

UCH-FC

Biotecnología

P222

c.1



Universidad de Chile
Escuela de Pregrado
Departamento de Biología



“Análisis del patrón de expresión de *AtSDL*, una posible sorbitol deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*”

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

Nombre del candidato
ROBERTO ANDRÉS PARADA SALAZAR

Dr. Michael Handford
Director del Seminario de Título

Dra. Lorena Norambuena
Co-directora del Seminario de Título

Octubre de 2011
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **SR. ROBERTO ANDRÉS PARADA SALAZAR**.
“Análisis del patrón de expresión de AtSDL, una posible sorbitol deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*” ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Michael Handford
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Michael Handford.

Dra. Lorena Norambuena Morales
Co-Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Lorena Norambuena Morales.
Sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, U. de Chile.

Comisión de Evaluación

Dr. Francisco Pérez Correa
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Francisco Pérez Correa.

Dra. Manuel Paneque Corrales
Corrector

Firma manuscrita en azul de Manuel Paneque Corrales.

Santiago de Chile, octubre de 2011

Biografía



Nací un 3 de junio del año 1986 en la comuna de Providencia, pero he vivido toda mi vida en Puente Alto. Mi niñez yo diría que fue la típica de un niño de ese tiempo, pasando gran parte del día en la calle jugando con mis amigos. La verdad es que no sé bien en qué momento me empezó a interesar la biología, recuerdo que cuando era niño quise ser cura (jajajaj), y luego durante gran parte de mi adolescencia quise estudiar algo relacionado con las matemáticas... Supongo que fue como en tercero medio que me empezó a interesar la biología y la ciencia, cuando ingresé al preuniversitario, a pesar de que ese año me fue bastante mal y por estrés tuve que dejar de ir antes de que terminase el año escolar. Recuerdo con mucho cariño a mi profesor de biología del preu en los ambos años que estuve, Sergio Hanus, creo que gracias a él empecé a encontrarle el gusto a la ciencia y en particular la biología, ya que en mi colegio era poco lo que nos motivaban.

Hoy está a punto de finalizar la etapa más importante de mi vida hasta el momento. Han sido 6 años llenos de experiencias, muchas personas conocidas, muchas cosas vividas. Me quedo con lo bueno que me dejó el paso por la Universidad de Chile, en la que seguiré al menos por un par de años haciendo un magíster. Espero seguir creciendo como persona en lo que me deparan los años por venir, estoy conforme con las decisiones que he ido tomando con el pasar de los años y ojalá que eso no cambie nunca.

Agradecimientos

Primero que todo quisiera agradecer a la gente que me acompañó y alentó durante el transcurso de este seminario de título: a mi familia y amigos que siempre me dieron impulsos y buenas vibras para salir adelante.

También quiero agradecer a todo el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal en general, por hacer del laboratorio un lugar muy agradable para trabajar, y en especial a mi tutor, el Doctor Michael Handford, por todo el apoyo y ayuda entregados, y al Doctor Alexander Vergara, quien me proporcionó su ayuda y conocimientos bioinformáticos para el desarrollo de una parte muy importante de mi trabajo. Además quisiera agradecer de manera especial a ciertos compañeros que me dieron muchos consejos y enseñaron muchas cosas durante este tiempo, gracias a ellos aprendí mucho: Diego Ampuero, Carlos Flores, Matías Freire y Lorena Pizarro. Estoy verdaderamente agradecido de la buena disposición que siempre tuvieron conmigo y gracias por todas las veces que me ayudaron.

Índice de contenidos



Biografía.....	i
Agradecimientos.....	ii
Índice de contenidos.....	iii
Índice de figuras.....	vii
Índice de tablas.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiv
1 Introducción.....	1
1.1 Polioles en plantas superiores.....	1
1.2 Funciones de los polioles en plantas.....	2
1.3 Sorbitol deshidrogenasas.....	4
1.4 Sorbitol deshidrogenasa en <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
2 Objetivos generales y específicos.....	12
2.1 Objetivo general:.....	12
2.2 Objetivos específicos:.....	12
3 Materiales y métodos.....	13

3.1	Reactivos.....	13
3.2	Esterilización y estratificación de semillas.....	14
3.3	Condiciones de cultivo de las plantas.....	14
3.4	Transformación estable y análisis de <i>Arabidopsis</i>	15
3.4.1	Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i>	16
3.4.2	Verificación molecular de las líneas transformantes por PCR.....	16
3.4.3	PCR del gen <i>GAPA</i>	17
3.5	Ensayo histoquímico GUS.....	17
3.6	Extracción de ADN plasmidial de <i>Escherichia coli</i>	18
3.6.1	Secuenciación del plasmidio pGEM-T promAtSDL.....	19
3.7	Búsqueda de elementos regulatorios en el promotor del gen <i>AtSDL</i> mediante herramientas bioinformáticas.....	19
3.8	Análisis <i>in silico</i> de la expresión de <i>AtSDL</i>	20
3.9	Tratamiento de oscuridad en <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
3.9.1	Extracción de proteínas.....	21
3.9.2	Ensayo de actividad enzimática GUS.....	21
3.10	Visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	22
3.11	Análisis estadístico.....	22
4	Resultados.....	23

4.1	Obtención de múltiples líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas con el vector pCAMBIA promAtSDL-GUS.	23
4.2	Análisis preliminares del patrón de expresión de <i>AtSDL</i> mediante tinción GUS. 26	
4.3	Análisis del patrón de expresión de <i>AtSDL</i> mediante tinción GUS y herramientas bioinformáticas.	31
4.4	Búsqueda de elementos regulatorios en el promotor putativo de <i>AtSDL</i> mediante herramientas bioinformáticas.	35
4.5	Evaluación de la expresión de <i>AtSDL</i> bajo estímulo lumínico.	40
5	Discusión	46
5.1	Obtención de líneas transformantes de <i>Arabidopsis</i> con el inserto promAtSDL::GUS	46
5.2	Determinación del patrón de expresión de <i>AtSDL</i>	48
5.3	Análisis del patrón de expresión de <i>AtSDL</i>	51
5.4	Determinación de la actividad GUS bajo condiciones de oscuridad.....	55
5.5	Análisis de la sobre-representación de distintos elementos en el promotor putativo de <i>AtSDL</i>	56
5.6	Consideraciones finales.....	58
6	Conclusiones.....	60
7	Proyecciones.....	62

8	Presentaciones.....	63
9	Referencias	64
10	Anexo	73

Índice de figuras

Figura 1	2
Figura 2	6
Figura 3	8
Figura 4	10
Figura 5	11
Figura 6	24
Figura 7	25
Figura 8	28
Figura 9	29
Figura 10	29
Figura 11	29
Figura 12	29
Figura 13	29
Figura 14	29
Figura 15	30
Figura 16	30
Figura 17	30
Figura 18	30
Figura 19	30
Figura 20	31
Figura 21	32

Figura 22	32
Figura 23	33
Figura 24	33
Figura 25	37
Figura 26	42
Figura 27	43

Índice de tablas

Tabla I	6
Tabla II.....	26
Tabla III.....	28
Tabla IV	36
Tabla V.....	39
Tabla VI	44
Tabla VII.....	73

Lista de abreviaturas

-OH:	grupo hidroxilo.
% p/v:	porcentaje peso/volumen.
% v/v:	porcentaje volumen/volumen.
3'UTR:	región 3' no traducida.
4-MU:	4-metilumberilferona.
5'UTR:	región 5' no traducida.
ADN:	ácido desoxirribonucleico.
ADNc:	ácido desoxirribonucleico complementario.
ADN-T:	ácido desoxirribonucleico de transferencia.
ARN:	ácido ribonucleico.
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero.
AtSDL:	sorbitol deshidrogenasa putativa de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
BEG:	tampón de extracción GUS.
BSA:	albúmina de suero bovino.
Col-0:	Columbia-0.
DMSO:	dimetilsulfóxido.
DTT:	ditiotreitól.
<i>E. coli</i>:	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA:	ácido etilendiaminotetra acético.
g:	gravedad.
GAPA:	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
GUS:	β -glucuronidasa.
hr:	hora.
L:	litro.
LeSDH:	sorbitol deshidrogenasa de tomate.
m:	metro.
M:	molar.
MdSDH:	sorbitol deshidrogenasa de manzana.
MS:	medio de Murashige y Skoog.
MUG:	4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido.
NAD⁺/NADH:	nicotinamida adenina dinucleótido.
NADP⁺/NADPH:	nicotidamida adenina dinucleótido fosfato.
OD₆₀₀:	densidad óptica medida a 600 nanómetros.
Pa:	pascal.
pb:	pares de bases.
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa.
PpySDH:	sorbitol deshidrogenasa de pera.
promAtSDL:	promotor putativo de la sorbitol deshidrogenasa putativa de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
ROS:	especies reactivas de oxígeno.
RT:	reacción de la transcriptasa reversa.

S6PDH:	sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa.
SDH:	sorbitol deshidrogenasa.
SDS:	dodecil sulfato de sodio.
Tris:	tris (hidroximetil) aminometano.
U:	unidad enzimática.
UV:	radiación ultra violeta.
X-gluc:	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucurónido.

Resumen

Poliolios o alcoholes de azúcar son el producto primario de la fotosíntesis en diversas familias de plantas superiores. El sorbitol, uno de estos polioliolios, es sintetizado y translocado a través del floema en plantas de las familias *Plantaginaceae* y *Rosaceae*, en las cuales las enzimas encargadas de su síntesis (sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa) y degradación (sorbitol deshidrogenasa, SDH) han sido ampliamente estudiadas. En plantas no-Rosáceas, y que no transportan polioliolios por el floema se han encontrado genes ortólogos a las SDH ya descritas, como es el caso del tomate, soya, maíz, entre otros. Por genética reversa, se identificó un marco de lectura abierto en *Arabidopsis thaliana* que codifica para una SDH putativa (*AtSDL*). La secuencia aminoacídica de la proteína codificada por *AtSDL* tiene una identidad mayor al 75% con las SDHs ya descritas, y posee la capacidad de oxidar al sorbitol *in vitro*.

En este seminario de título, se transformaron plantas de *Arabidopsis* con un constructo que posee el gen reportero β -glucuronidasa (GUS) río abajo del promotor putativo de *AtSDL* (prom*AtSDL*::GUS), para determinar el patrón de expresión del gen. Los resultados obtenidos utilizando cinco líneas independientes indican que *AtSDL* es un gen de expresión ubicua, durante todo el desarrollo de la planta. Estos resultados fueron corroborados utilizando datos de microarreglos y comparados con resultados de RT-PCR obtenidos previamente. Un análisis bioinformático de la región promotora en estudio reveló la sobre-representación de diversos elementos *cis*-regulatorios, indicando una posible regulación de expresión génica por estímulos, como luz, sacarosa, prolina, entre otros. Por razones técnicas, se demostró que no es posible utilizar las líneas

transformadas con promATSDL::GUS para analizar el efecto de uno de estos estímulos en la expresión génica de manera cuantitativa. Sin embargo, la sobre-representación de estos elementos entrega indicios de un posible rol de *AtSDL* en mecanismos para enfrentar el estrés abiótico, incluyendo el estrés por frío.

Abstract

Polyols or sugar alcohols are the primary product of photosynthesis in various higher plant families. Sorbitol, one of these compounds, is synthesised and translocated through the phloem in families such as *Plantaginaceae* and *Rosaceae* in which the enzymes responsible for its synthesis (sorbitol 6-phosphate dehydrogenase) and degradation (sorbitol dehydrogenase, SDH) have been widely studied. In non-*Rosaceae* plants, in which sucrose is translocated instead of polyols, genes orthologous to known SDHs have been found, such as in tomato, soybean and maize. Using a reverse genetics approach, an open reading frame codifying a putative sorbitol dehydrogenase (*AtSDL*) in *Arabidopsis thaliana* was identified. The protein encoded by *AtSDL* shares high identity (>75%) with previously-characterised SDHs, along with the capacity to oxidise sorbitol *in vitro*.

In this thesis, *Arabidopsis* plants were transformed with a construct composed of the β -glucuronidase reporter gene (GUS) downstream of the putative promoter of *AtSDL* (promAtSDL::GUS), in order to determine the expression pattern of the gene. The results obtained from five independent lines indicate that *AtSDL* is a ubiquitously expressed gene, during the entire development of the plant. These results were corroborated using microarray data and previously-obtained RT-PCR results. A bioinformatic analysis of the promoter region revealed the over-representation of various *cis*-elements, indicating a possible regulation of gene expression by light, sucrose, proline, etc. For technical reasons, it was demonstrated that it is not possible to use the promAtSDL::GUS transgenic lines to analyse the effect of one of these stimuli on gene

expression in a quantitative manner. Nonetheless, the over-representation of these elements indicates that *AtSDL* may play a role in defense mechanisms against abiotic stress, including cold stress.

1 Introducción

1.1 Polioles en plantas superiores.

En la gran mayoría de las plantas superiores, el carbono obtenido de la fotosíntesis es transportado a través del floema en forma de sacarosa. Sin embargo, en algunas familias vegetales este azúcar se encuentra en mucho menor proporción que otras formas de carbohidratos, tales como la rafinosa o los polioles, también conocidos como alcoholes de azúcar (Dinant y Lemoine, 2010). Entre los principales polioles translocados se encuentran el manitol (*Apiaceae*, *Oleaceae*, *Rubiaceae*), galactitol (*Celastraceae*) y sorbitol (*Rosaceae*, *Plantaginaceae*; Pommerrenig y cols., 2007; Reidel y cols., 2009). En estas últimas familias, el sorbitol es sintetizado en órganos fuentes (órganos fotosintéticamente activos como las hojas maduras) a partir de glucosa-6-P, la cual es transformada por la sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa (S6PDH, EC 1.1.1.200) a sorbitol-6-P, el cual es desfosforilado a sorbitol por fosfatasas inespecíficas. Posteriormente, el sorbitol es translocado a través del floema hasta los órganos sumideros (órganos fotosintéticamente inactivos como raíces, frutos y hojas inmaduras), donde mediante la sorbitol deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (SDH; EC 1.1.1.14) es transformado a fructosa para su uso o almacenamiento (Figura 1; Gao y cols., 2001; Kanamaru y cols., 2004; Loescher, 1987; Negm y Loescher, 1979; Tao y cols., 1995).

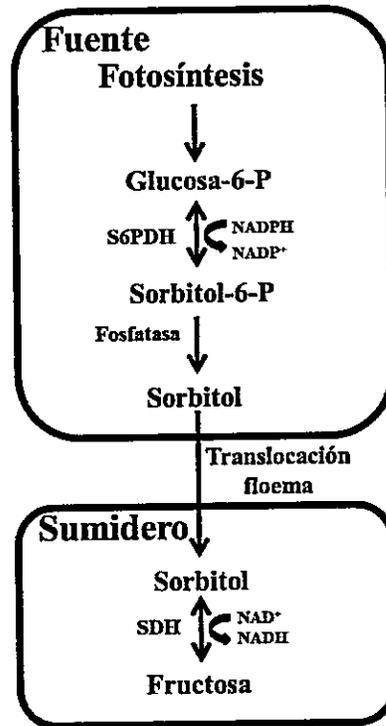


Figura 1. Metabolismo del sorbitol en plantas superiores. En Rosáceas, la glucosa 6-P obtenida de la fotosíntesis es transformada a sorbitol por la sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa (S6PDH) y fosfatasa inespecíficas, para luego ser translocado a través del floema desde órganos fuente hasta los órganos sumideros en donde la sorbitol deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (SDH) lo transforma en fructosa.

1.2 Funciones de los polioles en plantas.

El transporte de polioles en la planta presenta ventajas en comparación a la movilización de azúcares no-reducidos, ya que los alcoholes de azúcar al ser no-reductores, no participan de reacciones químicas mientras viajan por el floema (Dinant y Lemoine, 2010). Representan también un uso más efectivo del carbono, al ser reservorio de poder reductor, puesto que su metabolización genera moléculas reductoras como NADH (Figura 1). Además, sorbitol y manitol facilitan el transporte de boro a través del floema, formando complejos poliol-boro-poliol, permitiendo la redistribución de este elemento por todo el organismo (Bellaloui y cols., 1999; Loescher y cols., 2000). Tabaco (*Nicotiana tabacum*) y caqui (*Diospyros kaki* Thunb. cv Jiro), dos especies incapaces de sintetizar sorbitol y donde el boro es inmóvil en el floema, transformadas con el ADNc

que codifica para la S6PDH de manzana, son capaces de sintetizar sorbitol, de movilizar boro exógeno a través de sus floemas y son tolerantes a la deficiencia de boro en el medio de crecimiento (Bellaloui y cols., 1999; Brown y cols., 1999; Deguchi y cols., 2006; Gao y cols., 2001; Sheveleva y cols., 1998; Tao y cols., 1995; Tao y Gao, 2003).

Como solutos compatibles, sus concentraciones pueden aumentar considerablemente sin causar daños en el metabolismo celular (Stoop y cols., 1996). Juegan un papel importante en la protección contra estrés osmótico, donde sus grupos -OH (hidroxilo) reemplazan a las moléculas de agua en la estabilización de la estructura terciaria de las proteínas, y en la formación de puentes de hidrógeno en general (Noiraud, 2001). De esta forma, además de aumentar la fuerza de las interacciones hidrofóbicas dentro de la proteína (Taravati y cols., 2007), significa que los polioles ayudan a mantener el funcionamiento normal de la célula.

Otros roles de los polioles son conferir resistencia a estreses de tipo abiótico (Loescher y cols., 2000). Por ejemplo, caquis transgénicos que sintetizan sorbitol muestran mayor tolerancia a estrés salino en comparación a plantas silvestres (Gao y cols., 2001; Tao y Gao, 2003). En *Plantago major* (llantén), una especie que produce sorbitol naturalmente, la síntesis de este polirol aumenta bajo estrés salino, así como la expresión de genes que codifican para transportadores de sorbitol en el floema (Pommerrenig y cols., 2007).

También se ha reportado que los polioles aumentan la resistencia al estrés oxidativo, disminuyendo las especies reactivas de oxígeno (ROS) y protegiendo de esta manera las membranas plasmáticas de las células del daño producido por la peroxidación lipídica (Cuin y Shabala, 2008; Loescher y cols., 2000; Smirnov y Cumbes, 1989).

Además se ha propuesto un rol protector frente al frío, en donde existe una correlación entre la concentración de sorbitol y la disminución de la temperatura en especies translocadoras y no translocadoras de este compuesto, como en *Arabidopsis thaliana* (Kaplan y cols., 2004), aunque no se sabe con certeza el papel que jugarían estos alcoholes de azúcar en la protección al frío (Loescher, 1987; Loescher y cols., 2000; Sakai, 1962).

1.3 Sorbitol deshidrogenasas.

El metabolismo del sorbitol y de las enzimas relacionadas ha sido ampliamente estudiado en la familia *Rosaceae*. Un ejemplo es la manzana (*Malus x domestica*) cuyo genoma ha sido liberado recientemente y se han identificado 17 genes putativos que podrían codificar para enzimas SDH (Velasco y cols., 2010). Nueve de las *SDHs* han sido parcialmente caracterizadas (Negm y Loescher, 1979; Nosarzewski y Archbold, 2007; Park y cols., 2002; Wang y cols., 2009; Yamada y cols., 1998). Aunque algunas *SDHs* se expresan exclusivamente en órganos sumideros (*MdSDH2*, *MdSDH3* y *MdSDH4*; Park y cols., 2002), otras se expresan tanto en órganos fuente como sumidero (*MdSDH1*, Park y cols., 2002; Wang y cols., 2009; Yamada y cols., 1998). En pera (*Pyrus serotina*) también se han identificado 5 genes putativos SDH, y se ha demostrado que el gen *PpySDH5* se expresa tanto en hojas jóvenes como maduras (Kim y cols., 2007).

Sin embargo, la presencia de sorbitol o de la actividad SDH ha sido detectada también en especies no-Rosáceas. En tomate, se identificó el gen responsable de codificar para una enzima con actividad SDH, llamada *LeSDH*. *LeSDH* se expresa de forma ubicua, y

su mayor expresión se registra a nivel de los órganos florales (Ohta y cols., 2005). En soja, se ha detectado la presencia de sorbitol en los hipocotilos durante la germinación de las semillas, pero no así en las semillas secas o embebidas en agua (Kuo y cols., 1990). También se ha encontrado la existencia de este poliol en *Zea mays*, específicamente en el grano del maíz, donde además se ha encontrado una enzima SDH que cataliza el paso de fructosa a sorbitol (Carey y cols., 1982; Shaw y Dickinson, 1984; de Sousa y cols., 2008). Sin embargo, en callos embriogénicos de maíz, existe una SDH que cataliza la conversión de sorbitol a fructosa (Swedlund y Locy, 1993).

1.4 Sorbitol deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*.

En el marco de los estudios para determinar el papel de las SDHs presentes en especies que no translocan sorbitol, utilizando genética reversa se encontró un marco de lectura abierto en el locus At5g51970 de *Arabidopsis thaliana*, cuya secuencia aminoacídica fue alineada junto a las de SDHs conocidas (manzano, tomate, entre otros; Mandujano, 2010). Se encontró que la proteína codificada por este locus poseía una alta identidad con las demás SDHs (cercana al 80%, Tabla I), además de poseer dominios conservados dentro de la familia de alcoholes deshidrogenasas (dominio catalítico de alcoholes deshidrogenasas y dominio de unión a di-nucleótidos). Más aún, la proteína presenta los aminoácidos claves de unión al ión zinc, y en la oxidación del D-sorbitol. Estos datos sugieren fuertemente que el locus At5g51970 codifica para una putativa sorbitol deshidrogenasa, y fue denominado *AtSDL*.

Tabla I. Porcentaje de identidad de aminoácidos entre diferentes SDH y AtSDL. AtSDL (*Arabidopsis thaliana* SDH-like), LeSDH (*Solanum lycopersicum* SDH), MdSDH9 (*Malus x domestica* SDH 9), FaSDH (*Fragaria x ananassa* SDH), PpSDH (*Prunus persica* SDH), PsSDH (*Prunus salicina* SDH), ZmSDH (*Zea mays* SDH). Tabla extraída de Mandujano (2010).

%	AtSDL	LeSDH	MdSDH9	FaSDH	PpSDH	PsSDH	ZmSDH
AtSDL	-	83	82	82	80	79	76
LeSDH		-	76	84	80	80	76
MdSDH9			-	78	84	83	73
FaSDH				-	80	80	75
PpSDH					-	97	73
PsSDH						-	75
ZmSDH							-

Modelamiento *in silico* de la proteína reveló que AtSDL une preferentemente NAD^+ en vez de NADP^+ , en presencia de zinc. Además, estudios *in vitro* han mostrado que AtSDL es capaz de reducir NAD^+ a NADH en presencia de sorbitol y zinc (Aguayo, resultados no publicados; Mandujano, 2010). También se probó que el ARNm de *AtSDL* se expresa en diversos órganos de la planta (Figura 2), demostrando que el locus identificado no es un pseudogen.

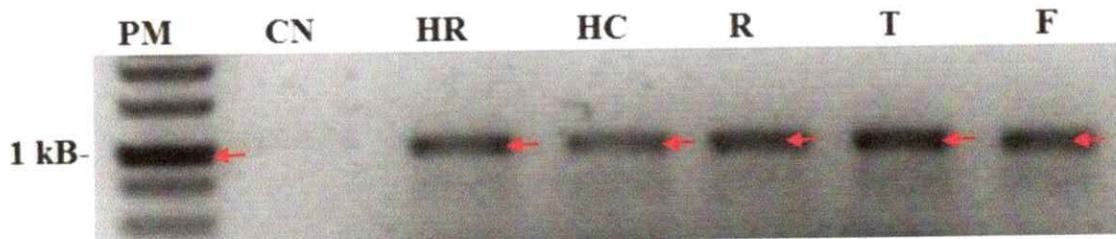


Figura 2. Expresión del ARNm de *AtSDL*. Reacción de RT-PCR para amplificar el ADNc de *AtSDL* a partir de ARN extraído de diferentes órganos. Control negativo (CN), hoja roseta (HR), hoja caulinar (HC), raíz (R), tallo (T), flor (F). El tamaño del amplificado esperado es de ~ 1 kb (flechas rojas). Extraído de Mandujano, 2010.

Los trabajos previamente descritos muestran que *AtSDL* es un gen que se está expresando en *Arabidopsis* cuyo producto génico tiene la capacidad de oxidar sorbitol. Sin embargo, nada se sabe de la regulación de la expresión génica de *AtSDL* en la planta. Es interesante estudiar la regulación de la transcripción ya que hay evidencia que apunta a que es en este nivel en donde se regula la actividad enzimática. Por ejemplo, en *Plantago major* (Pommerrenig y cols., 2007), la expresión del mensajero de una *SDH*

putativa disminuye tras estrés salino, además de aumentar la concentración de sorbitol. En pera (*Pyrus serotina*) se mostró una variación en la actividad SDH según la estación climática (Yamaki y Moriguchi, 1988), y en manzana, la actividad SDH disminuye a medida que las hojas pasan de jóvenes a maduras (Loescher y cols., 1982). Más interesante resulta el hecho de que en manzana se ha reportado una relación positiva entre la variación de la actividad SDH, y la variación de la cantidad de proteína y de transcrito (Yamada y cols., 1999). También se ha probado que existe regulación por azúcares de la actividad SDH (Archbold, 1999), y que la regulación de la actividad enzimática en tratamientos con azúcar está fuertemente relacionada con variaciones en la expresión de los genes responsables, tanto en manzana (Zhou y cols., 2006) como en maíz (de Sousa y cols., 2008). Estos últimos datos sugieren decididamente a un mecanismo de regulación de la actividad SDH a nivel transcripcional.

Con los avances en genómica y bioinformática, la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) y la creación de una base de datos que constantemente se está actualizando (www.arabidopsis.org), se ha determinado que *Arabidopsis* posee 27,416 genes codificantes (TAIR10, 2010; www.arabidopsis.org). Esto permite la fácil búsqueda de los locus de interés y sus respectivas ubicaciones en los cromosomas de *Arabidopsis*, de manera de tener una idea visual del contexto en el que se encuentra el gen en estudio. Además, en la actualidad existen diversas herramientas bioinformáticas de libre acceso que permiten la identificación de elementos *cis*-reguladores descritos, como PLACE (Higo et al., 1999), PlantPAN (Chang y cols., 2008), AGRIS (Palaniswamy y cols., 2006), PlantCARE (Lescot y cols., 2002), entre

otros, como también herramientas que permiten buscar elementos específicos en grupos de secuencias de interés (PatMatch, Yan y cols., 2005). En conjunto, permiten al usuario hacer hipótesis sobre la regulación de genes en estudio en base a la analogía de elementos con otros genes cuya regulación ya ha sido descrita. Otro recurso sumamente importante son las bases de datos de microarreglos, como NASCArrays (Craigon y cols., 2004) y AtGenExpress (Kilian y cols., 2007), que permiten buscar posibles condiciones que regulen la expresión de las secuencias de interés, ya sea desarrollo, ciclo circadiano, estreses de diversos tipos, etc.

Por estas razones, para estudiar el patrón de expresión de *AtSDL* en *Arabidopsis*, se generó un constructo que posee el gen reportero β -glucuronidasa (GUS, E.C 3.2.1.31) río abajo del promotor putativo de *AtSDL* (Severin, 2007). La identificación del promotor putativo de *AtSDL* se realizó en base a la base de datos de *Arabidopsis* (Figura 3). Comprende la región 5'UTR del locus At5g51970 (*AtSDL*), 221 de las 232 pb de la región 3'UTR del locus adyacente At5g51960 (gen no caracterizado) y la región intergénica entre ambos, obteniéndose un fragmento de 692 pb (no fue posible aislar un fragmento que contuviese las 232 pb de la región 3'UTR del locus At5g51960, Severin, 2007; ver discusión).

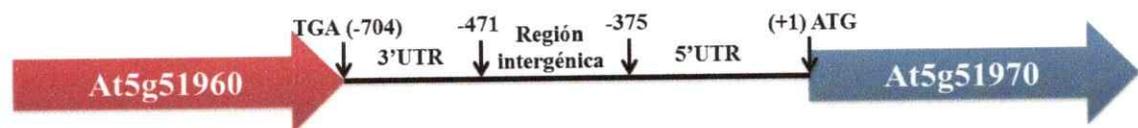


Figura 3. Identificación del promotor putativo de *AtSDL*. La región promotora aislada comprende 692 de los 703 pb que separan las zonas codificantes de At5g51960 (flecha roja) y At5g51970 (*AtSDL*, flecha azul). Las flechas negras indican la distancia río arriba de la zona codificante del locus At5g51960, la región intergénica y la región 5'UTR del locus At5g51970, con respecto al inicio de la transcripción del mismo (ATG), cuya adenina está en la posición +1. El esquema no está hecho a escala.

Este constructo binario fue llamado promAtSDL-GUS. Esta construcción se basa en el vector pCAMBIA 1381 el cual permite la identificación de las plantas transformantes mediante su supervivencia al antibiótico higromicina B (www.patentlens.net/daisy/cambia/585.html#dsy585_Description, 22-04-2011). La enzima GUS es una hidrolasa que cataliza la hidrólisis de una serie de compuestos β -glucurónicos, dos de los cuales se usaron en este seminario de título. El primero es el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucurónido (X-gluc), el cual al ser hidrolizado por GUS libera cloro-bromoindigo y ácido glucurónico. El cloro-bromoindigo posteriormente dimeriza, formando un precipitado insoluble de color azul llamado dicloro-dibromoindigo (Jefferson y cols., 1987; Jefferson, 1987; Karcher, 1995), permitiendo de esta manera una visualización cualitativa de la localización de la actividad enzimática (Figura 4), y por lo tanto de la expresión génica.

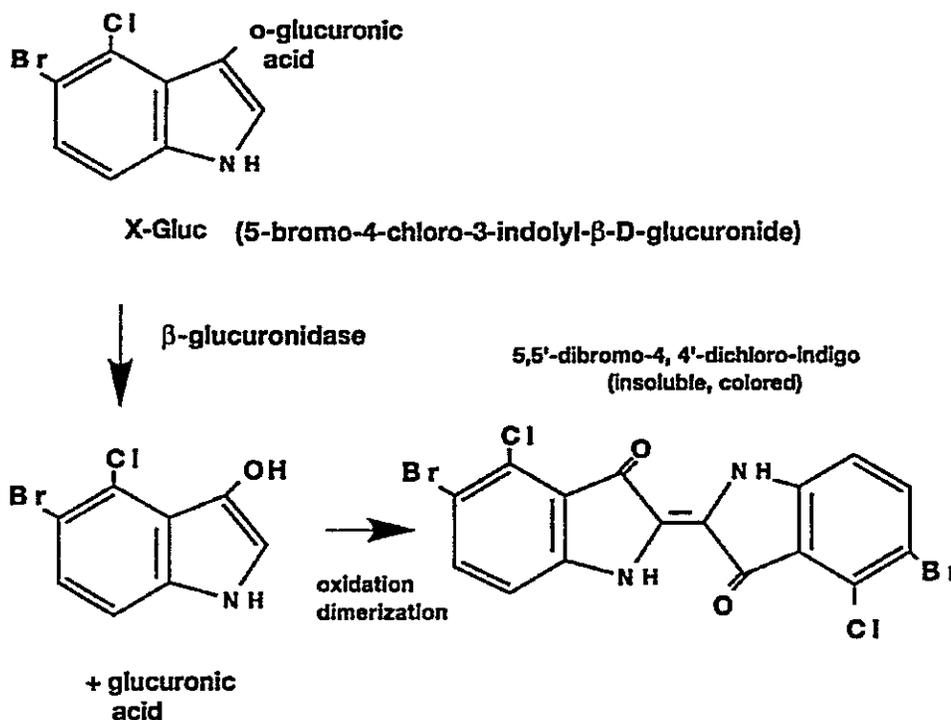


Figura 4. Reacción catalizada por la enzima β -glucuronidasa. X-gluc, al ser clivado por la enzima libera ácido glucurónico y cloro-bromoindigo. Al oxidarse, el cloro-bromoindigo dimeriza formando el precipitado insoluble de color azul dicloro-dibromoindigo. Imagen extraída de Karcher, 1995.

El segundo compuesto utilizado es el 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG), el cual tras ser hidrolizado libera ácido glucurónico y 4-metilumbeliferona (4-MU), el que puede ser medido fluorométricamente, permitiendo una cuantificación de la actividad enzimática (Gartland y cols., 2000; Jefferson, 1987).

Con el constructo promAtSDL-GUS se procedió en una primera instancia a transformar plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* Columbia-0. Se obtuvieron dos líneas resistentes a higromicina (Severin, 2007) y dos más en trabajos de una Unidad de Investigación que realicé previamente a este Seminario de Título (Parada, 2010). Un resumen del trabajo realizado por Severin se muestra en la Figura 5.

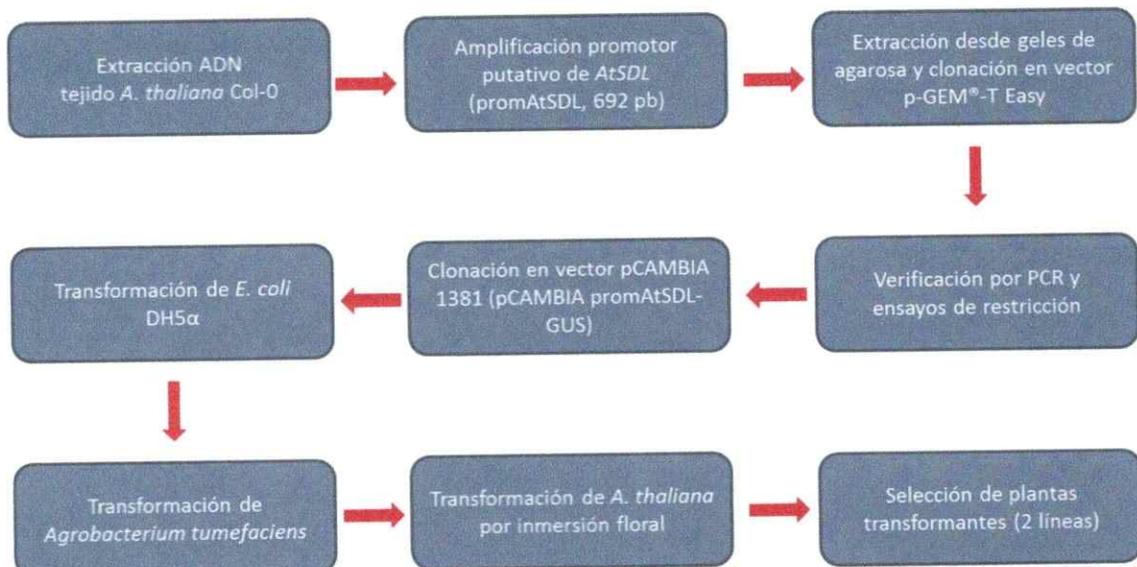


Figura 5. Resumen del trabajo previo realizado por Daniel Severin. Se realizó la extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 para luego extraer el promotor putativo de *AtSDL* y clonarlo en el vector pCAMBIA promAtSDL-GUS, con el cual se transformaron *Agrobacterium tumefaciens* y se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* transformantes con las cuales es posible estudiar el patrón de expresión de *AtSDL*.

Sin embargo, la baja tasa de transformación (0,13%; se espera 1-3%, Clough y Bent, 1998; Zhang y cols., 2006) junto con la muy baja tasa de germinación de una de las cuatro líneas transformantes (<8%, Parada, 2010) significaba que las líneas obtenidas restantes no eran suficientes como para continuar con los análisis.

Resultados publicados en la literatura indican que el análisis de diez líneas independientes es suficiente al investigar el patrón de expresión utilizando plantas transformadas con el promotor del gen de interés fusionado a un gen reportero (Thakore y cols., 1999). Por lo tanto, en el trabajo para determinar el patrón de expresión de *AtSDL* utilizando esta tecnología, fue necesario volver a transformar plantas silvestres de *Arabidopsis*, de manera de obtener más líneas portando promAtSDL::GUS para su posterior análisis. Además, se complementó este estudio mediante el uso de diversas herramientas bioinformáticas para estudiar el patrón de expresión de *AtSDL*.

2 Objetivos generales y específicos

2.1 Objetivo general:

Determinar el patrón de expresión *in vivo* e *in silico* de *AtSDL*, una posible sorbitol deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*.

2.2 Objetivos específicos:

1. Obtener al menos 10 líneas transformantes independientes de *A. thaliana* que contengan el inserto promAtSDL::GUS.
2. Visualizar mediante el ensayo histoquímico de GUS con X-gluc, el patrón de expresión de *AtSDL* en 10 líneas transformantes durante todo el desarrollo de la planta.
3. Utilizando herramientas bioinformáticas, realizar un análisis *in silico* de la secuencia promotora en estudio, para encontrar elementos reguladores en *cis*.
4. Cuantificar mediante el ensayo de GUS con MUG, el patrón de expresión de *AtSDL* en al menos 3 líneas transformantes homocigotas en diferentes condiciones de cultivo.

3 Materiales y métodos

3.1 Reactivos.

Merck: sacarosa, agar – agar, carbonato de sodio (Na_2CO_3), dihidrógeno fosfato de sodio monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), hidrógeno fosfato de disodio anhidro (Na_2HPO_4), cloruro de sodio (NaCl), etanol absoluto, acetona, N,N-dimetilformamida, cloroformo, Triton X-100, nitrato de potasio (KNO_3), nitrato de calcio tetrahidrato ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloruro de potasio (KCl), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), sulfato de manganeso (MnSO_4), sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Sigma: ferricianida de potasio, ferrocianida de potasio, brilliant blue G, i-inositol, 4-metilumbeliferona(4-MU), dimetilsulfóxido (DMSO), sulfato de cobre (CuSO_4), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), albúmina de suero bovino (BSA).

Winkler: EDTA sal sódica, Tris, dodecil sulfato de sodio (SDS), ditioneitol (DTT).

Fermentas: 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronido (X-gluc), GeneRuler 1 kb DNA Ladder, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, dATP 100 mM, dCTP 100 mM, dGTP 100 mM, dTTP 100 mM.

Phytotechnologies Laboratories: 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG), Murashige y Skoog Basal Salt Mixture (MS), higromicina B.

Otros: Biolase DNA Polymerase, tampón 10xNH4 y MgCl_2 (Bioline), extracto de levadura grado biológico y triptona grado biológico (MO BIO Laboratories, Inc).

3.2 Esterilización y estratificación de semillas.

En este seminario de título, se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0. El protocolo para esterilizar las semillas varía según el experimento. Para las observaciones del patrón de expresión de *AtSDL* mediante tinción de actividad GUS, las semillas fueron agitadas durante 30 minutos en 1 mL de Triton X-100 0,1%, luego se removió esta solución y se agregó 1 mL de Triton X-100 0,1% en etanol 70% y se agitaron durante 5 minutos. Luego se removió la solución y se agregó 1 mL de Triton X-100 en cloro 1,5% y se agitaron durante 10 minutos.

Para los tratamientos de estrés y la búsqueda de plantas homocigotas, las semillas fueron esterilizadas de la siguiente manera: a las semillas se les agregó 1 mL de etanol 95% filtrado (22 μ m), y se agitaron durante 5 minutos. Luego se removió el etanol 95% y se les agregó 1 mL de Triton X-100 y 0,1% en etanol 70% y se agitaron durante 15 minutos.

En ambos casos, se lavaron las semillas con H₂O autoclavada estéril y se almacenaron a 4°C en oscuridad durante una noche para estratificarlas.

3.3 Condiciones de cultivo de las plantas.

Semillas estratificadas fueron sembradas en placas de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (medio MS basal 0,443%; sacarosa 3%; agar - agar 0,6%; punta de espátula con i-inositol; pH 5.8 ajustado con KOH), con o sin el antibiótico higromicina B (25 μ g/mL) y colocadas en una incubadora a 22°C, 2830 lux y con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Luego de una semana, se trasplantaron las plántulas a medio hidropónico (para solución 100x: KNO₃ 125 mM, MgSO₄ x 7 H₂O 75 mM, KH₂PO₄ 50 mM, KCl 5

mM, H₃BO₃ 5 mM, MnSO₄ 1 mM, ZnSO₄·7 H₂O 200 μM, CuSO₄ 150 μM, Fe/DTPA 10 mM, Ca(NO₃)₂·4H₂O 150 mM, Na₂O₃Si 10 mM, pH 5) en lana roca, por el resto del ciclo de vida de las plantas, a 22°C, 3810 lux y con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Para los ensayos del patrón de expresión de GUS, se seleccionaron plántulas T2 provenientes de placas de medio MS suplementadas con higromicina, cuyo crecimiento no retardado indicó que eran transformantes. Tras una semana de crecimiento, algunas plántulas se utilizaron para analizar el patrón de tinción mientras que las demás fueron trasplantadas a medio hidropónico para analizar el patrón de expresión en el resto del ciclo de vida de *Arabidopsis*, bajo las condiciones ya nombradas. Como controles, se sembraron semillas transformadas en placas sin antibiótico (para verificar su viabilidad), y semillas silvestres en medio MS con antibiótico (para asegurar que la concentración de higromicina B, 25 μg/mL, fuera suficiente para seleccionar transformantes).

3.4 Transformación estable y análisis de *Arabidopsis*

Plantas de *Arabidopsis*, de alrededor de 6 semanas, que poseían una gran cantidad de botones cerrados y sin silicuas (si tenían algunas, fueron removidas), fueron transformadas genéticamente por inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Una colonia de *Agrobacterium* que contenía el vector pCAMBIA promAtSDL-GUS, se dejó crecer durante la noche a 28°C en 5 mL de medio LB con el antibiótico kanamicina (100 mg/mL). Al día siguiente, se diluyeron en 100 mL del mismo medio con antibiótico y se dejaron crecer hasta una OD₆₀₀ de 2. Se centrifugaron las células a 5000 g por 20 minutos, se botó el sobrenadante y se agregaron 50 mL de medio de infiltración

(sacarosa al 5% p/v y Silwett L-77 al 0.05% v/v) a cada tubo. Se resuspendieron, juntaron y diluyeron con medio de infiltración hasta que la OD₆₀₀ fuese 0.8. En esta suspensión, se sumergieron varias veces los botones de *Arabidopsis*, y a continuación se dejaron las plantas durante una noche en oscuridad. Al día siguiente, fueron devueltas al medio hidropónico para que terminaran su ciclo de vida y se colectaron las semillas a medida que se iban produciendo.

3.4.1 Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis*.

Plantas de *Arabidopsis* (silvestres y transformantes) de alrededor de 4 semanas fueron utilizadas para la extracción de ADN. A cada planta se les cortaron 2 hojas rosetas y se colocaron en un tubo de 1.5 mL. Luego se les agregaron 50 µL de tampón de extracción (NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7.5 y EDTA 50 mM pH 7.5) y se molieron utilizando un pistilo de plástico, autoclavado previamente. Luego, se les agregó 150 µL de tampón de extracción y 20 µL de SDS al 20%. A continuación se incubaron durante 10 minutos a 65°C, luego se les agregó 250 µL de cloroformo:fenol:alcohol isoamílico (24:25:1), se agitaron durante 30 segundos y se centrifugaron a 10000 g por 3 minutos. Se tomaron 20 µL de la fase superior (fase acuosa) y se mezclaron con 80 µL de H₂O nanopura. Finalmente, estos tubos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.4.2 Verificación molecular de las líneas transformantes por PCR.

A las posibles plantas transformantes producto de la inmersión floral, se les extrajo ADN según sección 1.4.1 y se les aplicó un PCR. La mezcla de reacción (20 µL) estaba constituida por 1 U Biolase DNA Polymerase, 1x NH₄Tampón, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,2 mM con los partidores pATSDLBamHI5'5'-

GGACGGATCCTTCCTCTTTGTCTTTCCGG-3' y GUS3' 5'-
TGTTGATCCGCATCACGC-3' a concentraciones finales de 0,5 µM, y 1 µL de ADN
templado. El protocolo de PCR fue: 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30
segundos, 57°C por 1 minuto y 72°C por 1:30 minutos y un ciclo de 72°C durante 10
minutos. Los productos del PCR fueron almacenados a -20°C hasta que fueron
visualizados en geles de agarosa al 1% (sección 3.10).

3.4.3 PCR del gen *GAPA*.

A las muestras de ADN genómico producto de la extracción de ADN de las posibles
plantas transformantes (sección 3.4.1) se les aplicó además un PCR cuya reacción (20
µL) estaba constituida por 1 U Biolase DNA Polymerase, 1x NH₄ Tampón, MgCl₂ 3
mM, dNTPs 0,2 mM, partidor *GAPA*-F5'-GGTAGGATCGGGAGGAAC-3' y *GAPA*-R
5'-CTGGTGCCAAGAAGGTTATC-3' a concentraciones finales de 0,5 µM, y 1 µL de
ADN como templado. El protocolo de PCR fue: un ciclo a 94°C por 5 minutos, treinta
ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 40 segundos y 72°C por 40 segundos, un ciclo
a 72°C por 10 minutos, y 10°C hasta que se retiran del termociclador. Este PCR es
aplicado para verificar la calidad del ADN, ya que *GAPA* (codifica para la subunidad 1
de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) es expresado constitutivamente en
la planta.

3.5 Ensayo histoquímico GUS.

Plantas de *Arabidopsis* (transformadas y silvestres) fueron analizadas histoquímicamente
para detectar la expresión de GUS utilizando X-Gluc como sustrato (Jefferson y cols,
1987), a partir de la primera semana de desarrollo hasta la octava. Las plántulas de 1 y 2

semanas se usaron de forma completa, mientras que a las plantas desde la tercera a la octava semana de desarrollo se les extrajo tejido de raíces, hojas caulinares y roseta, tallos, silicuas y flores, según fuese posible dependiendo del estado de desarrollo de cada planta. Cada muestra fue incubada en oscuridad con la solución de tñido GUS (X-Gluc 1 mg/mL, tampón fosfato Na 0.1 M pH 7, Triton X-100 10 mM, K-ferricianida 2 mM y K-ferrocianida 2 mM) y se les aplicó vacío con una bomba de vacío R-300 (Boeco, Germany). Se variaron las condiciones de vacío; una reacción se incubó 60 minutos con 85 kPa de presión, otra 60 minutos con 60 kPa de presión y la última se incubó durante 90 minutos con 85 kPa de presión (cabe mencionar que las condiciones de incubación se determinaron empíricamente). Luego, se dejaron a 37°C por 2 días, se sacaron de oscuridad y se cambió la solución de tñido por etanol al 70% hasta que la clorofila fue removida. La muestra biológica la constituyen 6 individuos (o el tejido de 6 individuos) de cada línea por semana de desarrollo y se realizaron 3 repeticiones técnicas. Cada tejido fue visualizado con una lupa Olympus MVX10 y fotografiado con una cámara QImaging Micro Publisher 3.3 RTV, equipada en la lupa. Se utilizó el programa QCapture Pro versión 6.0 para adquirir las imágenes.

3.6 Extracción de ADN plasmidial de *Escherichia coli*

La cepa *E. coli* DH5 α que contenía el plasmidio pGEM-T promAtSDL (Figura 5; Severin, 2007) fue utilizada para extraer el plasmidio de interés para secuenciación, mediante minipreparación de kit (Axygen Biosciences, Axyprep Plasmid Miniprep). A partir de un tubo de un clon almacenado a -80°C, se hizo un rayado en placa de medio LB sólido (NaCl 1% p/v, triptona 1% p/v, Extracto de levadura 0,5% p/v, 1,6% p/v en

agua destilada) el cual se dejó incubando a 37°C por una noche. De esta placa se tomaron 2 clones y se incubaron durante una noche a 37°C en 5 mL de LB líquido (lo mismo que el LB sólido pero sin el agar-agar). Al día siguiente se realizó la minipreparación de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Tres µL de cada minipreparación fueron cargados en geles de agarosa al 1% (ver sección 3.10). Cada clon fue posteriormente diluido con H₂O nanopura de manera que la concentración del ADN fuese de 50 ng/µL.

3.6.1 Secuenciación del plasmidio pGEM-T promAtSDL

Alícuotas de las minipreparaciones de cada clon fueron enviadas para su secuenciación a la empresa Macrogen. La reacción de secuenciación estaba constituida por 5 µL de ADN 50 ng/µL, cada reacción siendo secuenciada a partir de un único partidador específico. Se utilizaron los partidadores universales SP6 y T7 para ambos clones. Cada secuenciación se realizó en duplicado.

3.7 Búsqueda de elementos regulatorios en el promotor del gen *AtSDL* mediante herramientas bioinformáticas.

La secuencia del promotor del gen At5g51970 de *Arabidopsis* se extrajo de la base de datos de Arabidopsis, versión TAIR10 (www.arabidopsis.org) y también fue obtenida mediante secuenciación del vector pGEM-T promAtSDL (sección 3.6.1; ver sección 1.4 para una descripción de las regiones clonadas). Ambas secuencias fueron alineadas con el programa ClustalX, versión 2.0.12 (www.clustal.org) y analizadas para encontrar posibles elementos *cis*-reguladores a través de la herramienta de análisis de promotores disponible en PLACE (www.dna.affrc.go.jp/PLACE/, Higo y cols., 1999). Para

determinar la posible importancia de los elementos encontrados, se calculó la frecuencia de cada elemento respecto del promedio de veces que cada uno de ellos está presente en regiones de longitud equivalente en todos los promotores de *Arabidopsis*, vale decir 692 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción. Con la colaboración del Doctor Alexander Vergara, se descargaron las secuencias correspondientes a los primeros 1000 pb río arriba de los inicios de traducción de todos los genes de *Arabidopsis*, desde la base de datos (ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Sequences/blast_datasets/TAIR10_blastsets/). Luego, 308 pb fueron removidas de los extremos 5' de cada secuencia, y las restantes 692 pb fueron analizadas con Patmatch (Yan y cols., 2005). La línea de comandos del programa fue descargada y así fue posible buscar y contar el número de veces que cada elemento *cis* presente en el locus At5g51970 se encuentra en los 692 pb de cada uno de los 27,416 genes codificantes de *Arabidopsis* (TAIR10, 2010; www.arabidopsis.org).

3.8 Análisis *in silico* de la expresión de *AtSDL*.

Se utilizó la herramienta eFP (electronic Fluorescent Pictograph) Browser (hesc4037-shemp.csb.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi) para analizar la distribución de la expresión de *AtSDL* a través del desarrollo, según los datos de los chips ATH1 de Affymetrix disponibles.

3.9 Tratamiento de oscuridad en *Arabidopsis thaliana*.

Semillas transformantes de *Arabidopsis* fueron esterilizadas, sembradas en placas de medio MS y crecidas de forma vertical. Luego de 10 días, las placas fueron envueltas en papel de aluminio durante distintos tiempos (0, 1, 3, 6 y 24 horas), tras los cuales las

plántulas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para la posterior extracción de proteínas (sección 3.9.1). Como controles, se usaron plantas transformantes correspondientes a cada línea, sin tratamiento, durante los mismos tiempos.

3.9.1 Extracción de proteínas.

La extracción de proteínas se realizó con una adaptación del protocolo de Gartland y cols., (2000). Ocho plantas (aproximadamente 50 mg) fueron molidas con pistilos de plástico autoclavados, en presencia de nitrógeno líquido, cuidando de que los tejidos no se descongelaran en ningún momento. Una vez molidas las muestras, se les agregó 250 μL de tampón de extracción GUS (tampón sodio fosfato 50 mM pH 7, EDTA 10 mM pH 8, SDS 0,1% p/v, Triton X-100 0,1% v/v, DTT 10 mM; BEG de ahora en adelante) y se centrifugaron a 14000 g durante 15 minutos. Se colectaron los sobrenadantes y se centrifugaron nuevamente a 14000 g durante 15 minutos, tras lo cual se volvieron a colectar los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C . La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976; Kruger, 1994), utilizando BSA como estándar.

3.9.2 Ensayo de actividad enzimática GUS.

Para cada extracto proteico se realizó la medición de la actividad de la enzima GUS en triplicado. La reacción enzimática se realizó a 37°C en un baño termorregulado, utilizando 288 μL de BEG con MUG 1 mM más 12 μL de extracto proteico (determinado empíricamente). La reacción se detuvo a los 0, 8, 16, 24 y 32 minutos, extrayendo 50 μL del volumen de reacción inicial y mezclándolos con 200 μL de

Na₂CO₃ 0,2 M, lo que desplaza el pH desde 7 a valores más básicos. En estas condiciones, la enzima pierde su actividad y se potencia la fluorescencia del 4-MU producido (Jefferson, 1987; Wilkinson y Lindsey, 1998). El blanco de reacción estaba formado por 200 µL de Na₂CO₃ 0,2 M más 48 µL de BEG sin MUG más 2 µL de extracto proteico. Para cuantificar la cantidad de 4-MU producida se ocupó un fluorímetro lector de placas de microtitulación (BioTek Synergy2), excitando a 365 nm y registrando la fluorescencia emitida a 455 nm. Además, se realizó una curva de calibración de 4-MU (0-1000 nM) diluido en Na₂CO₃ 0,2 M y BEG sin MUG.

3.10 Visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Para la separación de fragmentos de ADN se realizó electroforesis en geles de agarosa (1-1,5%, dependiendo del tamaño de la banda) disuelta en tampón TAE (0,49 % p/v Tris, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM pH 8). Una vez realizada la electroforesis los geles fueron incubados en una solución de bromuro de etidio de 2 µg/mL durante 20 minutos y luego fueron visualizados en un trans-iluminador UV Gene Genius Classic (SynGene). Las imágenes fueron obtenidas con el programa GeneSnap versión 7.12.10. Las cuantificaciones de los fragmentos de interés se realizaron con el programa ImageJ versión 1.44.

3.11 Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism® versión 5.00.

4 Resultados

Para estudiar el patrón de expresión de *AtSDL* en plantas de *Arabidopsis*, se decidió utilizar el gen reportero GUS acoplado al promotor putativo del gen, para visualizar el patrón mediante un ensayo histoquímico (Jefferson y cols, 1987) durante el desarrollo de las plantas transformadas con dicho vector. Al comienzo del seminario de título, este vector, pCAMBIA promAtSDL-GUS, estaba disponible en el laboratorio (Severin, 2007). El promotor fue secuenciado a partir de una colonia de *E. coli* que contenía el plasmidio pGEM-T promAtSDL, cuya secuencia fue alineada con la secuencia disponible en la base de datos de *Arabidopsis* (sección 3.6.1), tras lo cual se encontró una sola diferencia, la sustitución de una timina por una citosina en la posición -96 (Figura 3).

4.1 Obtención de múltiples líneas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el vector pCAMBIA promAtSDL-GUS.

Se transformaron plantas silvestres de *Arabidopsis* con pCAMBIA promAtSDL-GUS mediante el protocolo de inmersión floral (sección 3.4). Luego, se identificaron posibles transformantes, sembrando las semillas (T1) en medio de selección (higromicina). El vector contiene el gen *hptII* que confiere resistencia a este antibiótico, el cual inhibe la síntesis proteica, y es muy tóxico para las plantas. El gen de resistencia codifica para HPTII, una higromicina fosfotransferasa, que añade un grupo fosfato al antibiótico, eliminando así su toxicidad (Miki y cols. 2003, Waldron y cols. 1985, Rao y cols. 1983). De esta manera, las plantas resistentes al antibiótico (Figura 6, A, B y C) muestran un

crecimiento equivalente al de una planta silvestre en medio sin antibiótico (Figura 6E), mientras que las plántulas sensibles al antibiótico muestran un crecimiento retardado y posteriormente mueren (Figura 6F).

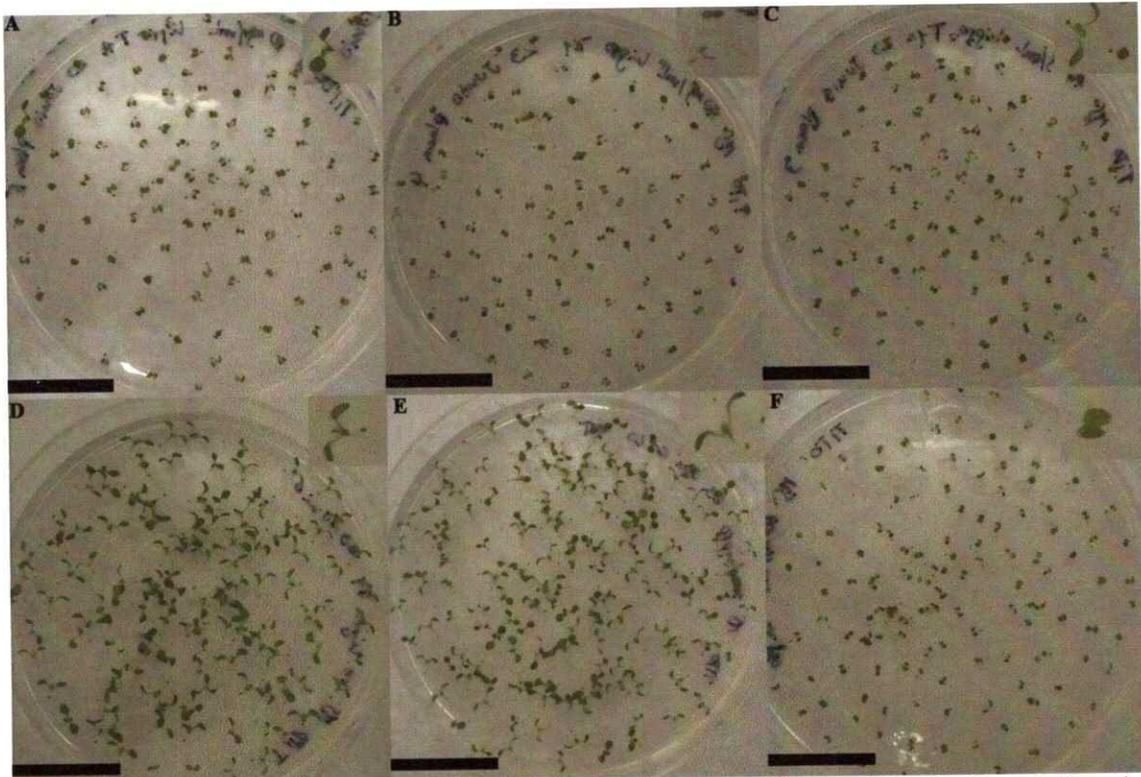


Figura 6. Transformación estable de *Arabidopsis* con el vector pCAMBIA promAtSDL-GUS. Semillas transformadas (T1) y silvestres fueron sembradas en medio MS con y sin higromicina B y fotografiadas luego de una semana. A, B y C, plantas T1 en 25 µg/mL de higromicina B; recuadro en A, B y C, posible transformante junto a un no transformante; D, T1 en medio sin antibiótico; E, planta silvestre en medio sin antibiótico; F, planta silvestre en medio con 25 µg/mL de higromicina B; recuadro en D, E y F, planta típica de la placa en estudio. Las barras indican 4 cm.

De esta manera, se seleccionaron 17 posibles transformantes y se traspasaron a medio hidropónico para que completaran su desarrollo. Al cabo de unas semanas, se les extrajo ADN genómico de hojas roseta para determinar si poseían el transgén de interés mediante un PCR que amplifica la región correspondiente al promotor clonado de *AtSDL* más una región intermedia en la secuencia codificante del gen *gusA*, de un tamaño total de 1384 pb (Figura 7A; sección 3.4.2). Se determinó que de las 17 plantas analizadas, 16 eran transformantes (Figura 7B) mientras que, tal como lo esperado, no

hubo amplificación de un producto en el control negativo (ADN de una planta silvestre). Por lo tanto, se contó con un total de 20 líneas transgénicas independientes, considerando las 4 líneas obtenidas de forma previa a este seminario de título (sección 1.4; Severin, 2007).

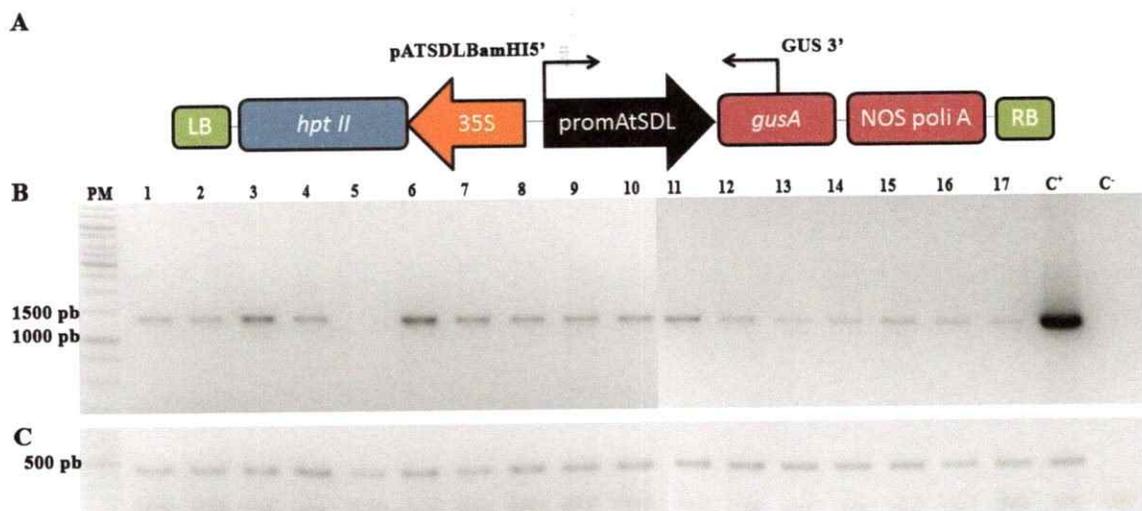


Figura 7. Verificación por PCR de las líneas de *Arabidopsis* (T1) transformadas con promAtSDL-GUS. En A se muestra una representación esquemática de pCAMBIA promAtSDL-GUS y la región amplificada por PCR en B. Las flechas negras indican las posiciones y nombres de los partidores utilizados. B y C: Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio muestran amplificado del promotor de *AtSDL* y un fragmento interno del gen de la β -glucuronidasa (1384 pb) para 16 de las 17 líneas T1 (panel B). El control positivo (C⁺) corresponde a ADN plasmidial de *E. coli* transformadas con el vector pCAMBIA promAtSDL-GUS y el negativo (C⁻) a ADN de una planta silvestre como templado. Como control de calidad del ADN se amplificó un fragmento interno del gen endógeno de *Arabidopsis*, *GAPA* (panel C). El control positivo (C⁺) es el ADN de una planta silvestre y el control negativo (C⁻) es agua nanopura como templado. PM, indicador de peso molecular.

Por último se contaron las semillas germinadas y no germinadas de cada placa y se calculó el porcentaje de germinación para cada caso (Tabla II). Con estos datos se obtiene que al haber 16 organismos transformantes de 1399 plantas germinadas, la eficiencia de la transformación fue de un 1.14%, en comparación al 0.13% de las semillas obtenidas previamente en el laboratorio (Severin, 2007).

Tabla II. Conteo de semillas de *Arabidopsis* silvestres y T1 de plantas transformadas con promAtSDL-GUS en medio MS con y sin higromicina.

Semilla	Concentración higromicina ($\mu\text{g/mL}$)	Germinaron	No germinaron	Total semillas	Porcentaje de germinación (%)
T1	0	208	8	216	96.29
	10	1399	71	1470	95.17
Silvestre	0	268	27	295	90.85
	10	223	18	241	92.53

Las líneas transformantes seleccionadas para el próximo experimento mostraron una segregación mendeliana correspondiente a una sola inserción del transgén en el genoma, vale decir que en plantas heterocigotas para la inserción la distribución de plantas resistentes y plantas sensibles fuese 3:1, respectivamente, y cuyos fenotipos de crecimiento y desarrollo no fueron distintos visualmente al de una planta silvestre (datos no mostrados).

4.2 Análisis preliminares del patrón de expresión de *AtSDL* mediante tinción GUS.

Existe evidencia de que en líneas transgénicas independientes para un mismo inserto, no se observan los mismos niveles de expresión de un gen reportero dado (como GUS) entre todas ellas (De Buck y cols., 2004; De Buck y cols., 2007), lo que puede estar dado por diversos factores (ver discusión). Es por esta razón que en este seminario de título, se seleccionaron 10 de las 20 líneas transformantes para realizar ensayos histoquímicos preliminares con X-gluc (Thakore y cols., 1999), para luego enfocar el estudio en las que mostraron patrones de expresión similares. Se analizaron las 10 líneas durante su desarrollo (8 semanas), y según fuese posible, se ensayó la planta por completo (1 y 2 semanas de desarrollo) o se extrajeron los distintos órganos para ser teñidos

individualmente (de la semana 3 en adelante). Estos tejidos fueron ensayados en tres condiciones distintas de presión de vacío y/o tiempo (sección 3.5) para lograr la penetración óptima del sustrato, X-gluc, en los tejidos. Sin embargo, no se vieron diferencias entre los patrones de tinción obtenidos (datos no mostrados), y por lo tanto, se usaron las condiciones de incubación en vacío de 85 kPa durante 60 minutos para la mayoría de los estudios. Se muestra un diagrama de la raíz y la flor de una planta de *Arabidopsis* (Figura 8) para facilitar la identificación de sus distintos órganos y tejidos. Los ensayos fueron realizados tres veces para cada línea, y en las siguientes figuras (Figuras 9-19) se muestran imágenes representativas de cada una de las 10 líneas analizadas durante todo su desarrollo. Al igual que en el caso de las semillas T1, se contaron los individuos presentes en cada placa y se calcularon los porcentajes de germinación correspondientes (Tabla III). En general, todos los porcentajes de germinación son cercanos y superiores al 90%, a excepción de la línea 4 (Tabla III). Así, se puede descartar algún efecto a nivel de germinación por la inserción de los ADN-T en el genoma de la mayoría de las distintas líneas transgénicas.

Tabla III. Conteo de germinación de semillas provenientes de las 10 líneas transformantes utilizadas en el seminario de título.

Línea	Concentración higromicina (µg/mL)	Germinaron	No germinaron	Total semillas	Porcentaje de germinación (%)
1	0	63	0	63	100,00
	25	89	7	96	92,71
2	0	124	7	131	94,66
	25	122	18	140	87,14
3	0	121	12	133	90,98
	25	117	8	125	93,60
4	0	75	52	127	59,06
	25	85	38	123	69,11
5	0	87	5	92	94,57
	25	186	23	209	89,00
6	0	49	16	65	75,38
	25	147	17	164	89,63
7	0	85	5	90	94,44
	25	82	6	88	93,18
8	0	41	2	43	95,35
	25	243	1	244	99,59
9	0	116	4	120	96,67
	25	112	4	116	96,55
10	0	27	1	28	96,43
	25	249	1	250	99,60
Silvestre	0	184	17	201	91,54
	25	176	12	188	93,62

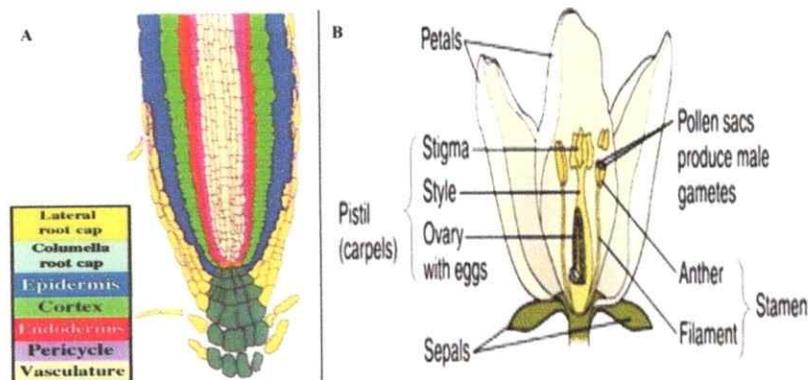


Figura 8. Esquema de una raíz (A) y flor (B) de *Arabidopsis*. En naranja en A se encuentra el centro quiescente. Imágenes modificadas de Marchant y cols. 1999, y scienceblogs.com, respectivamente.

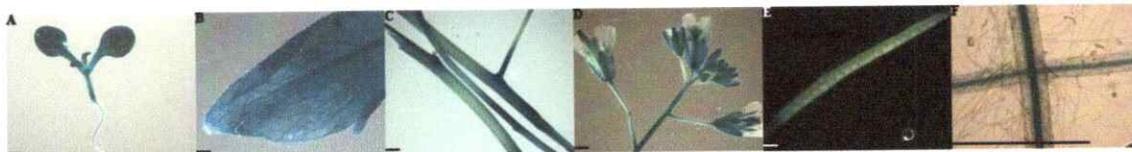


Figura 9. Patrón de tinción representativo de la línea 1 de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS durante su desarrollo. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

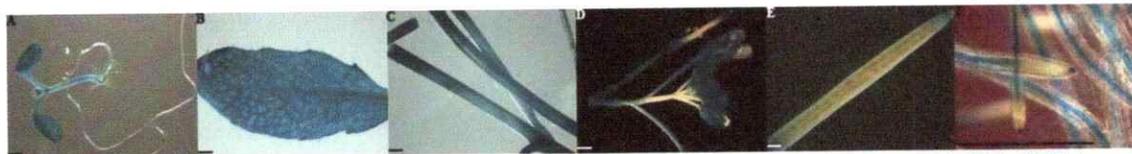


Figura 10. Patrón de tinción representativo de la línea 2 de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS durante su desarrollo. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

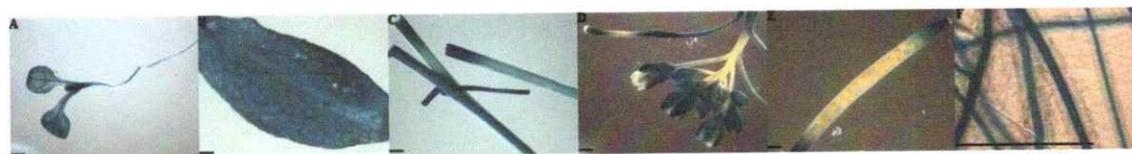


Figura 11. Patrón de tinción representativo de la línea 3 de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS durante su desarrollo. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

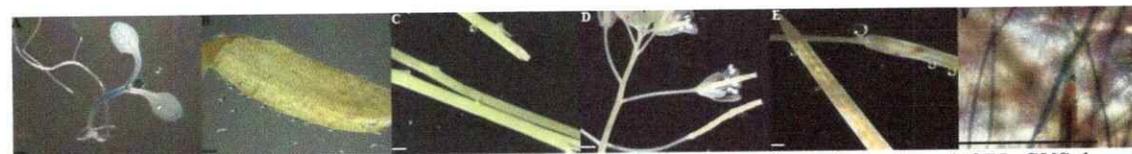


Figura 12. Patrón de tinción representativo de la línea 4 de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS durante su desarrollo. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

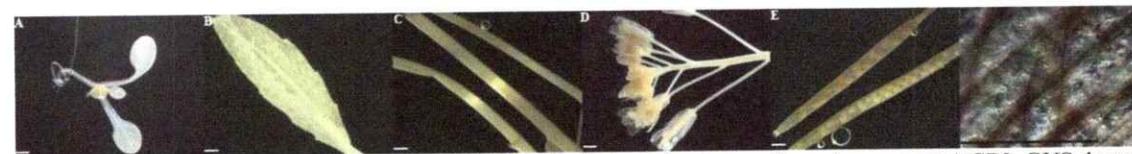


Figura 13. Patrón de tinción representativo de la línea 5 de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS durante su desarrollo. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

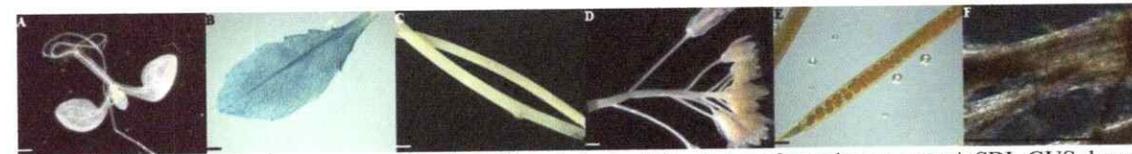


Figura 14. Patrón de tinción representativo de la línea 6 de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS durante su desarrollo. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

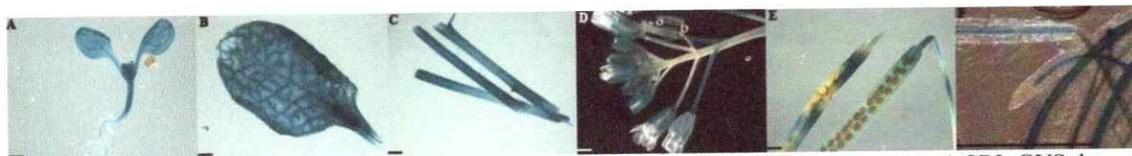


Figura 15. Patrón de tinción representativo de la línea 7 de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS durante su desarrollo. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

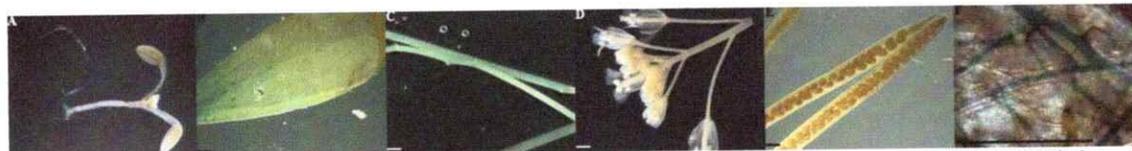


Figura 16. Patrón de tinción representativo de la línea 8 de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS durante su desarrollo. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

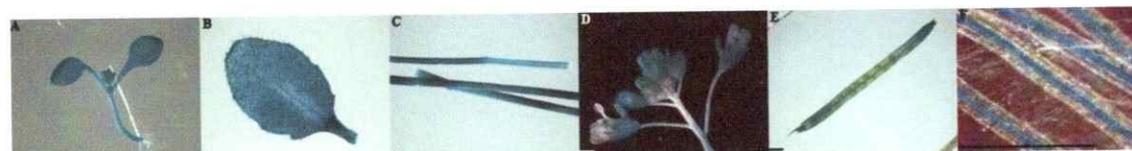


Figura 17. Patrón de tinción representativo de la línea 9 de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS durante su desarrollo. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

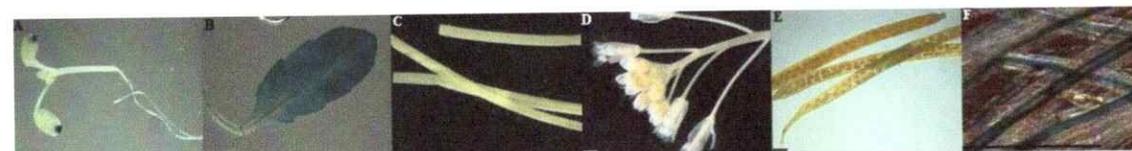


Figura 18. Patrón de tinción representativo de la línea 10 de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS durante su desarrollo. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

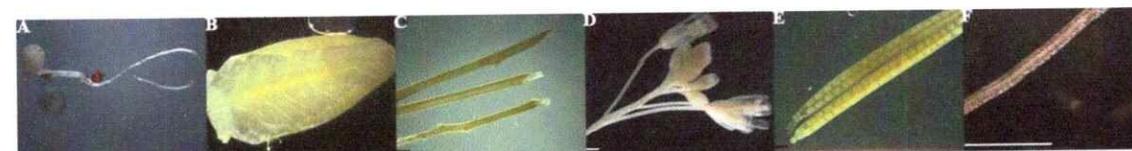


Figura 19. Patrón de tinción representativo de plantas silvestres. A, plántula de 1 semana; B, hoja de 2-4 semanas; C, tallo de 5-8 semanas; D, flores de 5-8 semanas; E, silicua de 5-8 semanas; F, raíz de 3-8 semanas. Las barras miden 1 mm.

Como puede observarse en las Figuras 9-18, no existe un único patrón de tinción en las 10 líneas analizadas. Sin embargo, 5 líneas sí muestran el mismo patrón de expresión del gen reportero entre sí (Figuras 9, 10, 11, 15, 17), en tanto que las otras líneas muestran patrones distintos (Figuras 12, 13, 14, 16, 18), lo que podría estar relacionado a distintos niveles de expresión del gen reportero empleado (De Buck y cols., 2004; De Buck y

cols., 2007; ver discusión). Por esta razón, se concluyó que el patrón de expresión de *AtSDL* en *Arabidopsis* es el correspondiente al mostrado en las líneas 1, 2, 3, 7 y 9 (Figuras 9, 10, 11, 15, 17).

4.3 Análisis del patrón de expresión de *AtSDL* mediante tinción GUS y herramientas bioinformáticas.

A continuación se evaluó en mayor detalle el patrón de tinción en estas líneas para obtener una mejor visualización de los distintos tejidos teñidos (Figuras 20-23, no se incluyen imágenes de plantas silvestres ya que en la Figura 19 puede verse que en éstas no hay expresión del gen reportero) y se compararon con lo mostrado con la herramienta eFP Browser (Figura 24).

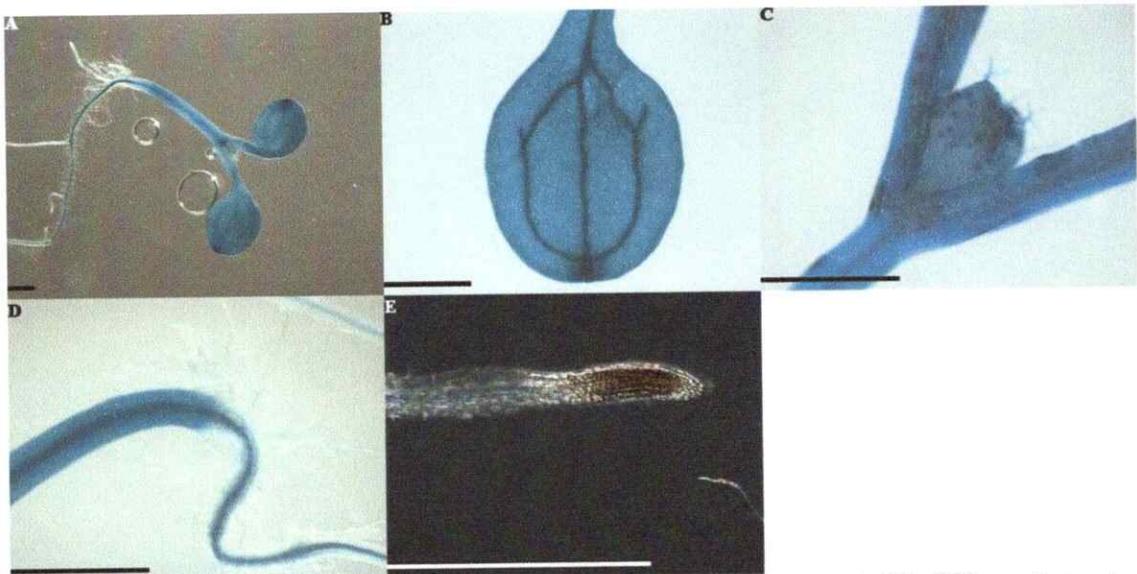


Figura 20. Patrón de tinción representativo de *Arabidopsis* transformada con prom*AtSDL*-GUS en plantas de 1 semana de desarrollo. A, planta completa; B, cotiledón; C, hojas verdaderas; D, sección del término del hipocotilo y comienzo de la raíz; E, raíz. Barra, 1 mm.

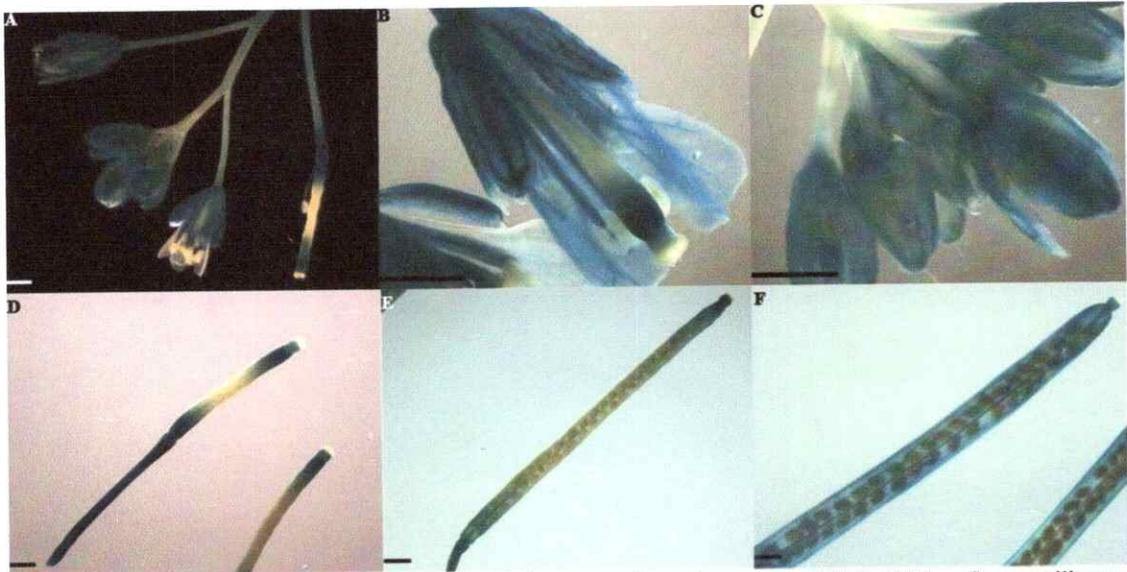


Figura 21. Patrón de tinción representativo de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS en flores y silicuas de plantas de 4-8 semanas de desarrollo. A, flores y botones; B, flor; C, botón; D, E, F, silicuas en distintos estados de desarrollo. Barra, 1 mm.

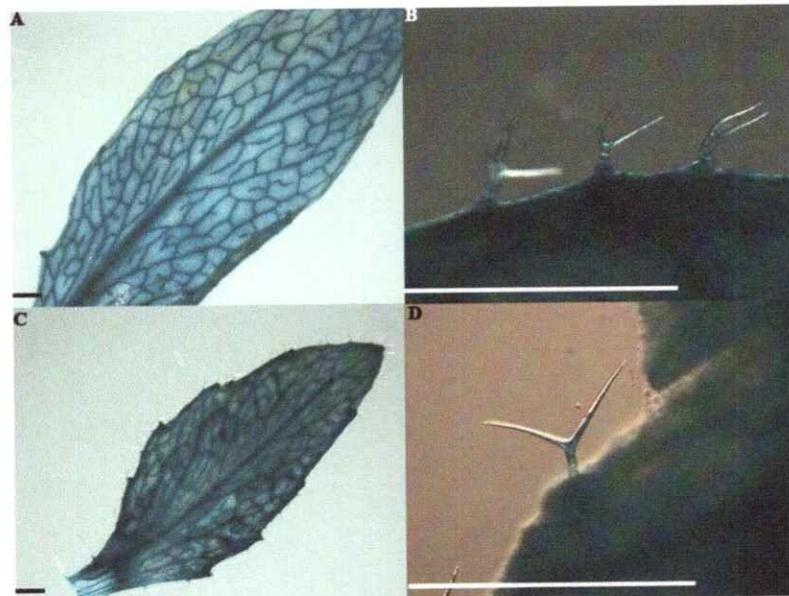


Figura 22. Patrón de tinción representativo de *Arabidopsis* transformada con promAtSDL-GUS en hojas y tricomas de plantas de 2-8 semanas de desarrollo. A, hoja roseta; B, tricoma de hoja roseta; C, hoja caulinar; D, tricoma de hoja caulinar. Barra, 1 mm.

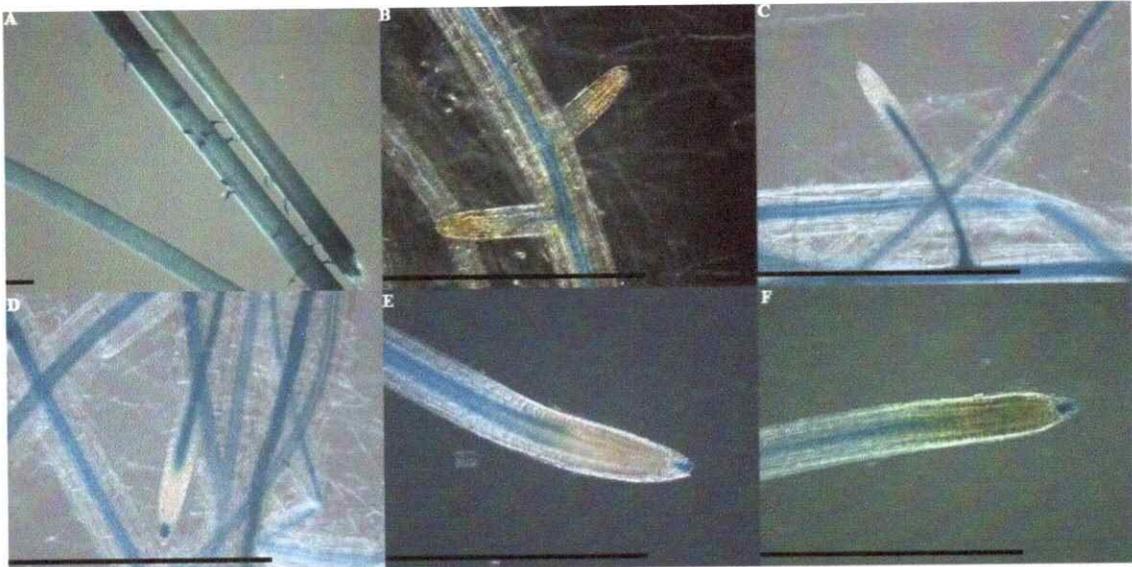


Figura 23. Patrón de tinción representativo de *Arabidopsis* transformada con *promAtSDL-GUS* en tallo y raíz de plantas de 2-8 semanas de desarrollo. A, tallo; B, C, D, E, F, raíz. Barra, 1 mm.

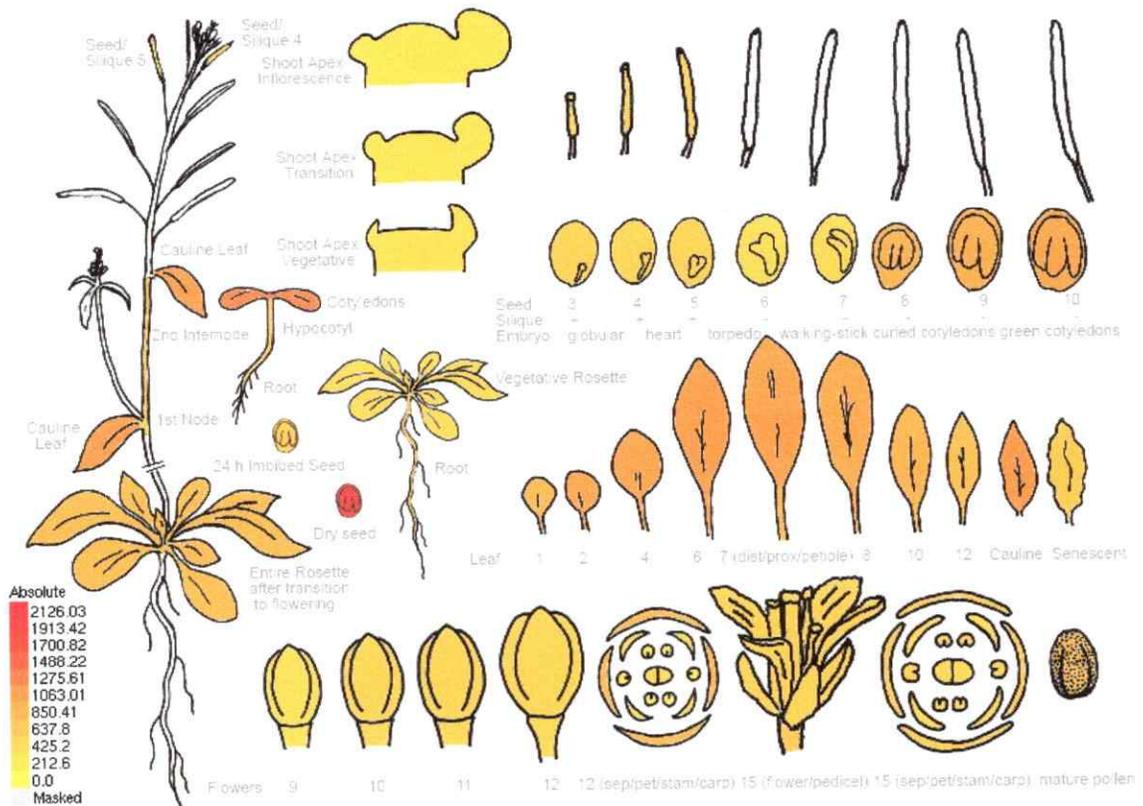


Figura 24. Representación pictográfica del patrón de expresión de *AtSDL* según datos de microarreglos de chips ATH1. Imagen extraída de 142.150.214.117/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi.

Al analizar las Figuras 20-23, se puede ver que la expresión del gen reportero es esencialmente ubicua en la planta durante su desarrollo. En plantas de 1 semana, *AtSDL* se expresa en la totalidad de la planta, siendo la tinción de mayor intensidad en la vasculatura de los distintos órganos (Figuras 20-23). Durante el resto del desarrollo, se puede apreciar que la tinción está presente en todos los órganos y nuevamente se puede observar que es de mayor intensidad en la vasculatura. Las silicuas exhiben un patrón de expresión similar al de los pistilos (Figura 21). Sin embargo, a medida que la silicua va madurando, se puede ver que la tinción se extiende hasta teñir por completo la estructura (Figura 21E-F). En las raíces (Figura 23), se puede observar un caso particular en el que no todas las columelas de las raíces registran la expresión de GUS durante su desarrollo: en plantas de 1 semana de desarrollo no hay tinción de columelas, en tanto que en el resto del desarrollo, las columelas se tiñen en algunos casos, lo que al parecer estaría relacionado con el estado de desarrollo de la raíz, ya que en las raíces secundarias de una longitud menor a los 1 mm, no fue posible ver tinción de estas células (Figura 23B y 23C). Además cabe destacar que no siempre la columela se tiñó por completo, habiendo casos en que la capa más externa de células no muestra expresión de GUS (Figura 23D). Las únicas regiones que nunca muestran tinción son los pelos radiculares y las células inmediatamente anteriores a la columela (zona de elongación y de división celular de la raíz) (Figura 23B-F), el centro del estilo, el estigma y los sacos de polen (Figura 21). Además, en los pétalos la tinción solo puede verse en la vasculatura de los mismos. Por razones técnicas, no fue posible analizar el patrón de expresión del gen reportero en semillas; para teñir estas estructuras se necesitaba de un reactivo cuyo uso es ilegal en Chile, y no se encontró algún protocolo alternativo.

Al analizar la Figura 24 se puede ver que según los datos de microarreglos disponibles, *AtSDL* se expresa de forma ubicua en toda la planta durante todo el desarrollo de ésta, siendo, según la imagen, la mayor expresión del gen localizada en semillas secas, información que no fue posible obtener con el ensayo histoquímico. Los menores niveles de expresión se encuentran a nivel de estambres y estructuras florales (excluyendo los sépalos). Con este tipo de análisis no es posible identificar patrones dentro de los tejidos, como lo es con el ensayo histoquímico (Figuras 9-23). Sin embargo, se puede ver que a grandes rasgos tanto el análisis realizado en el laboratorio como los datos bioinformáticos (Figura 24) arrojan resultados muy similares, respaldando así los resultados del patrón de expresión de *AtSDL* obtenido histoquímicamente.

4.4 Búsqueda de elementos regulatorios en el promotor putativo de *AtSDL* mediante herramientas bioinformáticas.

Para dilucidar qué posibles estímulos regulan la expresión de *AtSDL*, se realizó una búsqueda de elementos reguladores en *cis* en la secuencia en estudio, utilizando la base de datos disponible en PLACE (ver sección 3.7). Este análisis preliminar encontró 53 elementos reguladores en *cis*, cuyas frecuencias se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Elementos-*cis* encontrados en el promotor putativo de *AtSDL* y sus frecuencias respectivas.

Secuencia Elemento	Veces en promAtSDL	Secuencia Elemento	Veces en promAtSDL	Secuencia Elemento	Veces en promAtSDL
AAAG	17	ACTCAT	2	TITGACY	1
YACT	9	TAACAAR	2	TATCCA	1
CTCTT	8	ACTTTG	2	TGTCTC	1
AGAAA	8	TGTCA	2	GGTTAA	1
GRWAAW	8	GAAAAA	2	AACCCA	1
GATA	7	AATAAA	2	TAACAAA	1
TGAC	5	TTATTT	2	TAACARA	1
ATATT	5	GTGA	2	TATTCT	1
CAAT	5	AAATTAACC AA	1	CWWWWW WWWG	1
NGATT	5	AATAGAAA A	1	ACTTTA	1
GATAA	4	TGAAAAC	1	ACACNNG	1
CANNTG	4	TGAGTCA	1	ATAGAA	1
TGACT	3	AATAAAYA AA	1	GGATA	1
WAACCA	3	ACAAAGAA	1	AACCAA	1
TTGAC	3	GNATATNC	1	GAGAC	1
YTCANTYY	3	CAACTC	1	AAACAAA	1
RTTTTTR	3	ATGGTA	1	CAACA	1
TAAAG	3	TTATCC	1		

Es posible observar que hay varios elementos que se repiten múltiples veces en la secuencia del promotor putativo, como los elementos AAAG y YACT, con 17 y 9 repeticiones, respectivamente. Además se puede observar que 17 de los 53 elementos encontrados solo están presentes una vez en la secuencia de estudio. Sin embargo, para determinar qué elementos podrían regular a *AtSDL*, interesa más saber la sobre-representación de los distintos elementos con respecto a todos los promotores del genoma completo de *Arabidopsis*, más que analizar sólo la frecuencia de las distintas

cajas en el promotor, ya que podría ser que por azar algún elemento esté presente muchas veces, lo que es más probable considerando secuencias de pocas pares de bases (como AAAG). Por esta razón, se procedió a analizar la presencia de los elementos de la Tabla IV en los promotores de todos los 27,416 genes de *Arabidopsis*. Para hacer este análisis, se procedió a cortar *in silico* todos los promotores, de manera que todas las secuencias analizadas tuviesen la misma longitud que la clonada en pCAMBIA promAtSDL-GUS (692 pb; sección 3.7). Luego, se analizó la frecuencia de los elementos mostrados en Tabla IV en las 27,416 secuencias mediante PatMatch (sección 3.7) para posteriormente graficar la distribución de la sobre-representación de los distintos elementos (Figura 25).

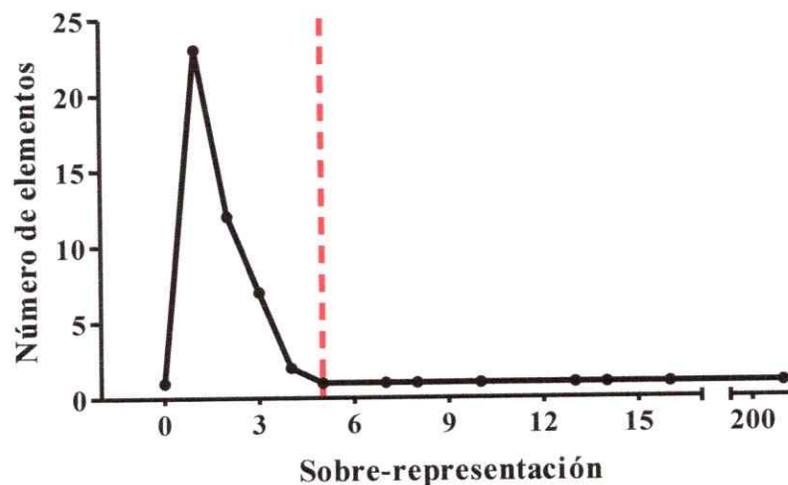


Figura 25. Distribución de la sobre-representación de los elementos-*cis* encontrados en el promotor putativo de *AtSDL*. En el eje de la abscisa están los valores de sobre-representación de todos los elementos *cis*-reguladores encontrados en promAtSDL (mostrados en Tabla IV), y en el eje ordenada, se muestra el número de elementos (N total = 53). De manera que, por ejemplo, hay siete elementos *cis*-reguladores que están tres veces sobre-representados en la secuencia analizada. La línea roja marca la cola de la distribución de frecuencia de elementos en el promotor putativo de *AtSDL*.

Como puede verse en la Figura 25, el 85% de los elementos *cis* encontrados están 1, 2 o 3 veces sobre-representados, en tanto que a partir del elemento que está 5 veces sobre-

representado, hay solo un elemento por cada valor de sobre-representación. Esta característica en la distribución de los datos (similar a una distribución normal o Gaussiana) hace que sea interesante enfocar el análisis en aquellos elementos que se encuentran en la cola de la distribución (hacia la derecha de la línea roja, Figura 25). Los resultados del análisis se resumen en la Tabla V (Tabla completa en anexo).

Tabla V. Sobre-representación de los elementos reguladores en *cis* encontrados en el promotor putativo de *AtSD1* con respecto a los promotores de los genes de *Arabidopsis thaliana*.

Secuencia Elemento	Nombre del Elemento	Promedio de veces en los genes que poseen la caja	Número de genes que poseen la caja	Promedio de		Veces en el promotor putativo de <i>AtSD1</i>	Posición en prom <i>AtSD1</i>	Sobre- representación en prom <i>AtSD1</i> ^b	Descripción	Referencia
				veces en todos los promotores del genoma de <i>Arabidopsis</i> ^a	de					
AAATTAACCAA	L-Box	1,0	101	0,004	1	-631 a -621	269	Respuesta a luz	Giuliano y cols., 1988.	
AATAGAAAA	SURE-1	1,0	1637	0,063	1	-145 a -137	16	Respuesta a sacarosa	Grierson y cols., 1994.	
TGAAAACCT	CEREGLUBOX2	1,0	1820	0,070	1	-324 a -317	14	Expresión específica en endosperma	Shirsat y cols., 1989.	
TGAGTCA	Motivo GCN4	1,1	2055	0,079	1	-267 a -261	13	Expresión específica en endosperma	Wu y cols., 1998.	
AATAAAAYAAA	A-box	1,1	2591	0,100	1	-138 a -129	10	Motivo repetitivo común en las regiones de unión a la matriz nuclear (S/MARs)	Xu y cols., 2010.	
ACAAAGAA	Sin nombre	1,1	3312	0,130	1	-408 a -401	8	Elemento encontrado en genes de expresión en xilema	Ko y cols., 2006.	
GNATATNC	PIBS	1,1	3510	0,141	1	-422 a -415	7	Respuesta a falta de fósforo	Rubio y cols., 2001	
ACTCAT	PREATPRODH	1,2	8296	0,370	2	-670 a -665 y -268 a - 263	5	Respuesta a prolina e hiposomolaridad	Satoh y cols., 2002.	

a, (promedio de veces en los genes que poseen la caja) / Total de genes en *Arabidopsis* (27,416).

b, veces en el promotor putativo de *AtSD1* / promedio de veces en todos los promotores del genoma de *Arabidopsis*.

A partir de esta tabla se puede ver que el elemento L-box, que responde a oscuridad, es el que está mayormente sobre-representado, 269 veces con respecto al promedio de veces que está en el todos los promotores de un longitud igual en el genoma. Además su frecuencia es la misma que la de los 101 genes que poseen al elemento (una vez). A pesar de que elementos que responden a otros estímulos como a sacarosa, falta de fósforo o a condiciones de hipoosmolaridad (estímulos que podrían estar relacionando al sorbitol y algún supuesto rol protector, sección 1.2) también están considerablemente sobre-representados, no se comparan a la sobre-representación del L-box. Por lo tanto, resulta interesante comprobar si la luz (o en su defecto, oscuridad) regula la expresión de *AtSDL*.

4.5 Evaluación de la expresión de *AtSDL* bajo estímulo lumínico.

Para determinar si efectivamente la luz es un factor que regula la expresión de *AtSDL*, se evaluó la expresión del gen reportero GUS para 3 de las 5 líneas que mostraron el mismo patrón de expresión en el ensayo histoquímico GUS (líneas L1, L2 y L3; sección 4.2), bajo un tratamiento (o no) de oscuridad por 0, 1, 3, 6 y 24 horas. En este caso la cuantificación de la expresión de GUS se realizó mediante la medición de la actividad enzimática de GUS al ser incubada con el reactivo MUG (sección 1.4), y se cuantificó la liberación del producto 4-MU (sección 3.9.2). Con el fin de eliminar posibles variaciones en la expresión de los genes por dosis génica, se utilizaron líneas homocigotas para el ADN-T, para lo cual se evaluó la descendencia de plantas de la segunda generación filial, T2 de cada línea. Para ello, las semillas fueron sembradas en medio MS suplementado con higromicina B a una concentración final de 25 µg/mL, y

tras una semana de desarrollo se revisaron las placas. Las placas en donde todas las plantas mostraron un fenotipo de resistencia al antibiótico se tomaron como prueba de la homocigosidad del progenitor y por lo tanto, del resto de las semillas producidas por éste. Una muestra de las reservas de semillas homocigotas fueron sembradas nuevamente en medio MS con higromicina B para corroborar la resistencia al antibiótico en el 100% de los individuos (datos no mostrados).

Los resultados de la cuantificación de la actividad enzimática para cada línea tras el tratamiento de oscuridad se muestran en la Figura 26.

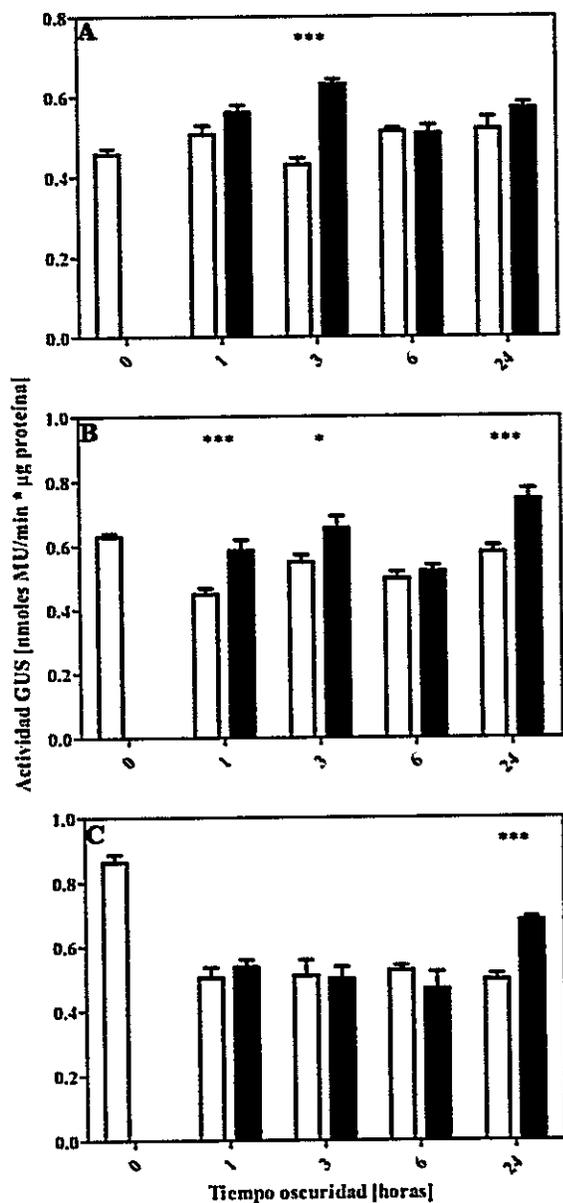


Figura 26. Efecto de la oscuridad sobre la actividad del gen reportero GUS en 3 líneas transformantes homocigotas para el inserto promAtSDL-GUS, tras distintos tiempos de tratamiento. A, L1. B, L2. C, L3. Barras de color blanco, sin tratamiento. Barras de color negro, tratamiento de oscuridad. Se realizó un ANOVA de dos vías con un post test de Bonferroni para ver diferencias entre la actividad GUS sin y con tratamiento para cada tiempo, *, P<0,05. **, P<0,01. ***, P<0,001. Los corchetes indican el error estándar, N=9.

Como puede observarse en la Figura 26, las 3 líneas analizadas responden de manera diferente al mismo estímulo (oscuridad). Por lo tanto, no se puede concluir que *AtSDL* está siendo regulado por luz, sino que otro mecanismo está operando (ver

discusión). Otra forma de comprobar si las diferentes líneas se comportan, o no, de manera similar es analizar si es que las actividades de GUS en las 3 líneas son las mismas a través del tiempo, tanto para los casos con y sin tratamiento, lo cual se muestra en la Figura 27.

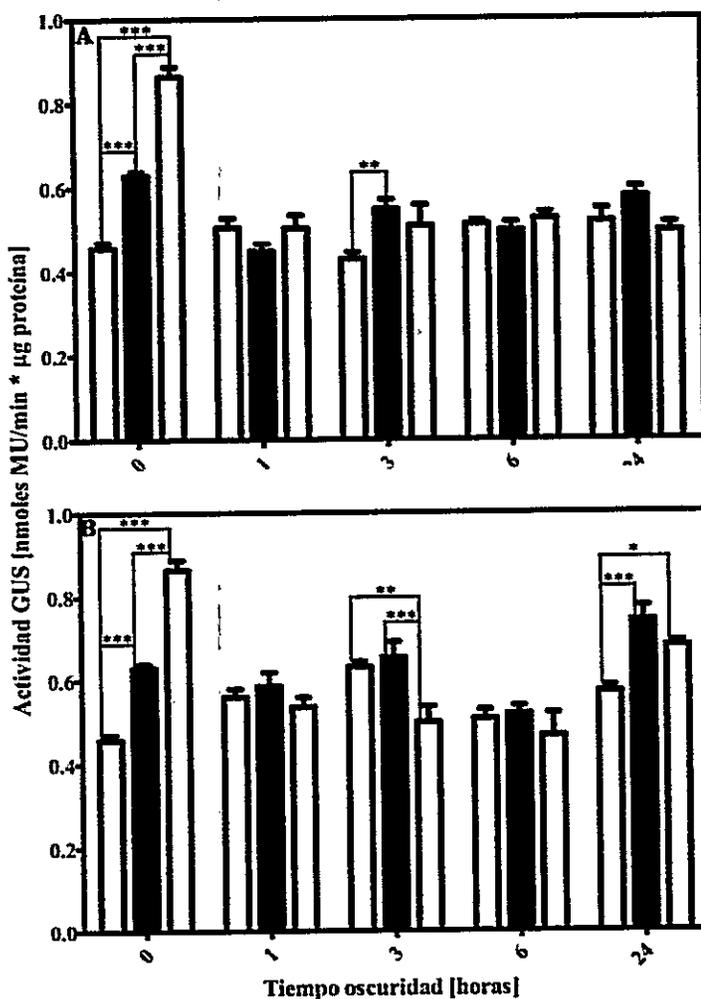


Figura 27. Evaluación de la actividad de GUS en las 3 líneas en estudio. Barras de color blanco, L1. Barras de color negro, L2. Barras de color gris, L3. A, sin tratamiento. B, con tratamiento de oscuridad. Se realizó un ANOVA de dos vías con un post test de Bonferroni. *, P<0,05. **, P<0,01. ***, P<0,001. Los corchetes indican el error estándar, N= 9.

Se puede ver que a tiempo cero hay diferencias significativas estadísticamente entre las 3 líneas. En el resto de los valores sin tratamiento (Figura 27A), solo hay una diferencia

significativa entre L1 y L2 a las 3 horas. Para el caso de las actividades GUS con tratamiento de oscuridad (Figura 27B), se repite la diferencia a tiempo cero (hay que tener en cuenta que para sin y con tratamiento, los datos de tiempo cero son los mismos), y además hay diferencias significativas a tiempo 3 horas de las líneas L1 y L2 con L3, y a tiempo 24 horas de L2 y L3 con L1.

Una última manera en que los datos obtenidos permiten ver variaciones entre las líneas analizadas, es ver el curso temporal de la expresión de GUS, en los datos sin tratamiento (Tabla VI).

Tabla VI. ANOVA de una vía con post test de Tukey para encontrar diferencias significativas entre las actividades GUS para cada línea en estudio, sin tratamiento. Solamente se comparan los resultados intra-línea. *, P<0,05. **, P<0,01. ***, P<0,001. ns, no-significativa

Sin tratamiento	L1 0 hrs.	L1 1 hr.	L1 3 hrs.	L1 6 hrs.	L1 24 hrs.	L2 0 hrs.	L2 1 hr.	L2 3 hrs.	L2 6 hrs.	L2 24 hrs.	L3 0 hrs.	L3 1 hr.	L3 3 hrs.	L3 6 hrs.	L3 24 hrs.
L1 0 hrs.	ns	ns	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1 1 hr.	ns	-	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1 3 hrs.	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1 6 hrs.	ns	ns	*	-	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1 24 hrs.	ns	ns	*	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L2 0 hrs.	-	-	-	-	-	-	***	*	***	ns	-	-	-	-	-
L2 1 hr.	-	-	-	-	-	-	***	**	ns	***	-	-	-	-	-
L2 3 hrs.	-	-	-	-	-	*	**	-	ns	ns	-	-	-	-	-
L2 6 hrs.	-	-	-	-	-	-	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-
L2 24 hrs.	-	-	-	-	-	ns	***	ns	*	-	-	-	-	-	-
L3 0 hrs.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	***	-	ns	ns	ns
L3 1 hr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	***	-	ns	ns	ns
L3 3 hrs.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	***	ns	ns	-	ns
L3 6 hrs.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	***	ns	ns	-	ns
L3 24 hrs.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	***	ns	ns	ns	-

Del análisis de la tabla puede verse que para las 3 líneas ocupadas, hay diferencias significativas a distintos tiempos, y se puede ver que ninguna responde de manera

similar en comparación a las otras líneas. De esta manera se puede concluir finalmente que las 3 líneas transformantes de *Arabidopsis*, homocigotas para el inserto promAtSDL-GUS, no responden de manera equivalente tras el mismo tratamiento de oscuridad. Por lo tanto, mediante esta técnica, no se puede determinar si este estímulo juega un rol en la regulación de la expresión de *AtSDL*, a pesar de la alta sobre-representación del elemento L-box (Tabla V).

5 Discusión

En este seminario de título se estudió el patrón de expresión de *AtSDL*, una sorbitol deshidrogenasa putativa de *Arabidopsis thaliana*, mediante el uso de un constructo que fusiona la región promotora de *AtSDL* al gen reportero GUS (prom*AtSDL*::GUS) en un vector que otorga a las plantas transformantes resistencia al antibiótico higromicina B. Además se realizó una búsqueda bioinformática de elementos *cis*-reguladores utilizando bases de datos de libre acceso, de manera de encontrar posibles estímulos que regulasen la expresión del gen.

5.1 Obtención de líneas transformantes de *Arabidopsis* con el inserto prom*AtSDL*::GUS

El método de selección (crecimiento en higromicina B) elegido permite diferenciar fácilmente entre plantas silvestres y plantas transformantes, debido al marcado retraso en el crecimiento de las primeras (Figura 6, recuadros ampliados), lo que facilita la selección de las plántulas de interés de una manera rápida y eficiente. Del análisis molecular de las supuestas transformantes, 16 de 17 dieron un resultado positivo, en tanto que una de las plantas no mostró el amplificado esperado (Figura 7, carril 5), a pesar de que sí amplificó el gen *GAPA*, lo que indica que la extracción de su ADN era de buena calidad. Una posible explicación para este resultado es que, en el momento de la inserción, el ADN-T haya sufrido una truncación (Hobbs y cols., 1990; Li y cols., 2008), de tal manera que sólo logró insertarse la parte del inserto en donde estaba el gen *hptIII* (otorgando resistencia al antibiótico; Figura 7A), pero no así la región del prom*AtSDL*::GUS, de manera que no pudo ser amplificada por medio del PCR.

Con las 16 líneas obtenidas se obtuvo una eficiencia de transformación del 1,14%, la cual es ~9 veces mayor que la obtenida previamente (0,13%, por Severin, 2007). Además, el 1,14% de eficiencia obtenido concuerda con los valores descritos por diversos autores (Clough y Bent, 1998; Zhang y cols., 2006). Si suponemos que el paso del tiempo afecta por igual a todas las semillas, entonces ésta no puede ser la razón del por qué las semillas obtenidas por Severin dieron una tan baja tasa de transformación. Además estas semillas tuvieron un 88% de germinación (Parada, 2010) de tal manera que la viabilidad de las mismas no fue gravemente afectada por el tiempo (entre 2 y 3 años). Adicionalmente, los valores de la Tabla II indican que el proceso de transformación no afecta la viabilidad de las semillas. Si suponemos también que la transformación fue realizada de la misma manera en 2007 y 2010, la única posible diferencia es el estado de las plantas silvestres al momento de la inmersión en la solución con *Agrobacterium tumefaciens*. Para Clough (1998), esto es un factor sumamente importante, siendo el momento óptimo para realizar la inmersión cuando las plantas tienen pocas flores abiertas y muchos botones, ya que en caso de haber muchas flores y/o silicuas, la tasa de transformación decae drásticamente, obteniéndose frecuencias de transformación cercanas al 0,2%, valor similar al obtenido anteriormente (0,13%). Otros autores recomiendan sacar las flores y silicuas presentes, de manera de dejar solamente los botones al momento de realizar la inmersión floral (Zhang y cols., 2006). Dado los valores de las eficiencias de transformación, y el hecho de que se removieron todas las flores y silicuas y se trató de maximizar el número de botones, ésta puede ser la mejor razón para explicar las diferencias entre las eficiencias de transformación obtenidas en este seminario de título y las obtenidas previamente.

5.2 Determinación del patrón de expresión de *AtSDL*

Con diez de las líneas transgénicas obtenidas (Figura 7) se procedió a realizar el ensayo histoquímico GUS a través del desarrollo de las plantas (8 semanas). Como puede verse en las figuras (Figuras 9-18), cinco de las diez líneas analizadas muestran el mismo patrón de expresión. Sin embargo, las otras cinco muestran patrones de expresión únicos en cada línea, reflejando una gran variabilidad en la expresión del gen reportero entre ellas. Esto concuerda con lo descrito en la literatura (Butaye y cols., 2004; Butaye, 2005; De Bolle, 2003; De Buck y cols., 2004; Hobbs y cols., 1990; Nagaya y cols., 2005; Schubert y cols., 2004), y es la razón por la cual un gran número de líneas independientes debe ser analizado (Butaye y cols., 2005; Thakore y cols., 1999).

Son tres las posibles razones que se pueden mencionar que den cuenta de tales resultados. Primero, uno podría pensar que se requieren de factores de transcripción órgano o desarrollo-específicos para la correcta expresión del gen reportero bajo el promotor putativo de *AtSDL*. En este estudio, esto es poco probable ya que si éste hubiese sido el escenario, el patrón de expresión más representativo de las 10 líneas estudiadas sería uno en el que se tiñesen los mismos tejidos en varias líneas (por ejemplo, solo hojas y raíces). Sin embargo, esta situación no se obtuvo, y en las líneas en que se observan patrones tejido-específicos, estos patrones no se repitieron en el resto de las líneas, sino que más bien son patrones únicos y distintivos para cada una de éstas (Figuras 12, 13, 14, 16, 18). Más importante aún, ninguno de estos patrones concuerda con el análisis pictográfico (Figura 24) o con los antecedentes previos a este seminario de título (Figura 2).

Segundo, a pesar de que la segregación mendeliana de las líneas finalmente estudiadas (resistentes:sensibles, 3:1, datos no mostrados) sugiere una única inserción del ADN-T en el genoma de *Arabidopsis*, de todas formas pueden haberse insertado más de una copia en el mismo locus o en loci muy cercanos, lo que podría explicar la segregación mendeliana obtenida. Uno entonces tendería a pensar que a mayor números de copia existe una mayor expresión del gen reportero: sin embargo, hay bastante literatura que muestra lo contrario (De Bolle y cols., 2003; De Buck y cols., 2004; Fagard y cols., 2000; Hobbs y cols., 1990; Schubert y cols., 2004; Vaucheret y cols., 2001), y en estos casos lo que ocurre es un silenciamiento en la expresión de los genes estudiados. Una posible explicación de este fenómeno, es que al haber un mayor número de copias, existe una mayor probabilidad de que alguna de estas secuencias génicas se encuentre metilada. Entonces, producto de esta metilación se podrían producir ARNs mensajeros aberrantes (anormales, sin cola de poli-A, por ejemplo), lo que daría lugar a un silenciamiento post-transcripcional de todas las copias de transgén insertadas en el organismo (Fagard y cols., 2000). Por otro lado, una maquinaria de defensa en la planta podría detectar múltiples copias del inserto, y este evento daría lugar a una hipermetilación de las secuencias relacionadas (promotor y/o gen), lo que se traduce en silenciamiento transcripcional/post-transcripcional (Fischer y cols., 2008).

Aun suponiendo que se obtuvieron líneas con una sola inserción del ADN-T por genoma, puede haber silenciamiento (Butaye y cols., 2004). Se ha reportado (Matzke y cols., 1998) la inserción en el genoma vegetal de secuencias fuera de los sitios de recombinación LB y RB del vector. Estas secuencias provienen del plásmido utilizado

en la transformación y son de tipo bacteriano, que se caracterizan (en parte) por poseer un mayor contenido GC que las secuencias de tipo eucarionte. Es entonces donde entra en juego la maquinaria defensiva de la célula vegetal, que podría reconocer estas secuencias de origen desconocido, y gatillar así la metilación y silenciamiento de las secuencias relacionadas (Matzke y cols., 2000). También podría ocurrir que el transgén se haya insertado en una región con elementos repetidos y metilados propios del genoma, lo que provocaría la metilación de parte de las secuencias del transgén (Vaucheret y cols., 1998), produciendo su silenciamiento. Por lo tanto, ambas formas de metilación pueden ocasionar la inhibición de la transcripción, o también la producción de ARNs mensajeros aberrantes, dando lugar al fenómeno de silenciamiento post-transcripcional (Eamens y cols., 2008).

Por otro lado, tanto en el caso de múltiples como únicas inserciones pueden dar lugar a la formación de ARN de doble hebra, en el caso en que la inserción haya quedado antisentido con respecto a un promotor endógeno (Sijen y cols., 2000). Así se producirían los ARNs sentido (por efecto de *promAtSDL*) y antisentido (producto del promotor endógeno), que podrían producir ARNs de doble hebra que ahora gatillarían silenciamiento post-transcripcional.

Ninguno de estos casos pudo haber sido reconocido por el PCR empleado para la confirmación de transformantes (sección 3.4.2), ya que fue optimizado para amplificar el fragmento *promAtSDL-GUS* de 1383 pb (Figura 3). Por lo tanto, con el tiempo de extensión de PCR empleado, no sería posible amplificar fragmentos mayores a 1500 pb, así como tampoco sería posible identificar secuencias fuera de los sitios RB y LB.

Cabe mencionar, que si bien los distintos fenómenos de silenciamiento han sido descritos por separado, es posible que en las plantas analizadas esté ocurriendo más de un mecanismo al mismo tiempo, dando cuenta así de los patrones observados.

Una tercera posibilidad es que la causa de la heterogeneidad en la tinción de las distintas líneas es producto del efecto de posición de inserción, el cual se refiere a que la inserción puede haberse realizado en zonas de heterocromatina (una configuración “cerrada” del ADN) o eucromatina (una configuración “abierta” del ADN), de manera que la transcripción se vea inhibida o favorecida, respectivamente (Allen, 2008; van Drunen y cols., 1997). Sin embargo, se descarta esta hipótesis porque en los casos donde se haya insertado en heterocromatina llevarían a una inhibición en la transcripción tanto de *gusA* como de *hptII*. Si esto ocurre, al momento de la selección de las posibles líneas transformantes, es muy probable que se hayan comportado como plantas silvestres y por lo tanto no serían seleccionadas (De Buck y cols., 2004; Gelvin y Kim, 2007; Nagaya y cols., 2005).

Por último hay que destacar que con el alto número de líneas analizadas se logró obtener un patrón de expresión de GUS distintivo, lo que por lo tanto permitió avanzar con los estudios.

5.3 Análisis del patrón de expresión de *AtSDL*

Con las líneas 1, 2, 3, 7 y 9, que tienen el mismo patrón de expresión de GUS a lo largo de las 8 semanas de desarrollo analizadas, se determinó que *AtSDL* se expresa en todos los órganos de la planta durante todo el desarrollo, a excepción de raíces donde sólo se expresa en la vasculatura y la columela (Figura 22) y en los órganos florales, donde no

se expresa en los sacos de polen, estigma, ni en el centro del estilo (Figura 21). Si se compara estos resultados con los de la figura (Figura 24) obtenidos con la herramienta eFP Browser, se observan pequeñas diferencias pero a grandes rasgos es el mismo patrón de expresión. Las diferencias observadas pueden deberse a que cada método mide procesos distintos y además tienen diferentes sensibilidades, permitiendo entonces sacar una conclusión en conjunto de los datos. El ensayo histoquímico GUS permite ver patrones de tinción de órganos de manera cualitativa, en donde lo que se está registrando es la actividad de una enzima, que es el paso final de una serie de eventos, como la transcripción del gen *gusA*, la estabilidad de los transcritos en el citoplasma, la eficiencia de la traducción de dichos transcritos en los ribosomas, la estabilidad del péptido sintetizado y la disponibilidad del sustrato X-gluc en los distintos tejidos, entre otros. Esta técnica tiene la ventaja de que permite la visualización fácil del producto de la degradación del X-gluc en la planta, permitiendo ver la distribución de la actividad en cada tejido. Sin embargo, al ser cualitativo no se puede determinar en qué tejido hay una mayor actividad. En cambio el eFP Browser, que utiliza una base de datos de microarreglos (Winter y cols., 2007), tiene la capacidad de cuantificar los niveles de ARN mensajero en cada órgano examinado, de manera de que otorga una información que el ensayo histoquímico GUS no puede entregar. Pero este método mide solo la estabilidad de los transcritos del gen analizado, lo que no necesariamente se ve reflejado en la actividad enzimática final. Además, el uso de microarreglos permite saber en qué órganos se expresa el gen, pero no permite saber el patrón de expresión dentro del órgano o tejido mismo, información que el ensayo histoquímico GUS sí proporciona. De esta forma, se puede suponer por ejemplo, que en la Figura 24, donde se ve expresión en

los sacos de polen, podría corresponder a la región de la antera (Figura 21) que sujeta los granos de polen y sí muestra expresión de GUS. Lo que es también importante es que ambos métodos de análisis de datos muestran los mismos resultados que trabajos anteriores en *AtSDL* (Figura 2, Mandujano, 2010). De esta forma se puede decir que *AtSDL* se expresa en todos los órganos de *Arabidopsis* y que su mayor nivel de expresión se localizaría en semillas secas. Una situación que nos llamó la atención fue la expresión del gen reportero a nivel de raíces, donde pudimos constatar tinción de las células de la columela. Las células de la columela acumulan gránulos de almidón en amiloplastos, los cuales están relacionados con sensar el vector de gravedad en el gravitropismo (Miyazawa y cols., 2009). Sin embargo, se ha observado que la columela también es responsable de sensar el gradiente de humedad en el hidrotropismo. Se ha visto que cuando la punta de la raíz sigue el gradiente de humedad en una orientación que no sigue el vector de gravedad, los gránulos de almidón de los amiloplastos se degradan rápidamente (Eapen y cols., 2005; Miyazawa y cols., 2009; Ponce y cols., 2008; Takahashi y cols., 2003), mediante un mecanismo desconocido. En la degradación del almidón, se produce glucosa-6-P (Neuhaus y Schulte, 1996), parte de la cual podría ser convertida a sorbitol (Figura 1), y de esta manera *AtSDL* podría convertir el sorbitol en fructosa y evitar así la inducción de estrés osmótico en las células.

El patrón de expresión de *AtSDL* concuerda con el de algunas isoformas de *MdSDH* de manzana que se ha reportado que se expresan tanto en órganos fuente como sumidero (por ejemplo *MdSDHI*, Park y cols., 2002), y también concuerda con el patrón de expresión de *LeSDH*, el cual se expresa de forma ubicua en tomate (Ohta y cols., 2005).

Es difícil dilucidar un rol para *AtSDL* en toda la planta en condiciones normales, ya que falta información sobre su actividad enzimática *in vivo*. Sin embargo, la degradación del almidón en la planta puede ser la clave para entender una posible función de la enzima, dado que se expresa en toda la planta en las condiciones control (por ejemplo, Figuras 9 y 24). Se ha descrito que la degradación del almidón ocurre principalmente por la noche con el objetivo de mantener un flujo de sacarosa en ausencia de fotosíntesis (Orzechowski, 2008). Sin embargo, podría ocurrir que parte del almidón sintetizado en el día sufra degradación (ya que el resultado neto es una acumulación de almidón), produciéndose glucosa-6-P (Neuhaus y Schulte, 1996). Parte de ésta podría ser convertida en sorbitol por la S6PDH y así *AtSDL* puede convertir el sorbitol producido a fructosa de manera de sintetizar sacarosa por un camino alternativo, además de mantener las concentraciones de sorbitol bajas en la célula, porque si bien el sorbitol está catalogado como soluto compatible (Loescher y cols., 2000; Smirnov y Cumbes, 1989), se ha reportado en tabaco y caquis transgénicos capaces de sintetizar este compuesto, que el exceso de sorbitol puede provocar enanismo en las plantas y un estado de estrés permanente (Gao y cols., 2001; Sheveleva y cols., 1998). Como consecuencia, elevadas concentraciones de sorbitol por períodos prolongados podrían terminar siendo perjudiciales para las especies que no translocan este poliol, como *Arabidopsis*. Esto supondría un mecanismo alternativo para la síntesis de sacarosa en *Arabidopsis*, y necesita de mayor información para ser corroborado. Un posible análisis a seguir sería el uso de mutantes que sobre-expresen o también que no tengan expresión de *AtSDL* (Aguayo, en progreso), de manera de poder ver cambios en la respuesta hidrotópica, o posibles cambios en la producción de sacarosa por parte de las plantas.

5.4 Determinación de la actividad GUS bajo condiciones de oscuridad

Del análisis de la región promotora putativa de *AtSDL* se puede ver que varios tipos de estímulos podrían estar jugando un papel en la regulación de la expresión del gen. El que más llama la atención es el L-box (Giuliano y cols., 1988), que está 269 veces sobre-representado en comparación al promedio del genoma de *Arabidopsis* (Tabla V). El L-box es un elemento que se encuentra en varios de los genes de la familia RBCS (gen de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxygenasa) de tomate (Borello y cols., 1993; Giuliano y cols., 1988; Ueda y cols., 1989) y que, a pesar de no estar funcionalmente caracterizado, proteínas de un extracto proteico de hojas y cotiledones son capaces de unir a esta secuencia (Manzara y cols., 1991). Cuando se procedió a probar la regulación por luz (con un tratamiento de oscuridad a distintos tiempos, sección 3.9) se vio que las líneas analizadas se comportaban de manera distinta frente al mismo estímulo (Figura 26 y 27), además de que sin tratamiento también la actividad de GUS era diferente (Tabla VI, Figura 27A). Esta dispersión en los datos no permite saber si la luz regula o no la expresión de *AtSDL*. Una posible razón de la variación entre líneas es que el contexto génico en el cual las secuencias se insertaron responda de forma diferente a la luz (Butaye y cols., 2005), así como la falta de otras secuencias específicas para que *AtSDL* pueda responder de forma "normal" al estímulo de oscuridad (como potenciadores o inhibidores específicos situados fuera de la región clonada). Por esta razón, se decidió no seguir analizando el resto de las condiciones de la Tabla V, ya que era probable que las plantas tampoco respondieran similarmente a los distintos estímulos.

5.5 Análisis de la sobre-representación de distintos elementos en el promotor putativo de *AtSDL*

La única mutación encontrada en la secuencia promotora clonada, causó la eliminación de un posible sitio regulador por luz (GRWAAW, Tabla IV), sin embargo, si hubiera estado presente, no habría superado el umbral que se consideró para analizar los elementos (datos no mostrados considerando la presencia del elemento eliminado con la mutación, Figura 25).

De todas formas, el análisis de la Tabla V permite asociar a *AtSDL* a un posible rol frente a estrés de tipo abiótico, ya que los dos motivos mayormente sobre-representados (L-box y SURE-1) sugieren regulación por luz (Manzara y cols. 1991) y sacarosa (Grierson y cols., 1994) respectivamente, estímulos que han sido asociados a un aumento en la aclimatación al frío en *Arabidopsis* (Rekarte-Cowie y cols., 2008). Adicionalmente, el elemento SURE-1 se encuentra en genes de *Arabidopsis* que aumentan su expresión tras la aplicación exógena de sacarosa, glucosa y fructosa (Khoshnoodi y cols., 1998).

Los dos motivos siguientes en orden de sobre-representación corresponden al CEREBLUBOX2 y al motivo GCN4, ambos relacionados con expresión específica en endosperma (Shirsat y cols., 1989; Washiday cols., 1999; Wu y cols., 1998). Aunque no se ha demostrado que estos elementos regulen algún gen de *Arabidopsis*, la expresión de *AtSDL* se ha encontrado en semillas en éste (Figura 24) y trabajos anteriores (Figura 2, Mandujano, 2010).

El A-box es un elemento repetitivo encontrado comúnmente en los sitios de unión a la matriz nuclear (S/MARs, van Drunen y cols., 1997). Estos sitios pueden medir desde 100 pb a varios kilobases de largo y se cree que delimitan las regiones activas transcripcionalmente de las inactivas transcripcionalmente (Allen y cols., 2005; Fukuda, 1999). Los S/MARs a pesar de tener varios tipos de elementos comunes, no tienen una estructura definida, y el A-box ha sido encontrado en regiones intergénicas anteriormente (van Drunen y cols., 1997). De tal forma que en este caso, el A-box presente en el promotor putativo de *AtSDL* no estaría indicando la presencia de un S/MARs en la región y podría ser producto de la distribución azarosa que tienen los elementos.

También hay un motivo de expresión en xilema, el que si bien no está funcionalmente caracterizado, se encuentra en genes de expresión xilemática, cuyos patrones de expresión son similares al de *AtSDL* en la vasculatura de las plantas analizadas (Figuras 20-23, Ko y cols., 2006).

El elemento de respuesta a prolina e hipoosmolaridad PREATPRODH, también sitúan a *AtSDL* como un gen de respuesta a frío ya que si bien el elemento está relacionado con el aumento de expresión génica en condiciones hipoosmolares (lo que se cree que provoca un aumento de prolina), se ha visto que plantas de *Arabidopsis* capaces de acumular prolina tienen una mayor tolerancia al frío (Kishory cols., 2005; Satoh y cols., 2002).

5.6 Consideraciones finales

De esta forma los análisis realizados permiten dilucidar un posible rol de *AtSDL* tanto en condiciones normales, en la degradación del almidón, como frente al estrés por frío. Este posible rol se ve favorecido por el hecho de que en tratamientos con frío se ha visto un aumento de sorbitol en *Arabidopsis thaliana* (Kaplan y cols 2004) el cual posteriormente debe ser metabolizado, y aquí es donde podría actuar *AtSDL*. Sin embargo, es necesario hacer otros tipos de análisis que permitan determinar cuáles condiciones son las que efectivamente regulan la expresión del gen, lo que podría lograrse mediante PCR en tiempo real para medir las variaciones en los niveles del transcrito de *AtSDL*, con la ventaja de que con este método, usando plantas silvestres, no es necesario aislar el promotor de su contexto original, eliminando así las variaciones en la expresión debido a los factores ya nombrados.

También se debe tener en cuenta que la mayoría de los elementos *cis* descritos en la literatura son responsables de aumentos en los niveles de transcripción. Se ha descrito que la búsqueda de elementos que repriman la transcripción ha sido infructuosa (Suzuki y cols, 2005), de tal manera que no se puede descartar un rol de *AtSDL* frente a estrés salino, por ejemplo, en donde se ha visto que los niveles de expresión de los genes *SDH* disminuyen en *Plantago mayor* (Pommerrenig y cols., 2007).

Otro punto a considerar en el análisis es que la región del promotor seleccionada (Figura 3) no es necesariamente la única responsable de la regulación en la expresión de *AtSDL*. Se debe considerar que no se logró clonar la región 3'UTR completa del locus adyacente *At5g51960* (de función desconocida), que podría formar parte del promotor

de *AtSDL* (sección 1.4). De haberse logrado, se hubieran agregado al análisis preliminar de los elementos *cis*-reguladores (Tabla IV) dos nuevos elementos de expresión específica en semillas (datos no mostrados). Asimismo, se ha descrito que elementos reguladores pueden encontrarse río abajo del inicio de la traducción, incluso hasta el primer intrón (Rombauts y cols., 2003). Cabe destacar que aunque el promotor promedio en *Arabidopsis* mide entre 1,1 y 1,7 kb promedio (Kristiansson y cols., 2009), no se pudo aislar una secuencia tan larga en el caso de *AtSDL* ya que se incorporaría la región codificante del gen adyacente al analizar cualquier secuencia mayor a ~700 pb, complicando la interpretación de los resultados. Además, existen potenciadores e inhibidores de la transcripción que pueden localizarse varios kilobases río arriba o abajo del gen que regulan, de tal manera que los resultados obtenidos proporcionan una visión parcial de la expresión de *AtSDL*. Esto hace evidente la necesidad de implementar otras técnicas o de realizar otras construcciones que abarquen distintas secuencias a lo largo de la vecindad del locus At5g51970, para complementar este estudio del patrón de expresión de *AtSDL*.

6 Conclusiones

La identificación de un marco de lectura codificando una posible sorbitol deshidrogenasa putativa en *Arabidopsis* despertó las dudas sobre la función de los polioles en plantas que no translocan alcoholes de azúcar. Evidencia que apunta a que la regulación de la actividad de enzimas SDH de otros organismos se regula a nivel transcripcional, hizo evidente la necesidad de estudiar la secuencia promotora del gen. Para ello, se generó un constructo que fusiona el promotor putativo de *AtSDL* con un gen reportero, llamado prom*AtSDL*::GUS. La transformación estable de *Arabidopsis* con un vector binario que lleva el constructo reveló variación en los perfiles de la actividad de GUS entre las líneas transformantes obtenidas. Sin embargo, el alto número de transformantes analizados permitió obtener cinco líneas con un patrón similar, mostrando una expresión esencialmente ubicua. Este patrón está en concordancia con lo obtenido en trabajos previos y con los datos obtenidos desde bases de datos de microarreglos en condiciones normales de crecimiento. *AtSDL* es un gen que se expresa a lo largo de toda la planta durante su desarrollo, y este patrón se repite en otras plantas que no translocan sorbitol, como tomate, y en el gen que codifica para una de las isoformas de SDH de manzana, que sí transloca al poliol.

Análisis bioinformáticos de la secuencia promotora revelaron distintos estímulos como posibles reguladores de su expresión, siendo un motivo de regulación por luz el más sobre-representado en comparación a todos los promotores en el genoma de *Arabidopsis*. Tras exponer a los transformantes obtenidos a un tratamiento de oscuridad por distintos tiempos, no se logró obtener un resultado concluyente en cuanto a la

regulación de la actividad GUS por la oscuridad, así como tampoco se logró obtener la misma actividad GUS en las mismas líneas transformantes sin tratamiento (condiciones control). Sin embargo, el conjunto de estímulos encontrados da indicios de la participación de *AtSDL* en mecanismos gatillados por estrés por frío, de tal forma que se hacen necesarios utilizar otros métodos de análisis que permitan dilucidar la participación de *AtSDL* bajo distintos estímulos (luz, exposición a azúcares, falta de fosfato, condiciones hipoosmolares, etc).

7 Proyecciones

- Hacer nuevas construcciones que fusionen al gen reportero GUS con regiones promotoras putativas de *AtSDL* de distintas longitudes, para confirmar los patrones de expresión obtenidos y realizar nuevos análisis bioinformáticos que puedan indicar estímulos adicionales que este trabajo no haya encontrado.
- Medir mediante PCR en tiempo real los niveles del transcrito de *AtSDL* bajo distintos estímulos, basados en los análisis bioinformáticos realizados en este seminario de título y en lo que se sabe acerca de la regulación de genes *SDH* descritos en la literatura.
- Analizar mutantes sobre-expresores y sin la capacidad de expresar *AtSDL*, de manera de constatar cambios en el metabolismo de la planta que evidencien el rol que *AtSDL* desempeña en condiciones con y sin estrés.

8 Presentaciones

- Metabolismo de sorbitol en plantas no rosáceas. Ampuero D., **Parada R.**, Mandujano P., Aguayo F. y Handford M. 61 Congreso Agronómico de Chile. Santiago, 26 al 29 de septiembre de 2010. Chile.
- Caracterización de una supuesta Sorbitol Deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana*, *AtSDL*. Ampuero D., **Parada R.**, Mandujano P., Aguayo F. y Handford M. XXXIII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. Chillán, 28 de septiembre al 1 de octubre 2010. Chile.
- Expression and biochemical analysis of *AtSDL*, a putative Sorbitol Dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. **Parada R.**, Ampuero D., Aguayo F., Mandujano P., Utz D., Handford M. V Reunión de Biología Vegetal. Olmué, 1 al 3 de diciembre 2010. Chile
- Expression and biochemical analysis of *AtSDL*, a putative sorbitol dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. Ampuero D., Aguayo F., **Parada R.**, Mandujano P., Handford M. Society for Experimental Biology, Annual Main Meeting. Glasgow, 1 al 4 de julio 2011. Reino Unido.

9 Referencias

- Allen, G. (2009). The Role of Nuclear Matrix Attachment Regions in Plants. *En Functional Organization of the Plant Nucleus*, 101-129.
- Allen, G. C., Spiker, S., y Thompson, W. F. (2005). Transgene integration: use of matrix attachment regions. *En Methods in molecular biology*, **286**: 313-326.
- The Arabidopsis Genome Initiative.(2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**: 796-815.
- Archbold, D. D. (1999). Carbohydrate availability modifies sorbitol dehydrogenase activity of apple fruit. *Physiologia Plantarum*. **105**: 391-395
- Bellaloui, N., Brown, P., y Dandekar, A. (1999). Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant physiology*, **119**: 735-42.
- Borello, U., Ceccarelli, E., y Giuliano, G. (1993). Constitutive, light-responsive and circadian clock-responsive factors compete for the different 1 box elements in plant light-regulated promoters. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, **4**: 611-619.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**: 248-254.
- Brown, P., Bellaloui, N., Hu, H., y Dandekar, A. (1999). Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency. *Plant physiology*, **119**: 17-20.
- Butaye, Kathleen M J, Goderis, I. J. W. M., Wouters, P. F. J., Pues, J. M.-T. G., Delauré, S. L., Broekaert, W. F. (2004). Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **39**: 440-449.
- Butaye, Kathleen M.J., Cammue, Bruno P., Delauré, S. L., y De Bolle, Miguel F.C. (2005). Approaches to Minimize Variation of Transgene Expression in Plants. *Molecular Breeding*, **16**: 79-91.
- Carey, E. E., Dickinson, D.B., Wei, L. Y., y Rhodes, M. (1982). Occurrence of sorbitol in *Zea mays*. *Phytochemistry*, **21**: 1909-1911.
- Chang, W.-C., Lee, T.-Y., Huang, H.-D., Huang, H.-Y., y Pan, R.-L. (2008). PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC genomics*, **9**: 561-565.
- Clough, S. J., y Bent, F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **16**: 735-743.

- Craigon, D. J., James, N., Okyere, J., Higgins, J., Jotham, J., y May, S. (2004). NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic acids research*, **32**: 575-577.
- Cuin, T. A., y Shabala, S. (2008). Compatible solutes mitigate damaging effects of salt stress by reducing the impact of stress-induced reactive oxygen species. *Plant signaling y behavior*, **3**: 207-8.
- De Bolle, M. (2003). Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, **165**: 169-179.
- De Buck, S., Windels, P., De Loose, M., y Depicker, A. (2004). Single-copy T-DNAs integrated at different positions in the *Arabidopsis* genome display uniform and comparable beta-glucuronidase accumulation levels. *Cellular and molecular life sciences*, **61**: 2632-2645.
- De Buck, Sylvie, Peck, I., De Wilde, C., Marjanac, G., Nolf, J., De Paepe, A. (2007). Generation of single-copy T-DNA transformants in *Arabidopsis* by the CRE/loxP recombination-mediated resolution system. *Plant physiology*, **145**: 1171-1182.
- Deguchi, M., Bennett, A. B., Yamaki, Shohei, Yamada, Kunio, Kanahama, K., y Kanayama, Y. (2006). An engineered sorbitol cycle alters sugar composition, not growth, in transformed tobacco. *Plant, cell y environment*, **29**: 1980-1988.
- Dinant, S., y Lemoine, R. (2010). The phloem pathway: new issues and old debates. *Comptes rendus biologiques*, **333**: 307-19.
- Drunen, C. M. van, Oosterling, R. W., Keultjes, G. M., Weisbeek, P. J., Driel, R. van, y Smeekens, S. C. (1997). Analysis of the chromatin domain organisation around the plastocyanin gene reveals an MAR-specific sequence element in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic acids research*, **25**: 3904-3911.
- Eamens, A., Wang, M.-B., Smith, N. a, y Waterhouse, P. M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant physiology*, **147**: 456-68.
- Eapen, D., Barroso, M. L., Ponce, G., Campos, M. E., y Cassab, G. I. (2005). Hydrotropism: root growth responses to water. *Trends in plant science*, **10**: 44-50.
- Fagard, M., y Vaucheret, H. (2000). (Trans) gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annual Review of Plant Biology*. **51**:167-94.
- Fischer, U., Kuhlmann, M., Pecinka, A., Schmidt, Renate, y Mette, Michael F. (2008). Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, **53**: 1-10.
- Fukuda, Y. (1999). Characterization of matrix attachment sites in the upstream region of a tobacco chitinase gene. *Plant molecular biology*, **39**: 1051-1062.

- Gao, M, Tao, R, Miura, K., Dandekar, M., y Sugiura, A. (2001). Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant science*, **160**: 837-845.
- Gartland, K. M., McHugh, T., Vitha, S., Benes, K., Irvine, R. J., y Gartland, J. S. (2000). Analysis of genetically modified plant gene expression using GUS fluorimetry. *Molecular biotechnology*, **14**: 235-239.
- Gehring, M., y Henikoff, S. (2007). DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochimica et biophysica acta*, **1769**: 276-286.
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool*. Society, **67**: 16-37.
- Gelvin, S. B., y Kim, S.-I. (2007). Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. *Biochimica et biophysica acta*, **1769**: 410-421.
- Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V. S., Timko, M. P., Scolnik, P., y Cashmore, R. (1988). An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**: 7089-7093.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., y Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research*, **27**: 297-300.
- Hobbs, S. L., Kpodar, P., y DeLong, C. M. (1990). The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant molecular biology*, **15**: 851-864.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., y Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase. *EMBO Journal*, **6**: 3901-3907.
- Jefferson, R. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *EnPlant Molecular Biology Reporter*, **5**: 387-405.
- Kanamaru, N. (2004). Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA. Switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. *Plant Science*, **167**: 55-61.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N. (2004). Exploring the Temperature-Stress Metabolome. *Plant Physiology*, **136**: 4159-4168.
- Karcher, S. J. (1995). Blue Plants : Transgenic Plants With The Gus Reporter Gene. **23**: 29-42.
- Khoshnoodi, J., Larsson, C., Larsson, H., y Rask, L. (1998). Sbe 2.2 transcripts in response to light. *Plant Science*, **135**: 183-193.

- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **50**: 347-363.
- Kim, H., Ahn, J., Choi, J., Hwang, B., y Choi, D. (2007). Expression and cloning of the full-length cDNA for sorbitol-6-phosphate dehydrogenase and NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from pear (*Pyrus pyrifolia* N.). *Scientia Horticulturae*, **112**: 406-412.
- Kishor, P. B. K., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, **88**: 424-438.
- Ko, J.-H., Beers, E. P., y Han, K.-H. (2006). Global comparative transcriptome analysis identifies gene network regulating secondary xylem development in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular genetics and genomics*, **276**: 517-531.
- Kristiansson, E., Thorsen, M., Tamás, M. J., y Nerman, O. (2009). Evolutionary forces act on promoter length: identification of enriched cis-regulatory elements. *Molecular biology and evolution*, **26**: 1299-1307.
- Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *En Methods in molecular biology*, **32**, 9-15.
- Kuo, T. M., Doehlert, D. C., y Crawford, C. G. (1990). Sugar metabolism in germinating soybean seeds: evidence for the sorbitol pathway in soybean axes. *Plant physiology*, **93**: 1514-1520.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, **30**: 325-327.
- Li, J., Brunner, A. M., Meilan, R., y Strauss, S. H. (2008). Matrix attachment region elements have small and variable effects on transgene expression and stability in field-grown *Populus*. *Plant Biotechnology Journal*, **6**: 887-896.
- Loescher, W H, Marlow, G. C., y Kennedy, R. (1982). Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves. *Plant physiology*, **70**: 335-339.
- Loescher, Wayne H. (1987). What's New in Plant Physiology: Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol. Plantarum*, **70**: 553-557.
- Loescher, Wayne H, Everard, J. D., y Lansing, E. (2000). Chapter 12: Regulation of Sugar Alcohol Biosynthesis. *En Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, 275-299.
- Mandujano, P. 2010. Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDL una probable sorbitol deshidrogenasa. Tesis de magíster entregada a la Universidad de Chile. Santiago, Chile.

- Manzara, T., Carrasco, P., y Gruissem, W. (1991). Developmental and organ-specific changes in promoter DNA-protein interactions in the tomato *rbcS* gene family. *The Plant cell*, **3**: 1305-1316.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S. T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C. (1999). AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *The EMBO journal*, **18**: 2066-2073.
- Matzke, M., Mette, M. F., y Matzke, J. (2000). Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant molecular biology*, **43**: 401-415.
- Miyazawa, Y., Ito, Y., Moriwaki, T., Kobayashi, A., Fujii, N., y Takahashi, H. (2009). A molecular mechanism unique to hydrotropism in roots. *Plant Science*, **177**: 297-301.
- Morel, J.-benoit, y Mourrain, Philippe. (2000). DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in Arabidopsis. *Current Biology*, **10**: 1591-1594.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497.
- Nagaya, S., Kato, K., Ninomiya, Y., Horie, R., Sekine, M., Yoshida, K. (2005). Expression of randomly integrated single complete copy transgenes does not vary in *Arabidopsis thaliana*. *Plant y cell physiology*, **46**:438-444.
- Negm, F. B., y Loescher, W H. (1979). Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant physiology*, **64**: 69-73.
- Neuhaus, H. E., y Schulte, N. (1996). Starch degradation in chloroplasts isolated from C3 or CAM (crassulacean acid metabolism)-induced *Mesembryanthemum crystallinum* L. *The Biochemical journal*, **318**: 945-953.
- Noiraud, N. (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39**: 717-728.
- Nosarzewski, M., y Archbold, D. D. (2007). Tissue-specific expression of SORBITOL DEHYDROGENASE in apple fruit during early development. *Journal of experimental botany*, **58**: 1863-1872.
- Ohta, K., Moriguchi, R., Kanahama, K., Yamaki, Shohei, y Kanayama, Y. (2005). Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochemistry*, **66**: 2822-2828.
- Orzechowski, S. (2008). Starch metabolism in leaves. *Acta biochimica Polonica*, **55**: 435-445.
- Palaniswamy, S. K., James, S., Sun, H., Lamb, R. S., Davuluri, R. V., y Grotewold, E. (2006). AGRIS and AtRegNet .A Platform to Link cis-Regulatory Elements and Transcription Factors into Regulatory Networks. *Plant physiology*, **140**: 818-829.

- Parada, R. 2010. Análisis del patrón de expresión de *AtSDL*, una posible sorbitol deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana* y obtención de nuevas líneas transformantes. Unidad de investigación entregada a la Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Park, S. (2002). Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. *Plant Science*, **162**: 513-519.
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., y Sauer, N. (2007). Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant physiology*, **144**: 1029-1038.
- Ponce, G., Rasgado, F., y Cassab, G. I. (2008). Roles of amyloplasts and water deficit in root tropisms. *Plant, cell y environment*, **31**: 205-217.
- Reidel, E. J., Rennie, E., Amiard, V., Cheng, L., y Turgeon, R. (2009). Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant physiology*, **149**: 1601-1608.
- Rekarte-Cowie, I., Ebshish, O. S., Mohamed, K. S., y Pearce, R. S. (2008). Sucrose helps regulate cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, **59**: 4205-4217.
- Rombauts, S., Florquin, K., Lescot, M., Marchal, K., Rouze, P., y Peer, Y. V. D. (2003). Computational Approaches to Identify Promoters and cis-Regulatory Elements in Plant Genomes. *Plant physiology*, **132**: 1162-1176.
- Sakai, A. (1962). Studies on the Frost-Hardiness of Woody Plants; 1. The causal relation between sugar content and frost-hardiness. *Contributions from the Institute of Low Temperature Science*, **11**: 1-40.
- Satoh, R., Nakashima, K., Seki, M., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **130**: 709-719.
- Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., y Bahadur, S. (2004). Silencing in *Arabidopsis* T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. *The Plant Cell*, **16**: 2561-2572.
- Severin, D. 2007. Construcción de un vector para determinar la expresión de *AtSDL*, una posible sorbitol deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*. Unidad de investigación entregada a la Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Shaw, J. R., y Dickinson, D B. (1984). Studies of sugars and sorbitol in developing corn kernels. *Plant physiology*, **75**: 207-211.
- Sheveleva, E., Marquez, S., Chmara, W., Zegeer, A., Jensen, R., y Bohnert, H. (1998). Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. High amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. *Plant physiology*, **117**: 831-839.

- Shirsat, A., Wilford, N., Croy, R., y Boulter, D. (1989). Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Molecular y general genetics*, **215**: 326-331.
- Sijen, T., y Kooter, J. M. (2000). RNAs on the attack or on the defense ? *BioEssays*, **22**: 520-531.
- Smirnoff, N., y Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, **28**: 1057-1060.
- Sousa, S. M. de, Paniago, M. D. G., Arruda, P., y Yunes, J. A. (2008). Sugar levels modulate sorbitol dehydrogenase expression in maize. *Plant molecular biology*, **68**: 203-213.
- Stoop, J., Williamson, J., y Masonpharr, D. (1996). Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, **1**: 139-144.
- Suzuki, M., Ketterling, M. G., y Mccarty, D. R. (2005). Quantitative Statistical Analysis of cis-Regulatory Sequences in ABA / VP1- and CBF / DREB1-Regulated Genes of Arabidopsis. *Plant physiology*, **139**: 437-447.
- Swedlund, B., y Locy, R. D. (1993). Sorbitol as the Primary Carbon Source for the Growth of Embryogenic Callus of Maize. *Plant physiology*, **103**: 1339-1346.
- Takahashi, N., Yamazaki, Y., Kobayashi, A., Higashitani, A., y Takahashi, H. (2003). Hydrotropism Interacts with Gravitropism by Degrading Amyloplasts in Seedling Roots of Arabidopsis and Radish 1. *Society*, **132**: 805-810.
- Tao, R, Uratsu, S. L., y Dandekar, M. (1995). Sorbitol synthesis in transgenic tobacco with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant y cell physiology*, **36**: 525-532.
- Tao, Ryutaro, y Gao, Mei. (2003). Technologies for Improving Tolerance to Environmental Stress : Genetic Engineering of Salt Stress Tolerance in Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) with the Genes Involved in Biosynthesis of Compatible Solute. *Biotechnology*, 307-320.
- Thakore, C. (1999). Characterization of the promoter region and expression pattern of three Arabidopsis protein phosphatase type 2A subunit genes. *Plant Science*, **147**: 165-176.
- Ueda, T., Pichersky, E., Malik, V. S., y Cashmore, R. (1989). Level of expression of the tomato *rbcS-3A* gene is modulated by a far upstream promoter element in a developmentally regulated manner. *The Plant cell*, **1**: 217-227.
- Vaucheret, H., y Fagard, M. (2001). Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in genetics*, **17**: 29-35.

- Vaucheret, H., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B. (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, **16**: 651-659.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 1-9.
- Wang, X.-L., Xu, Y.-H., Peng, C.-C., Fan, R.-C., y Gao, X.-Q. (2009). Ubiquitous distribution and different subcellular localization of sorbitol dehydrogenase in fruit and leaf of apple. *Journal of experimental botany*, **60**: 1025-1034.
- Washida, H., Wu, C. Y., Suzuki, A., Yamanouchi, U., Akihama, T., Harada, K. (1999). Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1. *Plant molecular biology*, **40**: 1-12.
- Wilkinson, J., y Lindsey, K. (1998). Use of the GUS Reporter Gene. *En Recombinant Proteins from Plants*. **3**: 39-47.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., y Provart, N. J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one*, **2**: 718-730.
- Wu, C. Y., Suzuki, A., Washida, H., y Takaiwa, F. (1998). The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, **14**: 673-683.
- Yamada, K, Oura, Y., Mori, H, y Yamaki, S. (1998). Cloning of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit and gene expression. *Plant y cell physiology*, **39**: 1375-1379.
- Yamada, Kunio, Mori, Hitoshi, y Yamaki, Shohei. (1999). Gene Expression of NAD-Dependent Sorbitol Dehydrogenase during Fruit Development of Apple (*Malus pumila* Mill. var. *domestica* Schneid.). *Engei Gakkai zasshi*. **68**: 1099-1103.
- Yamaki, Shohei, y Moriguchi, T. (1988). Seasonal Fluctuation of Sorbitol-related Enzymes and Invertase Activities Accompanying Maturation of Japanese Pear (*Pyrus serotina* Rehder var. *culta* Rehder) Fruit. *Engei Gakkai zasshi*, **57**: 602-607.
- Yan, T., Yoo, D., Berardini, T. Z., Mueller, L., Weems, D. C., Weng, S. (2005). PatMatch: a program for finding patterns in peptide and nucleotide sequences. *Nucleic acids research*, **33**: 262-266.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., y Chua, N.-H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols*, **1**: 641-646.
- Zhou, R., Cheng, L., y Dandekar, A. M. (2006). Down-regulation of sorbitol dehydrogenase and up-regulation of sucrose synthase in shoot tips of the transgenic

apple trees with decreased sorbitol synthesis. *Journal of experimental botany*, 57: 3647-3657.

10 Anexo

Tabla VII. Tabla completa de sobre-representación de los elementos *cis*-reguladores encontrados en la secuencia promAtSDL.

Secuencia Elemento	Promedio de veces en los genes que poseen la caja	Número de genes que poseen la caja	Promedio de veces en el genoma de Arabidopsis	Veces en el promotor putativo de AtSDL	Sobre-representación
AAATTAACCAA	1,0	101	0,00	1	268,76
AATAGAAAA	1,0	1637	0,06	1	16,00
TGAAAAGT	1,0	1820	0,07	1	14,39
TGAGTCA	1,1	2055	0,08	1	12,59
AATAAAAYAAA	1,1	2591	0,10	1	9,95
ACAAAGAA	1,1	3312	0,13	1	7,67
GNATATNC	1,1	3510	0,14	1	7,12
ACTCAT	1,2	8296	0,37	2	5,40
CAACTC	1,2	6522	0,28	1	3,61
TAACAAR	1,3	11732	0,57	2	3,50
ACTTIG	1,4	11809	0,58	2	3,42
ATGGTA	1,2	6878	0,30	1	3,35
CICIT	2,9	24715	2,65	8	3,02
TTATCC	1,2	7878	0,35	1	2,89
TITGACY	1,2	7990	0,36	1	2,77
TATCCA	1,3	8542	0,39	1	2,54
TGTCTC	1,2	8791	0,40	1	2,50
GGTTAA	1,3	8787	0,41	1	2,45
TGACT	1,8	18700	1,23	3	2,43
AACCCA	1,3	9152	0,43	1	2,32
TAACAAA	1,3	9636	0,44	1	2,25
WAACCA	1,9	20116	1,43	3	2,10

TIGAC	2,0	20854	1,55	3	1,94
GATAA	2,4	23722	2,12	4	1,89
YTCANIYY	2,0	21514	1,60	3	1,87
CANNTG	2,5	23904	2,18	4	1,83
TAACARA	1,3	11624	0,57	1	1,77
TGTCA	1,8	19088	1,27	2	1,58
TAATCT	1,4	12933	0,66	1	1,52
AAAG	11,7	27202	11,64	17	1,46
CWWWWWWWWG	1,4	15253	0,69	1	1,46
AGAAA	5,6	27029	5,50	8	1,45
AGTTA	1,4	13437	0,70	1	1,42
RTTTTR	2,5	23226	2,11	3	1,42
ACACNG	1,5	13618	0,75	1	1,34
TGAC	4,0	26364	3,81	5	1,31
ATAGAA	1,5	14274	0,76	1	1,31
TAAAG	2,7	24395	2,40	3	1,25
GRWAAW	6,5	27122	6,47	9	1,39
GATA	5,9	27073	5,85	7	1,20
GGATA	1,6	15942	0,92	1	1,08
ATATT	5,0	25511	4,68	5	1,07
YACT	9,0	27190	8,95	9	1,01
AACCAA	1,7	17055	1,04	1	0,96
GAAAAA	2,5	23280	2,11	2	0,95
GAGAC	1,7	17263	1,07	1	0,93
AAACAAA	1,7	17773	1,11	1	0,90
AATAAA	2,7	23292	2,25	2	0,89
TFATTT	2,7	23084	2,31	2	0,87
CAAT	7,9	27180	7,85	5	0,64
NGATT	9,2	27200	9,14	5	0,55
CAACA	2,3	22991	1,97	1	0,51
GTGA	4,8	26872	4,71	2	0,42