) (Menzel y col.,2002) (Tabla 1) (Figura 15).

Para diferenciar el gen *Clusp88* del gen *Clusp89* de Citrumelo, se diseñaron partidores específicos que permiten diferenciar ambos genes. Estos partidores fueron creados en regiones variables del 3'UTR de estos genes (SecUSPF88-R2 y SecUSPF89-R) y se utilizó el mismo partidore sentido (SecUSPF88-F) para ambos (Tabla 1) (Figura 16).

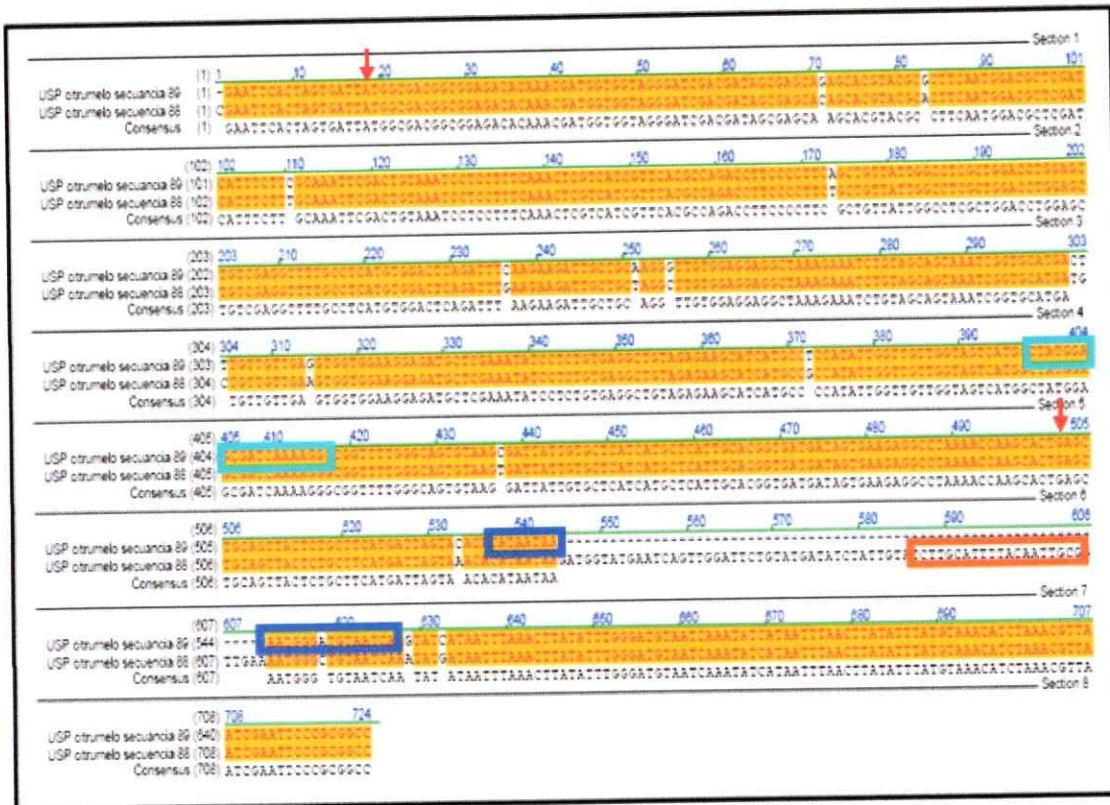
Con estos partidores se realizaron reacciones de amplificación (sección 2.16), utilizando 25 ciclos. El número de ciclos se estableció previamente por medio de una serie de reacciones de PCR variando el número de ciclos y dejando fija la cantidad inicial de ADN seleccionado hasta obtener una banda amplificada, que no presentara evidencia de saturación (Figura 17).



**Figura 14. Experimento controlando los parámetros de luz y temperatura.** Plantas de portainjerto Citrumelo en cámaras de cultivo *in vitro* que regulan las horas de luz (16h/8h) y temperatura (25°C).

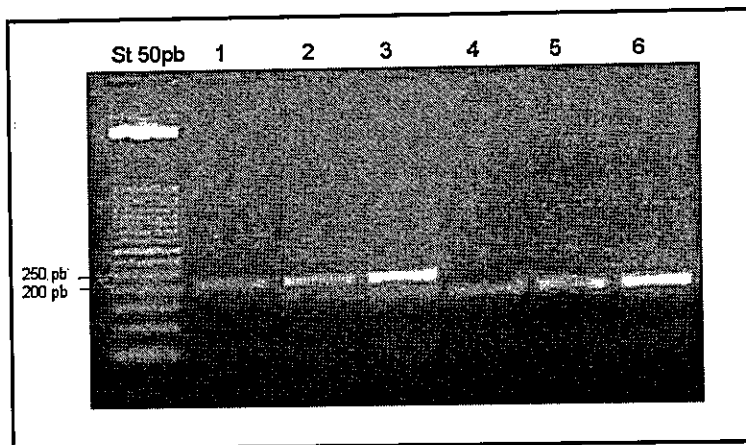


**Figura 15 Análisis electroforético del gen constitutivo NADH deshidrogenasa.**  
 RT-PCR con los partidores específicos Nad5F y Nad5R para el gen constitutivo de la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa. Este fue realizado a partir del ADNc de plantas sometidas a 250 mM de NaCl (A) y plantas control (B) en todos los tiempos. Donde los carriles 1 corresponden al tiempo 0 (7 am) en orden ascendente hasta el carril 14 que corresponde al de las 24 horas cumplidas de tratamiento. En A el carril 15 corresponde a la planta lavada de NaCl por 12 horas. Control (+) correspondiente a la banda de 185 pb amplificada con los partidores Nad5F y Nad5R a partir del gen *NADH deshidrogenasa subunidad 5* de Citrumelo aislado desde ADN complementario clonado en pGEM-T® Easy. Control (-) corresponde a la mezcla de PCR sin templado. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio. Utilizando un estandar de 50 pb.



**Figura 16. Diseño de partidores específicos para diferenciar las secuencia *Clusp* de Citrumelo.**

Se muestran alineadas las dos secuencias *Clusp* de citrumelo, en el esquema mostrado, a la secuencia más larga se le llama USP citrumelo 88 y la más corta USP citrumelo 89. Se diseña el mismo partidor sentido para ambas secuencias, SecUSPF88-F, señalado por el color celeste. Para el gen *usp* citrumelo 88 se creó un partidor antisentido en la región 3'UTR donde hay una inserción, SecUSPF88-R2, señalado por el color rojo. Para el gen *Clusp89* se creó un partidor flanqueando la región donde deberla haber una inserción, SecUSPF88-F, señalado por el color azul.



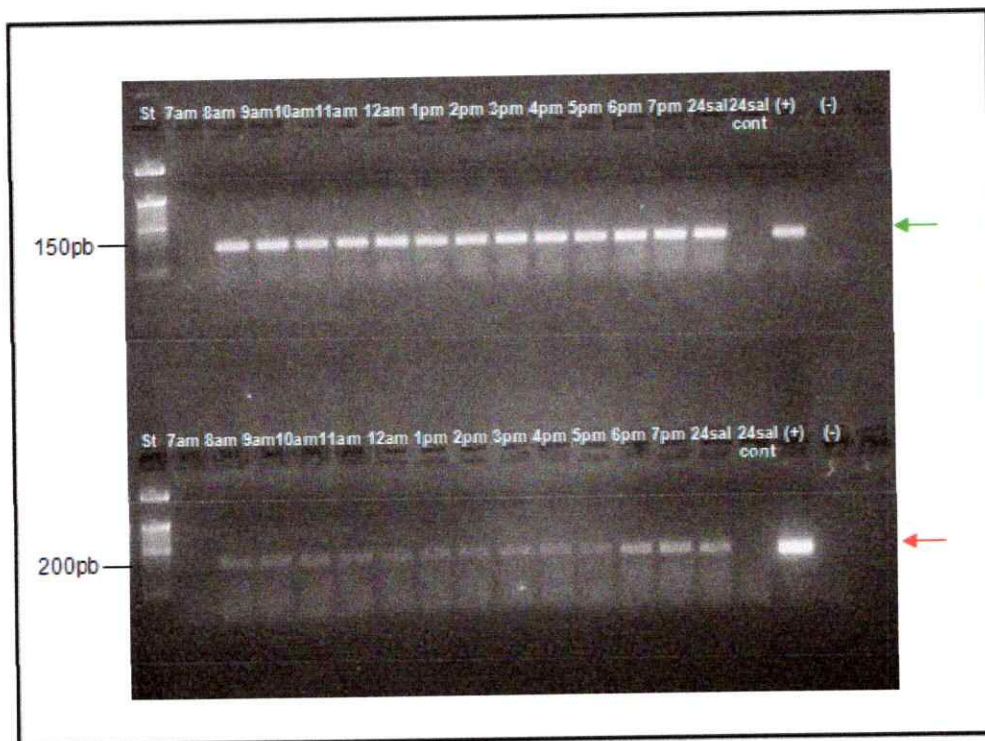
**Figura 17 Estandarización del número de ciclos del RT-PCR.**

RT-PCR del ADN complementario. Carriles 1 y 4 fueron amplificados a 25 ciclos, 2 y 5 a 30 ciclos y 3 y 6 a 35 ciclos. Carriles 1, 2 y 3 amplificados con los partidores SecUSPF88-F y SecUSPF88-R amplifican un fragmento de 208 pb. Y carriles 4, 5 y 6 amplificados con partidores SecUSPF88-F y SecUSPF89-R2 amplifican un fragmento de 162 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio utilizando standard de 50 pb.

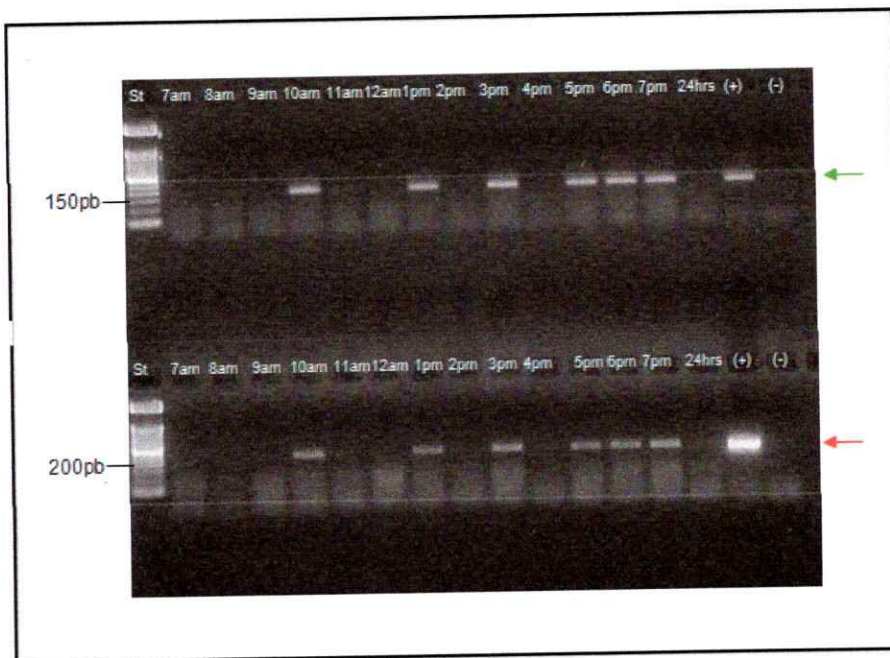
Los resultados obtenidos indican que las plantas sometidas a NaCl 250 mM presentan dos fragmentos, uno de 162 pb para *Clusp89* y uno de 208 pb para *Clusp88*. Esto establece que los dos genes *usp* de Citrumelo se expresan rápidamente (en 1 hora o menos) luego de ser sometida a estrés salino. También se observa que la expresión de estos genes perdura en el tiempo en plantas sometidas a estrés salino. Además, se observa la ausencia de expresión de estos genes a tiempo 0 (7 am) y también en la planta, que luego de 12 horas en tratamiento con NaCl, se reestableció a condiciones sin NaCl. Al mismo tiempo, se pudo observar que el gen *Clusp89* de Citrumelo (amplificado de 162 pb) se expresa con mayor intensidad que el gen *Clusp88* (amplificado de 208 pb) (Figura 18).

En el caso de las plantas control el resultado del PCR reveló que los dos genes *usp* de Citrumelo siempre se expresaban a las mismas horas del día en cada una de las tres repeticiones en que se realizó el mismo experimento observándose una

expresión continua de los transcritos de *Clusp* en las últimas horas de la tarde. Esta periodicidad diaria nos hace suponer que este comportamiento atípico podría estar regulado por algún ritmo interno o externo. (Figura 19).



**Figura 18. Análisis electroforético de la expresión del fragmento amplificado CIUsp de Citrumelo 88 y 89 en plantas de Citrumelo sometidas a 250 mM de NaCl.** RT-PCR del ADN complementario generado a partir de plantas de Citrumelo a diferentes tiempos en una solución de 250 mM de NaCl. Los carriles superiores corresponden a amplificados con los partidores SecUSPF88-F y SecUSPF89-R que amplifican un fragmento de 162 pb. Los carriles inferiores corresponden a amplificados con partidores SecUSPF88-F y SecUSPF88-R2 que amplifican un fragmento de 208 pb. El tiempo 0 corresponde a las 7 am y el carril 24 sal cont. corresponde a la planta lavada de NaCl por 12 horas. Control (+) correspondiente a la banda amplificada con los partidores respectivos para cada uno de los genes *Clusp* de Citrumelo aislado desde ADN complementario clonado en pGEM-T® Easy. Control (-) corresponde a la mezcla de PCR sin templado. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio. Utilizando marcador de peso molecular de 50 pb



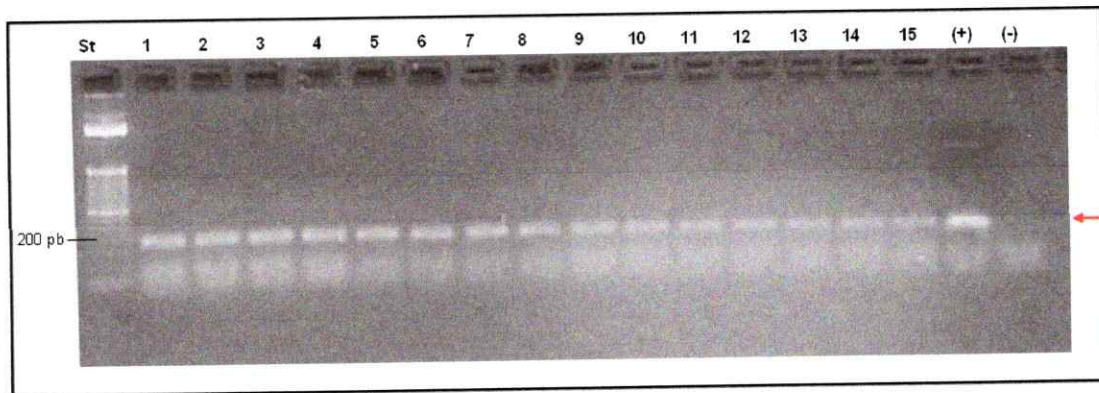
**Figura 19. Análisis electroforético de la expresión del fragmento amplificado *ClUsp* de Citrumelo 88 y 89 en plantas control.**

RT-PCR del ADN complementario generado a partir de plantas control de Citrumelo medidas a diferentes tiempos. Los carriles superiores amplificados con los partidores SecUSPF88-F y SecUSPF89-R que amplifican un fragmento de 162 pb. Los carriles inferiores son amplificados con partidores SecUSPF88-F y SecUSPF88-R2 que amplifican un fragmento de 208 pb. Control (+) correspondiente a la banda amplificada con los partidores respectivos para cada uno de los carriles a partir del gen *Clusp* de Citrumelo aislado desde ADN complementario clonado en pGEM-T® Easy. Control (-) corresponde a la mezcla de PCR sin templado. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio. Utilizando marcador de peso molecular de 50 pb.

Con el objeto de establecer si el efecto que produce la sal en los portainjertos de Citrumelo corresponde a un estrés iónico y no a un estrés osmótico, se realizó un experimento con manitol. Para esto, se sometieron plántulas a 400 mM de manitol durante 24 horas, recolectándose muestras cada hora durante 12 horas y a las 24 horas de tratamiento. Para confirmar la presencia y calidad del ADN complementario en todos los tiempos, se realizó una amplificación con partidores específicos para el gen constitutivo de la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (Nad5F y Nad5R) Tabla 1) (Figura 20).

Los resultados observados en el tratamiento con manitol (Figura 21) difieren a los obtenidos con NaCl, ya que los amplificadores del gen *usp* de Citrumelo se expresaron a diferentes horas del día y no de forma continua como fue el caso de las plantas sometidas a 250 mM de NaCl,. Esto sugiere que ambos compuestos estarían produciendo diferentes efectos en la planta: NaCl estaría produciendo un estrés iónico, a diferencia del manitol que estaría provocando un estrés exclusivamente osmótico . Los resultados observados con el tratamiento con manitol se asemejan a los obtenidos con las plantas control. La mayor diferencia se observa en que los transcritos de *Clusp* en el caso de manitol se expresan, en la mayoría de los casos, en desfase que las plantas control, suceso que podría ser provocado por el efecto osmótico del manitol.

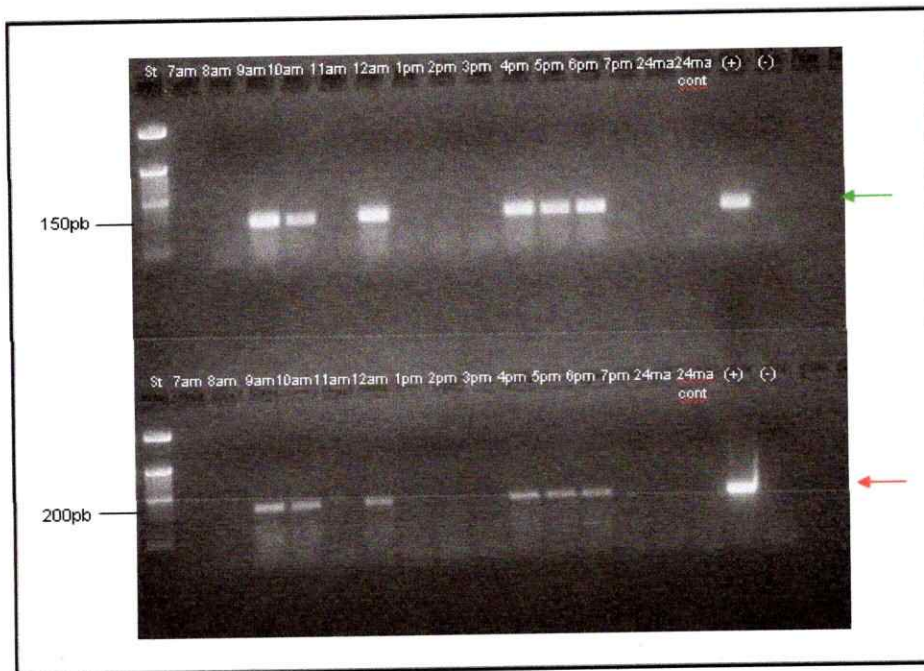
Además se observa que en todos los tratamientos (Figuras 18 y 21), el gen *Clusp89* (162 pb) se expresa con mayor intensidad que *Clusp88* (208 pb).



**Figura 20. Análisis electroforético del gen constitutivo NADH deshidrogenasa.**

RT-PCR con los partidores Nad5F y Nad5R para el gen constitutivo de la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa. Este fue realizado a partir del ADNc de plantas sometidas a 400 mM de Manitol en todos los tiempos. Donde el carril 1 corresponde al tiempo 0 (7 am) en orden ascendente hasta el carril 14 que corresponde a las 24 horas cumplidas de tratamiento y el carril 15 corresponde a la planta lavada de manitol por 12 horas. Control (+) correspondiente a la banda de 185 pb amplificada con los partidores Nad5F y Nad5R a partir del gen NADH deshidrogenasa subunidad 5 de Citrumelo aislado desde ADNc clonado en pGEM-T® Easy. Control (-) corresponde a la mezcla de PCR sin templado. Gel de agarosa al 2% y marcador de peso molecular utilizado de 50 pb.





**Figura 21. Análisis electroforético de la expresión del fragmento amplificado *usp* de Citrumelo 88 y 89 en plantas de Citrumelo sometidas a 400 mM de manitol.**

RT-PCR del ADNc generado a partir de plantas de Citrumelo a diferentes tiempos en una solución 400 mM de manitol. Los carriles superiores fueron amplificados con los partidores SecUSPF88-F y SecUSPF89-R que amplifican un fragmento de 162 pb. Los carriles inferiores corresponden a amplificados con partidores SecUSPF88-F y SecUSPF88-R2 que amplifican un fragmento de 208 pb. Control (+) correspondiente a fragmento amplificado con los partidores respectivos para cada uno de los carriles a partir del gen *Clusp* de Citrumelo aislado desde ADNc clonado en pGEM-T® Easy. Control (-) corresponde a la mezcla de PCR sin templado. Gel de agarosa al 2% en. Utilizando marcador de peso molecular de 50 pb.

En resumen se puede concluir que la expresión del gen *usp* en *Citrus limon* (portainjerto Citrumelo) es rápida y continua a través del tiempo cuando la planta es sometida a estrés salino y sugerir que el estrés causado por NaCl es un estrés iónico diferente al estrés exclusivamente osmótico producido por manitol. Además, el patrón de expresión en plantas control sugiere que la expresión atípica de estos genes podría estar regulada por un factor externo de la planta. Además, los experimentos de expresión indican que uno de los genes *usp* del portainjerto Citrumelo se expresa con mayor intensidad que el otro.

#### 4 DISCUSION

Esta tesis propuso aislar y caracterizar un gen de cítricos involucrado en la respuesta a estrés abiótico utilizando técnicas de biología molecular.

Inicialmente se intentó aislar el gen CBF utilizando técnicas tales como PCR directo, "PCR Boosted" utilizando partidores degenerados y modificando gradualmente la temperatura de hibridación a lo largo del progreso de la PCR, también se realizó un Southern Blot, entre otras técnicas utilizadas. Estos trabajos terminaron con resultados negativos ya que no se pudo obtener el gen CBF en forma completa.

Ante la falta de éxito con las técnicas ya nombradas se decidió la construcción de una biblioteca de ADNc como alternativa posible para encontrar el gen buscado.

Esta biblioteca de ADNc se construyó a partir de ARN de *Citrus limon* (injerto "FINO 49"). Para su construcción se utilizaron plantas de aproximadamente tres años de edad sometidos a estrés por frío, un tipo de estrés abiótico más simple de abordar. En *Arabidopsis thaliana* se ha demostrado que los genes *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* se inducen rápidamente en tratamientos a bajas temperaturas y que además poseen un alto nivel de similitud entre sus secuencias (Gilmour y col., 1998; Medina y col., 1999; Haake y col., 2002) (Sección 1.4.1) Es por esto que pensamos que en nuestra biblioteca de ADNc podríamos encontrar uno o más genes CBF ya que más de uno podría haberse inducido en respuesta a este tratamiento. También el parecido en sus secuencias nos podría haber facilitado la posterior búsqueda de algún otro gen CBF de *Citrus limon*.

El rastreo de la biblioteca de ADNc no reveló ningún clon que correspondiera efectivamente al gen *CBF*. Este resultado inesperado nos lleva a pensar que la amplificación del gen *CBF* de *Citrus limon* (según lo descrito en especies como *Arabidopsis* y maíz) el gen *CBF* existe en copia única dentro del genoma

(Stockinger y col., 1997; Qin y col., 2004) y que la correspondiente baja representatividad de este gen en la biblioteca pudo haber dificultado su detección. La biblioteca se amplificó a un título de  $5,7 \times 10^7$  ufp/mL, almacenándose en aproximadamente 250 tubos Eppendorf de 1,5 mL. Se ocupó una alícuota de 1  $\mu$ L de uno de los tubos para hacer el rastreo de la biblioteca (sección 2.22.6). Existe la probabilidad que el gen *CBF* no estuviese presente en esa alícuota y que pudiera ser detectado en un siguiente rastreo.

El tiempo de exposición a frío de nuestra planta fue elegido de acuerdo con lo descrito en la literatura para otras especies tales como raps, trigo y arroz (Jaglo y col., 2001) donde los transcritos de genes *CBF* se acumulan dentro de los primeros 15-30 minutos de exposición al frío. En otras especies como en tomate (Zhang y col., 2004) y cebada (Choi y col. 2002) los transcritos de genes *CBF* se comienzan a acumular a los 15 minutos de exposición al frío con un punto máximo de expresión a las 2 horas de tratamiento. Es posible que para inducir los genes *CBF* en *Citrus limon* haya sido necesario un mayor tiempo de exposición a este tipo de estrés.

Otra explicación estaría relacionada con el estudio realizado en la Universidad de Florida, donde fueron comparadas las expresiones de inducción por frío del gen *CBF* de la especie *Poncirus trifoliata*, un cítrico altamente tolerante a bajas temperaturas (capaz de sobrevivir hasta los  $-20^{\circ}\text{C}$ ), con *Citrus paradisi*, sensible al frío como la mayoría de las otras especies de cítricos. Éste dio como resultado que en *Poncirus trifoliata* el *CBF* se acumulaba antes y a mayores niveles que en *Citrus paradisi*. La evidencia mostró una correlación entre la expresión de *CBF* (tiempo y cantidad) y el grado de tolerancia al frío entre las dos especies estudiadas (Champ, 2007). Podría ser, entonces, que para inducir los genes *CBF* de *Citrus limon* se

necesiten temperaturas mucho más bajas que las utilizadas y como se dijo anteriormente, un mayor tiempo de exposición al frío.

El paso siguiente en la estrategia de este trabajo fue intentar obtener la secuencia entre el sitio AP2 y el extremo 3' terminal del *CBF* utilizando la información nucleotídica disponible del sitio AP2 y usando el método 3'RACE. En las diferentes oportunidades que se realizó este experimento, modificando los parámetros del PCR, no se logró amplificar el gen *CBF* de *Citrus limón*. Un análisis posterior reveló que el partidor 5' que se utilizó para el RACE diseñado en el dominio AP2, denominado CLCBFF1 (Tabla 1, sección 2.15) poseía 12 bases correspondientes con secuencias similares a *usp*. A diferencia de los genes *CBF* en plantas (Stockinger y col., 1997; Qin y col., 2004), los genes *usp* en bacteria pueden presentarse en varias copias dentro de su genoma (Kvint y col, 2003). Debido a esta diferencia de número se podría explicar que el partidor haya encontrado con mayor facilidad secuencias correspondientes a *usp* en el genoma, favoreciendo su amplificación.

Debido a la existencia de varios estudios (Nystrom & Neidhart 1992, 1993, 1994 y 1996) que indican que *usp* modula la sobrevivencia de células sometidas a diferentes tipos de estrés, como el osmótico, salino, el causado por luz ultra violeta y la falta de oxígeno, fue de interés proseguir los estudios con el gen *usp*.

El gen *usp* amplificado por 3'RACE fue aislado desde un injerto variedad FINO 49 de *Citrus limon*. Sin embargo, para alcanzar en mejor forma el objetivo de esta tesis se consideró necesario acotar el estudio al portainjerto de la planta ya que éste es el órgano que interactúa con el suelo salino. Para ello se utilizaron los portainjertos *Citrus macrophylla* y Citrumelo. Del portainjerto variedad Citrumelo se lograron aislar dos genes *usp* de diferente longitud (*Clusp88* y *Clusp89*). Esta diferencia en tamaño se debe a una diferencia en la longitud del 3'UTR. La región codificante de los genes

*Clusp88* y *Clusp89* de Citrumelo predicen una proteína de 162 aminoácidos (USP). Estas proteínas difieren solo en 5 aminoácidos.

Ahora bien, un organismo puede estar equipado con varias copias y tipos diferentes de genes *usp* (sección 1.4.2), cumpliendo diferentes funciones dentro de la misma especie (genes parálogos). Estos genes también podrían compensar la falta del otro, funcionando como tal; como en *E. coli* que tiene seis tipos de genes *usp* (*uspA*, *C*, *D*, *E*, *F* y *G*) (Kvint y col., 2003). Esta evidencia sumada a la diferencia en la expresión que presentan los dos genes *usp* (Figuras 18 y 21) nos podría sugerir que se trataría de genes parálogos. Sin embargo, cabe también la posibilidad de que se trate de genes alelos. Estos pueden diferenciarse en su secuencia lo que puede manifestarse en modificaciones concretas de la función de ese gen. . Para determinar si estos dos genes son parálogos o alelos se podría realizar un Southern Blot en el cual se haría un análisis con enzimas de restricción seguido de una hibridación confirmando que se trataría de genes alelos si el patrón de corte no varía.

Como fue descrito en la sección 1.4.2, *Methanococcus jannaschii* posee una clase de proteína USP (Mj0577) con un dominio de unión a ATP a diferencia de *Haemophilus influenzae* y *Escherichia coli* cuyos USP no poseen sitios de unión a ATP. Las proteínas USP de plantas son más cercanas al grupo de *M. jannaschii* MJ0577 ya que provienen de un ancestro en común (Kerk y col., 2003). La comparación de todas las secuencias aminoacídicas completas de USP de plantas más la secuencia MJ0577, reveló que la región de unión a ATP es altamente conservada entre estas especies. En base a esto, ya que CIUsp posee esta región conservada al igual que las otras proteínas USP de plantas, CIUsp podría poseer la función de unir ATP pero esta función todavía no ha sido comprobada

experimentalmente. No obstante, existe la posibilidad que mediante un ensayo de hidrólisis de ATP como el realizado en el caso de MJ0577 (Zarembinski y col., 1998) esta función podría ser demostrada. En este trabajo incubaron MJ0577 con extractos celulares de *M. jannaschi* induciendo hidrólisis de ATP, ya que éste unido a MJ0577 no se hidrolizaba solo durante la purificación, lo que sugirió que la proteína funcionaba como un factor dependiente de ATPasa.

En el análisis computacional de la estructura secundaria de CIUsp se comparó esta última con la descrita de *M. jannaschii* (Mj0577) (Zarembinski y col., 1998). La distribución de las alfa hélices y las cadenas beta son muy similares a las descritas para *M. jannaschii* (Mj0577). Este parecido estructural podría apoyar la teoría de una relación funcional entre las dos proteínas. Una estructura secundaria similar fue precedida para OsUsp1 y VfENOD18 (Sauter y col., 2002; Becker y col., 2001) lo que respalda con mayor fuerza que estas proteínas unen ATP.

Los estudios de expresión realizados a *Clusp88* y *Clusp89* mostraron que estos transcritos se sintetizan rápidamente al ser sometida la planta a estrés salino, manteniendo una expresión continua a través del tiempo (Figura 18). Cuando se retornó la planta de un medio salino, a un medio control por 12 horas, no hubo expresión de *usp*, por lo que se sugiere que NaCl induce la expresión del gen. Aun cuando no existen antecedentes en plantas que relacionen este gen con tolerancia a estrés salino, se han realizado experimentos con otros tipos de estrés. Hay estudios en plantas de arroz (Sauter y col., 2002) donde se observó que la hipoxia induce la expresión del gen *OsUsp1* rápidamente al ser sumergidas las plantas, donde los

transcritos se expresan después de 40 min de tratamiento, aunque su expresión no es continua en el tiempo como en el caso del tratamiento con sal.

Pudimos observar un comportamiento atípico en los sucesivos RT-PCR realizados con ARN de plantas control que los transcritos de *Clusp88* y *Clusp89* se expresaban siempre a las mismas horas del día (10 a.m., 1 p.m. y 3 p.m.). Así mismo se pudo observar que siempre había una expresión continua de los transcritos en las últimas horas de la tarde (5, 6 y 7 p.m.) (Figura 19). No deja de ser inquietante e interesante un proceso cuya periodicidad diaria nos hace pensar que nos encontramos ante una clase de ritmo interno o externo de la planta cuya causa aún desconocemos.

Al comparar, entonces, el comportamiento de las plantas control con las plantas sometidas a estrés por NaCl, se observa en estas últimas una expresión continua de los genes *Clusp* a lo largo del tiempo. En oposición, las plantas control expresan el gen solo en horas determinadas. Esto nos hace suponer que estas plantas al verse sometidas al exceso de salinidad ponen en marcha un mecanismo de defensa que estimula la producción de *usp* el cual otorgará la resistencia necesaria a NaCl.

Con el fin de distinguir si el estrés causado por la planta producía un efecto osmótico o iónico, se sometieron los portainjertos de citrómelo a tratamientos con manitol, ya que éste causa una situación de estrés osmótico carente de componente iónico. Como es sabido la acumulación de manitol disminuye el potencial hídrico en el medio, dificultando la captación de agua por las raíces de la planta. Considerando que la planta no incorpora el manitol disuelto en el medio, se anula la toxicidad intrínseca asociada a este compuesto. Con los resultados obtenidos por el RT-PCR de las plantas sometidas a manitol pudimos observar que los patrones de expresión de los transcritos de *Clusp* que se generaron eran completamente diferentes a los transcritos

generados por las plantas sometidas a 250 mM de NaCl (Figura 18 y 21). Esto nos llevó a sugerir que los efectos que causan manitol y el NaCl a la planta son diferentes debido a que el manitol solo estaría causando un efecto osmótico, sin embargo, el NaCl estaría provocándole un efecto iónico a ésta.

Al comparar los transcritos de *Clusp* de manitol con los de las plantas control, se observó que se mantenían los rangos de expresión; sin embargo, se producían aproximadamente una hora antes que en las plantas control. Al analizar este fenómeno inesperado se dedujo que el efecto osmótico, ocasionado por el manitol, actuaba como un estímulo exógeno el cual podría estar modificando el comportamiento de la planta para adaptarse a sus necesidades

En los experimentos de expresión se observó diferencia en la intensidad de bandas (Figuras 18 y 21) donde el gen *Clusp89* se expresaba siempre con mayor intensidad que el gen *Clusp88*. Como se planteó anteriormente, la diferencia en la intensidad de las bandas podría ser explicada si se tratara de dos genes parálogos, puesto que cumplirían diferente función en la misma especie y por lo tanto en este caso su acumulación bajo diferentes condiciones de estrés sería diferente. Puede que el gen *Clusp89* se acumule en respuesta a la sal pero hipotéticamente su parólogo *Clusp88* no funcione apropiadamente en respuesta a este compuesto y no se acumule con igual intensidad que su parólogo.



## 5 CONCLUSIONES

1. Se construyó una biblioteca de ADN complementario de hojas de *Citrus limon* sometidas a frío. Esta puede ser utilizada en el futuro como una fuente para el aislamiento de otros genes de estrés abiótico.
2. Se aisló el gen *usp* desde dos tipos de portainjertos: *Citrus macrophylla*, desde donde se aisló un solo gen *usp* y desde el portainjerto Citrumelo, desde donde se pudo aislar dos genes *usp* de diferente tamaño. También se aisló un gen *usp* desde un tipo de injerto "FINO 49", con el propósito de establecer su nivel de homología. Se estableció que estas secuencias poseen una elevada identidad entre ellas.
3. Se estableció que bajo condiciones de estrés salino los genes *Clusp88* y *89* se expresan rápida y continuamente en el tiempo, comprobándose también que el estrés causado por exceso de NaCl a la planta es un estrés iónico.
4. Los resultados permiten sugerir que el gen *Clusp* de Citrumelo, en las plantas control, muestran un comportamiento atípico sujeto a una periodicidad diaria sugerente a un ritmo interno o externo.

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker SS., Wilhelm KS., Thomashow MF. (1994) The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant. Mol. Biol.* 24:701-13.
- Becker JD, Moreira LM, Kapp D, Frosch SC, Pühler A, Perlick AM. 2001. The nodulin VnENOD18 is an ATP-binding protein in infected cells of *Vicia faba* L. nodules. *Plant Mol. Biol.* 47: 749-759.
- Boman, B., Stover, E. (2002). Managing Salinity in Florida *Citrus*. Document No AE171 and Circular 1411.
- Bray E. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2:48
- Champ K., Febres VJ., Moore GA. (2007). The role of CBF transcriptional activators in two *Citrus* species (*Poncirus* and *Citrus*) with contrasting levels of freezing tolerance *Physiol. Plant.* 129: 529 -541.
- Chang S., Puryear, J, Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pines trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.
- Chou M-X., Wei X-Y., Chen D-S., Zhou J-C. (2006). A novel nodule-enhanced gene encoding a putative universal stress protein from *Astragalus sinicus*. *J. Plant Physiol.* 164:6764-772
- Choi DW., Rodriguez EM., Close TJ., (2002). Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location. *Plant. Physiol.* 129: 1781-1787.
- Fowler S, Thomashow M.F. (2002). *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold-response pathway. *Plant Cell* 14: 1675-1690.
- Frohman M, Dush M., Martin G. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002.
- Gamboa MC, Rasmussen-Poblete S, Valenzuela PD, Krauskopf E. (2007). Isolation and characterization of a cDNA encoding a CBF transcription factor from *E. globulus*. *Plant. Physiol. Biochem.* 45:1-5.
- Ghassemi, F, Jakeman AJ, Nix HA (1995). Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management an case studies. Canberra, Australia: The Australian National University, Wallingford, Oxon, UK: CAB International.
- Gilmour SJ., Zarka DG., Stockinger EJ., Salazar MP., Houghton JM, Thomashow MF. (1998) Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J.* 16: 433-42.

Haake V., Cook D., Riechmann JL, Pineda O., Thomashow MF., Zhang J. (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 639-648.

Hohnjec N., Kuster H., Albus U., Frosch SC., Becker JD., Puhler A., Perlick AM., Fruhling M. (2000). The broad bean nodulin VnENOD18 is a member of a novel family of plant proteins with homologies to the bacterial MJ0577 superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 264:241-250.

Hsieh TH., Lee J., Chang Y., Chan MT. (2002). Tomato Plants Ectopically Expressing *Arabidopsis* CBF1 Show Enhanced Resistance to Water Deficit Stress *Plant Physiol.* 130:618-626.

Huang B, Jin L, Liu J. (2007) Molecular cloning and functional characterization of a DREB1/CBF-like gene (GhDREB1L) from cotton. *Sci China C Life Sci.* 50(1):7-14.

Ingram J, Bartels D (1996). The molecular basis for dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377-403.

Inoue H, Nojima H. and Okayama H. (1991). High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene* 30: 96: 23-28

Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, Thomashow MF. (2001). Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.* 127: 910-917.

Jaglo-Ottosen K.R, Gilmour SJ, Zarka Dg, Schabenberger O, Thomashow MF (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106.

Kasuga M, Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.* 17: 287-291.

Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant. Cell. Physiol* 45(3):346-350.

Kerk D., Bulgrien J, Smith DW., Gribskov M. (2003). *Arabidopsis* Proteins Containing Similarity to the Universal Stress Protein Domain of Bacteria. *Plant Physiol.* 131:1209-1219.

Kreps JA., Wu YJ., Chang HS., Zhu T., Wang X., Harper JF. (2002). Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 130: 2129-2141.

Kvint K., Nachin L., Diez A., Nyström T. (2003). The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:140-145

Lichtentaler HK. (1995). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Plant Mol. Biol.* 49:199-222.

Liu Q, Zhao N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000). Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. *Chinese Science Bulletin* 45: 11.

Maas, E.V. (1993) Salinity and citriculture. *Tree Physiol.* 12 (2): 195-216.

Medina J, Bagues M, Terol J, Perez-Alonso M, Salinas J (1999). The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.* 119:463-70.

Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J Virol Methods.* 99:81-92

Mittler R., Zilinskas BA. (1994) Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J.* 5:397-405.

Nachin L., Nannmark U, Nyström T. (2005). Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J. Bacteriol.* 187:6265-6272.

Niu, X.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. y Pardo, J.M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 109: 735-742.

Nystrom T, Neidhardt FC. (1993). Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* with an insertional inactivation of the *uspA* gene, which encodes a universal stress protein. *J. Bacteriol.* 175:3949-3956.

Nystrom T, Neidhardt FC. (1992). Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6:3187-3198.

Nystrom T, Neidhart FC. (1994). Expression and role of the universal stress protein, *UspA*, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol. Microbiol.* 11:537-544.

Nyström T, Neidhart FC. (1996). Effects of overproducing the universal stress protein, *UspA*, in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 178:927-930.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2005). Mercado de los frutos cítricos 2004. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile, Santiago de Chile. ([www.odepa.gob.cl](http://www.odepa.gob.cl)).

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2006). Mercado externo de las paltas y los frutos cítricos. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile, Santiago de Chile. ([www.odepa.gob.cl](http://www.odepa.gob.cl)).

Puebla AF, Del Viso F. (2004). Capítulo 12: "Tolerancia a Factores Abióticos" (355-365) en "Biotecnología y Mejoramiento Vegetal"- Editores: Dra. V. Echenique, Dra. C. Rubinstein e Ing.Agr. L. Mroginski, Buenos Aires, Ediciones INTA p 446.

Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li YQ, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.* 45:1042-1052.

Riechman J, Meyerowitz E. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factor. *J. Biol. Chem.* 379: 633-646

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition.

Sauter M., Rzewuski G., Marwedel T., Lorbiecke R. (2002). The novel ethylene-regulated gene *OsUsp1* from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *J. Exp. Bot.* 53:2325-2331.

Seki M, Satou M, Sakurai T, Akiyama K, Lida K, Ishida J, y col. (2004). RIKEN *Arabidopsis* full-length (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.* 55:213-223.

Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 194-199.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 161.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997). Gene expressing and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115:327

Sousa MC, McKay DB. (2001). Structure of the universal stress protein of *Haemophilus influenzae*. *Structure* 9:1135-1141.

Stange, C., Prehn, D., Arce-Johnson, P. 1998. Isolation of *Pinus radiata* genomic DNA suitable for RAPD analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:1-8.

Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat / DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1035-1040

Tadeo, FR (2000). Fisiología de las plantas y el estrés. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Vieto J y Talón M (Eds.), pp 481-498. Interamericana/McGraw-Hill. ISBN.

Taiz L., Zeiger E. (2002). Plant Physiology (3rd. ed.).Chapter 25: Stress Physiology. Sinauer, New York, NY .pp: 591-623.

Wang W; Vinocur B; Altman A (2003) Plant responses to droght, salinity and extreme temperatures; towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14

Xiong L, Zhu JK. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant. Cell and Environ.* 25:131-139.

Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 781-803.

Zhang X, Fowler SG, Cheng H, Lou Y, Rhee SY, Stockinger EJ, Thomashow MF. (2004) Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant J.* 39: 905-919.

Zarembinski TI, Hung L-W, MuÈller-Dieckmann H-J, Kim K-K, Yokota H, Kim R, Kim S-H. (1998). Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test of structural genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15189±15193.

Zegzouti H., Jones B., Frasse P., Marty C., Maitre B., Latché A., Pech J-C., Bouzayen M. (1999). Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *Plant J.* 18, 589-600.

Zhu JK. (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:66-71