

UCH-FC
Biotecnología
C117I
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



~~Estudio de la
variabilidad en
población y clones de *Trichosporon* cruzi por
criterios biológicos inmunológicos y bioquímicos~~
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 la Señorita:

MARÍA SOLEDAD CABRERA MEDINA

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Herman Silva
Director

Dr. Michael Handford
Patrocinante

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Lorena Norambuena
Presidente Comisión

Dr. Liliana Cardemil
Evaluador



Enero de 2011
Santiago – Chile

*Evaluación de la respecta del
promotor AEPH 4*

DEDICATORIA



A Dios y a mi familia



AGRADECIMIENTOS

El presente seminario de título significó para mí un valioso proceso de aprendizaje, y a pesar del esfuerzo demandado, constituyó ante todo, una segunda oportunidad para vencer mis propias limitaciones y para hacer las cosas mejor. Agradezco a muchos, y muy especialmente:

Al Doctor Herman Silva por su asesoría y dirección en el trabajo de investigación. Por su compromiso y dedicación en la corrección del escrito. Y el mérito de ser inspirador de superación, disciplina y esfuerzo.

Al Dr. Enrique Peñaloza de INIA Carillanca, por su colaboración y asesoría en el trabajo de investigación y su disposición para la resolución de problemas y dudas.

A todos mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y disposición, quienes a través de sus preguntas y comentarios, ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Michael Handford por aceptar ser mi profesor patrocinante y por el apoyo brindado para la realización de este seminario.

A la Dra. Lorena Norambuena por su amabilidad, diligencia y certeras correcciones.

A los proyectos FONDECYT 1090571 y (PCB) ICM P06-065-F del Núcleo Milenio en Biotecnología Celular Vegetal, los cuales constituyeron el soporte económico y por lo tanto permitieron, realizar esta investigación.

A la Universidad Andrés Bello, por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo de investigación.

A mi familia por todo su apoyo, comprensión y motivación permanente hacia el logro.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento



INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iv
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	vii
ABREVIATURAS UTILIZADAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El fósforo, problemas derivados del déficit y transportadores de fosfato de alta afinidad.....	1
1.2. El cultivo de trigo en Chile y una estrategia biotecnológica para mejorar la adquisición de fosfato	6
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo general.....	9
3.2. Objetivos específicos.....	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	11
4.1.1. <i>Triticum aestivum</i>	11
4.1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
4.2. Tratamientos experimentales	13
4.2.1. Estrés por baja temperatura (frío)	13
4.2.2. Estrés por baja disponibilidad de oxígeno (hipoxia)	14
4.2.3. Estrés combinado de baja temperatura y baja disponibilidad de oxígeno (frío-hipoxia)	14
4.2.4. Estrés por alta temperatura (calor).....	15

4.2.5. Estrés por sequía.....	15
4.2.6. Estrés combinado de alta temperatura y sequía (calor-sequía).....	16
4.3. Preparación de muestras.....	16
4.4. Ensayo bioquímico para actividad específica GUS	16
4.5. Extracción de RNA total desde plantas de trigo.....	18
4.6. Espectrofotometría y electroforesis en condiciones denaturantes	18
4.7. Real time PCR	19
4.8. Localización histoquímica de la expresión GUS	21
4.9. Cuantificación de fósforo soluble en raíces.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Análisis histoquímico y actividad específica β -glucuronidasa dirigida por el promotor <i>AtPht1;4</i> en distintas líneas de trigo	23
5.2. Expresión de <i>AtPht1;4::GUS</i> en trigo relativo a la disponibilidad de fosfato.....	26
5.3. Localización tisular de la expresión del sistema reportero <i>AtPht1;4::GUS</i> en raíces de trigo en la condición de déficit de fosfato	30
5.4. Análisis <i>in silico</i> de la región promotora <i>AtPht1;4</i> y elementos regulatorios de respuesta a señales medioambientales de estrés	32
5.5. Análisis cuantitativo de actividad y expresión génica GUS en trigo transgénico <i>AtPht1;4::GUS</i> frente a la condición de hipoxia	34
5.6. Análisis cuantitativo de actividad y expresión génica GUS en trigo transgénico <i>AtPht1;4::GUS</i> frente a la condición de alta temperatura	38
5.7. Análisis cuantitativo de actividad y expresión génica GUS en trigo transgénico <i>AtPht1;4::GUS</i> frente a la condición de sequía.....	40
5.8. Análisis cuantitativo de actividad GUS en trigo transgénico <i>AtPht1;4::GUS</i> frente a la combinación de estrés por sequía y alta temperatura.....	42
5.9. Análisis cuantitativo de actividad y expresión génica GUS en trigo transgénico <i>AtPht1;4::GUS</i> frente a la condición de frío	44
6.0. Análisis cuantitativo de actividad y expresión génica GUS en trigo transgénico <i>AtPht1;4::GUS</i> frente a la combinación de estrés por hipoxia y frío.....	46
6. DISCUSIÓN	49
6.1. Evaluación de líneas transgénicas para el promotor <i>AtPht1;4</i> en trigo.....	49
6.2. Evaluación del sistema <i>AtPht1;4::GUS</i> en trigo según el estatus de fosfato	53
6.3. Localización tisular de la expresión de <i>AtPht1;4::GUS</i> en trigo	55
6.4. <i>AtPht1;4::GUS</i> en trigo y su respuesta a los tratamientos experimentales de estrés abiótico	58
6.5. Perspectivas.....	63
7. CONCLUSIONES	65





INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Actividad específica β -glucuronidasa (GUS) en líneas de trigo transgénico para las construcciones *AtPht1;4::GUS* y *AtPht1;4:GUS:Adh*

Figura 2. Tinción histoquímica GUS en muestras representativas de las líneas de *T. aestivum* propuestas para el presente estudio

Figura 3. Análisis RT - PCR semicuantitativo de la expresión génica de la fusión *AtPht1;4::GUS* en la raíz de plantas de *T. aestivum*, según disponibilidad de fosfato

Figura 4. Evaluación de la especificidad de amplificación obtenida mediante qPCR para la expresión génica de *AtPht1;4::GUS* y para el gen de referencia *UBI* en *T. aestivum*

Figura 5. Localización histoquímica de actividad específica GUS en la raíz de plantas transgénicas de trigo portadoras del casete de expresión *AtPht1;4::GUS* frente a déficit de fosfato

Figura 6. Frecuencia de elementos regulatorios *cis* presentes en 3 kb "río arriba" de la secuencia génica *AtPht1;4*

Figura 7. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión génica *Pht1;4::GUS* en respuesta a hipoxia

Figura 8. Niveles de expresión génica *GUS* mediante qPCR en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *Pht1;4::GUS* en la línea IIA292 en respuesta a hipoxia

Figura 9. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión génica *Pht1;4::GUS* en respuesta a alta temperatura

Figura 10. Niveles de expresión génica *GUS* mediante qPCR en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *Pht1;4::GUS* en la línea IIA292 en respuesta a alta temperatura

Figura 11. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión génica *Pht1;4::GUS* en respuesta a sequía

Figura 12. Niveles de expresión génica *GUS* mediante qPCR en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *Pht1;4::GUS* en la línea IIA292 en respuesta a sequía

Figura 13. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión génica *Pht1;4::GUS* en respuesta a la combinación de estrés por alta temperatura y sequía

Figura 14. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *Pht1;4::GUS* en respuesta a estrés por frío

Figura 15. Niveles de expresión génica *GUS* mediante qPCR en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *AtPht1;4::GUS* para la línea IIA292 en respuesta a frío

Figura 16. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *AtPht1;4::GUS* en respuesta a la combinación de estrés por frío e hipoxia

Figura 17. Niveles de expresión génica *GUS* mediante qPCR en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión génica *AtPht1;4::GUS* en la línea IIA292 en respuesta a frío e hipoxia

ABREVIATURAS UTILIZADAS

BSA	Suero albumina bovina
Ct	Ciclo umbral o límite
DEPC	Diethyl-piropcarbonato
DNasa	Enzima desoxirribonucleasa
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
GFP	Proteína fluorescente verde
GUS	Gen para la enzima beta glucuronidasa
MOPS	Ácido morfollno-propano-sulfónico
MU	Metil-umbellferil
MUG	Metil-umbeliferil-glucurónido
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa de tipo cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
Tm	Temperatura de fusión

RESUMEN

La elección de un promotor, según especificidad y el tipo control espacio-temporal que ejerce, tiene una gran importancia en la regulación de transgenes en plantas. El promotor *AtPht1;4* tiene un patrón de expresión de tipo raíz- específico e inducible frente a déficit de Pi, lo cual lo hace sumamente atractivo para la expresión de transgenes en plantas monocotiledóneas de interés comercial, como trigo. Análisis *in silico* de los elementos regulatorios en *cis* presentes en *AtPht1;4* y en otros transportadores de alta afinidad, han sugerido similitud entre los sistemas monocotilédneo y dicotilédneo. Además, *AtPht1;4* presenta elementos regulatorios en *cis* de respuesta a diferentes señales medioambientales, adicionales al déficit de Pi, lo cual sugiere una mayor versatilidad en su respuesta.

Esta tesis se concentró en el estudio de la respuesta del promotor *AtPht1;4* en trigo, frente a señales medioambientales frecuentemente experimentadas por un cultivo en condiciones de campo, tales como, calor, sequía, frío e hipoxia. Mediante un sistema de tipo promotor/gen reportero, *AtPht1;4::GUS*, se evaluó el desempeño de tres líneas (T3) homocigotas. Inicialmente, un importante grado de silenciamiento fue observado en todas ellas. No obstante, fue posible observar una expresión *GUS* de tipo raíz-específica e inducida frente a déficit de Pi. Además, la localización tisular de la expresión *GUS* fue situada en el tejido vascular de raíces diferenciadas, evidenciando un potencial relación de *AtPht1;4* en el transporte de Pi hacia el xilema. La cuantificación de la expresión *AtPht1;4::GUS* por qPCR, mostró una significativa inducción, al combinar el déficit de Pi con sequía. Además, una inducción trescientas veces mayor fue reportada en la condición de frío, y de forma similar, en la combinación de frío con hipoxia. A pesar, de tal estallido transcripcional, esta

inducción no se tradujo en mayores niveles de actividad enzimática. Esto podría ser el resultado de una baja tasa de traducción y/o la inhibición de la actividad GUS. Mayores análisis son necesarios para clarificar la disparidad entre los niveles de transcripción y los niveles de actividad enzimática GUS en plantas de trigo.

ABSTRACT

The choice of a promoter, according to the type of specificity and spatio-temporal regulation, is of great importance in the regulation of transgenes in plants. The promoter *AtPht1;4* has a pattern of expression type-specific and root inducible by phosphorus (Pi) deficiency, which makes it extremely attractive for expression of transgenes in monocotyledonous plants of commercial interest, such as wheat. *In silico* analysis of *cis* regulatory elements present in *AtPht1;4* and other high-affinity phosphate transporters has suggested similarities between dicotyledonous and monocotyledonous. In addition, *AtPht1;4* presents *cis* regulatory elements in response to different environmental signals, in addition to Pi deficiency, suggesting a greater versatility in its response.

This study emphasized the response of the promoter *AtPht1;4* in wheat, compared to environmental signals often experienced by a crop under field conditions, such as heat, drought, cold and hypoxia. Through a system of type promoter-reporter gene, *AtPht1;4::GUS*, we evaluated the performance of three transgenic lines (T3). Initially, a significant degree of silencing was observed in all of them. However, it was possible to establish GUS expression type-specific in roots and the induction of the transgene in deficit of Pi. Furthermore, the cellular localization of GUS expression was localized in the vascular tissue of differentiated roots, indicating a putative role of *AtPht1;4* in the transport of Pi into the xylem.

AtPht1;4::GUS expression quantificated by qPCR showed a significant induction when combine Pi deficiency with drought. In addition, a three hundred fold induction was reported in the cold conditions as well as in the combination of cold and hypoxia treatment. It is important to mention that even with such transcriptional burst this

induction could not be translated into higher levels of enzyme activity. This could be a result from a low rate of translation and/or inhibition of GUS activity. Further analyses are necessary to clarify the disparity between GUS transcription levels and activity levels in wheat plants.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El fósforo, problemas derivados del déficit y transportadores de fosfato de alta afinidad

El fósforo es el macro nutriente más importante para el crecimiento y desarrollo en las plantas. Es esencial para procesos bioquímicos claves, tales como fotosíntesis, respiración, la regulación de enzimas y la señalización intracelular. Además, es un componente estructural de muchas macromoléculas, como ácidos nucleicos, fosfolípidos, y moléculas de almacenamiento y transferencia de energía como el ATP (Eastmond y col, 2003). Sin embargo, el fósforo es relativamente escaso en el suelo y tiene una muy baja biodisponibilidad para las plantas, dado que habitualmente se encuentra quelado o asociado a metales (Ticonni y col, 2004). Esta situación, se ha convertido en un grave problema para la agricultura mundial. Una solución para esta problemática ha sido el enriquecimiento del suelo mediante el uso de fertilizantes fosfatados. Sin embargo, esta medida resulta ser muy poco eficiente, dado que únicamente un 1% del fertilizante aplicado en el suelo es efectivamente incorporado por la planta. Sumado a lo complejo de esta situación, se tiene que gran parte del fertilizante utilizado proviene de reservas en rocas fosfóricas, las cuales, se espera sean totalmente depletadas en la presente centuria (Raghotama y col, 1999).

Las plantas adquieren el fósforo en la forma de fosfato inorgánico (Pi) y deben mantener niveles tisulares del orden milimolar (5-20mM), aún cuando las concentraciones del suelo se encuentren en el orden micromolar (~2 uM en la mayoría de los suelos) (Reisenauer y col, 1966). Es por ello que las plantas han desarrollado

un abanico de respuestas para adaptar su crecimiento en condiciones de suelo con déficit de fosfato. Estas respuestas involucran cambios bioquímicos y moleculares, que mejoran la adquisición y reciclaje de fosfato y que protegen a la planta contra su carencia (Franco-Zorrilla y col, 2004). Entre las respuestas frente a déficit de Pi, existen las de tipo morfológicas, como el incremento en la relación raíz:tallo, cambios en la morfología y arquitectura de la raíz (López-Bucio y col, 2003), la proliferación de pelos radiculares, la acumulación de pigmentos como antocianinas, la asociación con hongos micorrízicos (Karandashov y col, 2004) y la formación de raíces proteiformes (conglomerados de raíces laterales cortas y muy densas). Además, existen respuestas de tipo fisiológico, como la promoción en la toma de Pi y la reducción de su salida, la movilización de fosfato desde la vacuola hacia el citoplasma, la retención de fosfato en las raíces, la exudación de ácidos orgánicos y protones (Diatlof y col, 2004). Además, se ha reportado la activación de genes específicos que codifican para transportadores de Pi de alta afinidad, fosfatasas ácidas (intra y extracelulares), RNAsas, Ca-ATPasas y proteínas de almacenamiento (Raghothama y col, 1999).

Una de las adaptaciones mejor conservadas, que exhiben las plantas frente al déficit de Pi, es la inducción de genes que codifican transportadores de alta afinidad. A la fecha, un gran número de transportadores de alta afinidad han sido clonados y caracterizados en distintas especies (Raghothama y col, 1999; Raghothama y Karthikeyan, 2005). En *Arabidopsis*, estos transportadores de fosfato, han sido clasificados en la familia génica *Pht1*, denominada de esta forma, para distinguirla de la familia de transportadores de baja afinidad *Pht2*. La familia génica *Pht1* está integrada por nueve genes los cuales se expresan, casi exclusivamente, en la raíz de la planta y en condiciones de déficit de Pi (Smith y col, 1997; Karthikeyan y col, 2002; Mudge, y col, 2002; Schunmann y col, 2004). Sin embargo, se ha visto que estos

transportadores, también son expresados en otras partes de la planta, incluyendo órganos reproductivos y hojas, pero con un nivel de expresión muy bajo (Karthikeyan y col, 2002; Mudge y col, 2002).

El transportador de fosfato de alta afinidad *Pht1;4* de *Arabidopsis* (*AtPht1;4*, también denominado *AtPT2*) fue uno de los primeros transportadores de Pi en ser descubiertos y su importancia en la mantención de la homeostasis de Pi ha sido ampliamente destacada a través de diversos estudios (Karthikeyan y col, 2002; Mudge y col, 2002).

El gen *AtPht1;4* codifica una proteína transportadora que posee doce dominios transmembrana, los que se encuentran separados en dos grupos de seis, por una gran región hidrofílica. Se ha reportado, que el nivel basal de expresión de su mRNA se incrementa en respuesta a déficit de Pi (Muchhal y col, 1996). Estudios de expresión génica, en *Arabidopsis* y tabaco, mediante el uso de genes reporteros (*GFP*, *luciferasa* o *GUS*) han localizado su expresión, predominantemente en raíces desarrollándose bajo condiciones de déficit de Pi (Karthikeyan y col, 2002).

La activación transcripcional de genes codificantes para transportadores de Pi de alta afinidad, como *AtPht1;4*, es el principal punto de control en la adquisición de este nutriente (Jain y col, 2007; Raghothama 1999; Raghothama y Karthikeyan, 2005). Análisis de micro arreglos, han revelado una regulación diferencial de distintos factores de transcripción en respuesta a disponibilidad de fosfato (Misson y col, 2005; Morcuende y col, 2007). Factores de transcripción tales como *AtMybPHR1* (Rubio y col, 2001), *OsPTF1* (Yi y col, 2005), *AtWRKY75* (Devaiah y col, 2007a), *AtZAT6* (Devaiah y col, 2007b) y *AtMYB62* (Devaiah y col, 2008) han mostrado regular la expresión de genes inducidos por déficit de fosfato. Además, la expresión de algunos genes de respuesta a déficit de Pi mostró ser mediada por microRNA (Aung y col, 2006; Bari y col, 2006; Chiou y col, 2006).

Estos estudios, manifiestan la compleja interacción de factores de transcripción con los elementos en *cis*, ubicados dentro de los promotores de genes que responden a déficit de fosfato, como los transportadores de fosfato de alta afinidad. En este contexto, estudios de expresión en sistemas de tipo promotor-gene reportero han permitido comprender la regulación espacio-temporal de los transportadores de alta afinidad (Karthikeyan y col, 2002; Mudge y col, 2002; Schunmann y col, 2004a). Además, estudios de interacción DNA–proteína, usando fragmentos de los promotores *AtPht1;4* y *TPS11*, revelaron una regulación negativa de los genes inducidos por déficit de Pi (Mukatira y col, 2001). El análisis de la delección de distintas regiones presentes en la secuencia promotora de genes que codifican para transportadores de Pi de alta afinidad de cebada (Schunmann y col, 2004b) y *Medicago* (Xiao y col, 2006), en sistemas heterólogos (en *Arabidopsis*), ha permitido la identificación de distintos elementos *cis* que regulan su expresión génica.

Además, de los elementos regulatorios en *cis*, es bien conocido que los intrones en las plantas también actúan como elementos que promueven la expresión génica. Este fenómeno, ha sido denominado expresión génica mediada por intrones (IME: intron-mediated enhancement; Mascarenhas y col, 1990). IME fue observado por primera vez en la regulación del gen *Adh1* en maíz (Callis y col, 1987). Posteriores estudios han mostrado que la presencia de un intrón en la región 5' de la secuencia codificante o UTR promueve la acumulación de mRNA (Casas-Mollano y col, 2006; Curie y col, 1992; Jeong y col, 2006; Rose 2004; Rose y Beliakoff, 2000). En algunos casos, los intrones no solo promueven expresión génica, sino que también, alteran los patrones de expresión espacial de los genes (Busch y col, 1999; Casas-Mollano y col, 2006; Deyholos y Sieburth, 2000; Jeong y col, 2006; Lohmann y col, 2001). La mayoría de los transportadores de Pi de alta afinidad en *Arabidopsis* tienen intrones en sus

secuencias codificantes. Sin embargo, la secuencia del gen *AtPht1;4* está libre de ellos, aún cuando, se ha reportado la existencia de un intrón en la región 5'UTR, que controlaría su patrón de expresión génica (Karthikeyan y col, 2009). Este intrón presenta un sitio de unión PHR1 (P1BS) localizado en la posición -1350, el cual resultó esencial para la expresión basal del gen *AtPht1;4* en raíces, sin afectar su capacidad de responder al estatus de Pi.

Debido a que dirige una expresión génica de tipo tejido-específico, o restringida a raíces, el promotor *AtPht1;4* resulta ser un candidato muy interesante para estudiar la expresión de genes relacionados con la adquisición de nutrientes en plantas monocotiledóneas de interés comercial. Recientemente, se ha estudiado su expresión en plantas de maíz, mediante la fusión al gen reportero *GUS* (Coelho y col, 2010). Este trabajo permitió evaluar la actividad espacio-temporal del promotor *AtPht1; 4* en un sistema heterólogo. Se encontró que la expresión del reportero *GUS* bajo la regulación del promotor *AtPht1;4*, es análoga a la encontrada en *A. thaliana*, sugiriendo una gran similitud de los elementos en *trans* y en *cis* encontrados en los sistemas monocotiledóneos y dicotiledóneos. Anteriormente, una aproximación *in silico* llegó a la misma conclusión, tras comparar las secuencias promotoras de los genes ortólogos de *AtPht1;4* en trigo, cebada y arroz (Tittarelli y col, 2007). Estos trabajos han sugerido el uso del promotor *AtPht1;4* como una herramienta útil para la expresión raíz-específica de genes heterólogos y que permitiría, por ejemplo, incrementar la adquisición de Pi en suelos con bajos niveles de fósforo disponible.

1.2. El cultivo de trigo en Chile y una estrategia biotecnológica para mejorar la adquisición de fosfato

Dada su contribución en la industria alimenticia, el trigo es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial y constituye el principal cultivo anual de Chile (www.odepa.gob.cl). La producción de trigo en la temporada 2008/2009 alcanzó aproximadamente 1.145.290 toneladas, con una superficie cultivada de más de 280.000 hectáreas (ODEPA, 2009). Sin embargo, la producción nacional no es suficiente para satisfacer la alta demanda interna, situación que convierte a Chile en un país netamente importador.

La producción nacional de trigo abarca desde la VII hasta la X región, aunque gran parte de la producción, aproximadamente un 68%, se concentra en la VIII y IX región (ODEPA, 2009). Los suelos de estas regiones son antiguos y tienen un origen volcánico. Se caracterizan por ser suelos pobres y poco fértiles, con bajos contenidos de materia orgánica y bajo pH. Además, presentan niveles tóxicos de aluminio y una baja disponibilidad de fósforo dada la alta capacidad de absorción o fijación de este nutriente. Sin embargo, los suelos de Chile poseen altos contenidos de fósforo, aún sin ser fertilizados. El problema radica en que el fósforo no se encuentra biodisponible, es decir, se encuentra quelado o asociado a metales como el hierro y el aluminio, en forma de inositol penta y hexa fosfatos (Borie y col, 2003). La unión a dichos metales hace que las concentraciones de fósforo en la rizósfera se mantengan en el orden micromolar.

Esta situación de degradación natural de los suelos, constituye una limitante para la expansión de la producción agrícola. Es por ello, que se ha apostado por desarrollar estrategias biotecnológicas, que permitan mejorar el rendimiento de los cultivos en

estas áreas, mediante el desarrollo de plantas mejor adaptadas a condiciones de crecimiento restrictivas.

Tecnologías de DNA recombinante y la generación de plantas transgénicas que sean más productivas, y a la vez, más tolerantes a condiciones de estrés limitantes, constituyen nuevas y prometedoras aproximaciones para enfrentar este tipo de problemáticas. El mejoramiento de plantas mediante ingeniería genética tiene como punto clave, la regulación espacio-temporal de la expresión de un transgén. Esta regulación radica principalmente, en la secuencia promotora ubicada generalmente, "río arriba" del gen de interés. Para poder controlar y restringir de manera efectiva la expresión génica, debe escogerse un promotor tejido-específico. En el caso de plantas crecidas en suelos naturalmente degradados, se hace necesario el uso de promotores eficientes de tipo raíz- específico.

A la fecha, se ha reportado el uso de promotores constitutivos para dirigir la expresión de fosfatasas y de enzimas "río arriba" de la síntesis de ácidos orgánicos. Se han diseñado plantas sobreproductoras de citrato o malato, los cuales son aniones que tienen una alta afinidad por los metales que acomplejan al fósforo y que al ser exudados hacen más eficiente la incorporación de Pi desde la rizósfera (De la Fuente y col, 1997). Sin embargo, el uso de promotores constitutivos hace que la expresión del gen introducido se produzca en todo momento y tejido, lo que implica un gran costo energético para la planta. El uso de promotores tejido-específico podría ayudar a mejorar la adquisición de fosfato en el momento y en el tejido que se desee.

Nuestro país, también ha planteado una alternativa de transgénesis para solucionar este problema. Particularmente, un proyecto conjunto entre nuestro laboratorio e INIA-Carillanca, se ha enfocado hacia el mejoramiento del cultivo de trigo en suelos ácidos

del Sur de Chile, a través de la adquisición de fosfato de forma regulada e inducida por déficit. Este proyecto ha avanzado en el desarrollo de líneas de trigo transgénico, y a la fecha cuenta con el respaldo tanto de ensayos de laboratorio como también de algunos ensayos de campo. Se han logrado generar sistemas de expresión heterólogos, donde distintas líneas de trigo (*T. aestivum* L. cv. Bobwhite) son portadoras de construcciones génicas con promotores de *A. thaliana* y de *T. aestivum* del tipo *Pht1* (transportadores de fosfato de alta afinidad) para una expresión regulada de genes relacionados con la adquisición de fosfato (P).

A la fecha, se ha evaluado la funcionalidad de tres promotores para genes de tipo *Pht1* en trigo (*AtPht1; 2*, *AtPht1; 4* y *TaPT2*) mediante su fusión al gen reportero *GUS*. Se ha constatado especificidad radicular y funcionalidad para todos ellos (Tittarelli y col, 2007; Peñaloza y col, comunicación personal) aunque con bajos niveles de expresión. La actividad *GUS* mediada a través del promotor *AtPht1,4* ha mostrado ser mucho mayor que la de los otros dos promotores, situación que lo posiciona como un candidato interesante para potenciales aplicaciones agronómicas.

En la práctica, parte importante de la caracterización de plantas transgénicas portadoras de promotores con potencial agronómico, es determinar si su respuesta en condiciones de campo pudiera verse influenciada por las condiciones medioambientales imperantes. En suelos de la novena región, el cultivo de trigo puede verse normalmente influenciado por el efecto de condiciones oscilantes, tales como, altas temperaturas asociadas a períodos de sequía en verano, así como, bajas temperaturas e inundaciones por las intensas lluvias en el período invernal. Este trabajo de tesis se centró en este contexto, al estudiar la potencial interrelación entre señales medioambientales, similares a las encontradas por un cultivos de trigo en condiciones de campo, y su posible efecto en la respuesta del promotor *AtPht1,4* ante

la deficiencia de un nutriente de importancia como el fosfato. La adquisición de este nutriente por parte de la planta contribuye significativamente en su crecimiento, por lo que fluctuaciones en las tasa de incorporación, resultan cruciales en términos de su productividad. Este trabajo de tesis buscó contribuir al conocimiento de una posible comunicación entre señales de estrés que significativamente pudieran afectar el rendimiento de cultivares de trigo con potencial agronómico.

2. HIPÓTESIS

La respuesta del promotor *AtPht1;4* es el resultado de una regulación dada a nivel transcripcional, que está en función de la disponibilidad de fosfato, así como de otros tipos de estímulos abióticos que pudieran afectar a la planta.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la respuesta del promotor *AtPht1;4* en trigo (sistema heterólogo), en función de la disponibilidad de fosfato y la combinación con otros tipos de estrés abiótico, tales como temperatura (frío o calor), disponibilidad de oxígeno (hipoxia) y de agua (sequía), así como combinaciones de los mismos (frío-hipoxia y calor-sequía).

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de expresión génica de distintas líneas de trigo transgénico para construcciones del tipo *AtPht1;4::GUS* y *AtPht1;4:Adh:GUS* mediante un sistema reportero.
2. Evaluar la respuesta del sistema reportero *AtPht1;4::GUS* frente a deficiencia de fosfato.
3. Determinar la localización tisular de la expresión del sistema reportero *AtPht1;4::GUS* en raíces de trigo.
4. Estimar mediante análisis por qPCR, la respuesta del sistema reportero frente a distintos tipos de estrés (frío, hipoxia, calor, sequía, y la combinación de frío-hipoxia y calor-sequía), adicionales al déficit de fosfato.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

4.1.1. *Triticum aestivum*

Plantas transgénicas de trigo (*Triticum aestivum* L. cv. Bobwhite) que expresan *GUS* bajo la regulación de la región promotora del gen del transportador de fosfato de alta afinidad *Pht1;4* de *Arabidopsis thaliana*, fueron utilizadas en este estudio. Este material vegetal fue cedido por el Dr. Enrique Peñaloza, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias CRI Carillanca, quien además, efectuó todos los tratamientos experimentales de estrés abiótico descritos aquí. Estas plantas de trigo (T_3 homocigotas), se generaron mediante el método de biobalística y fueron caracterizadas en un trabajo anterior (Peñaloza y col, comunicación personal). Estas plantas contienen dos tipos de construcciones o fusiones génicas. El primer tipo de construcción, corresponde a 3,0 Kb río arriba del gen para el transportador de fosfato de alta afinidad, *Pht1;4* fusionado al gen reportero *GUS*, y se nombró como *AtPht1;4::GUS*. El segundo tipo de construcción, corresponde a la misma región promotora antes descrita, fusionada al intrón del gen *Adh1* de *Zea mays* y al reportero *GUS*, y se denomina *AtPht1;4:Adh:GUS*.

En el caso de *AtPht1;4::GUS*, se escogieron dos líneas independientes para ser ensayadas, IIA292 y IIA5, mientras que para la fusión *AtPht1;4:Adh:GUS*, se escogió únicamente la línea denominada XI720. En cada una de las líneas escogidas, se analizaron 4-6 plantas tanto en condiciones de déficit de fosfato como en condiciones de suficiencia para cada tratamiento efectuado. Como control negativo de transformación, se utilizaron plantas silvestres de *T. aestivum* L cv Bobwhite. Las

etapas de crecimiento en las plantas de trigo ensayadas, fueron escogidas de acuerdo a la escala de Zadocks (Zadocks y col, 1974), según la más probable ocurrencia de los tipos de estrés ensayados en plantas desarrollándose en condiciones de campo.

4.1.2. *Arabidopsis thaliana*

Plantas transgénicas de *A. thaliana* (ecotipo Columbia), portadoras del plásmido PBI121 (gen reportero *GUS* bajo el control del promotor constitutivo 35S), representaron el control positivo de expresión y actividad *GUS* en cada ensayo efectuado. Estas plantas (T_3 homocigotas) fueron obtenidas a partir del stock de semillas con que cuenta nuestro laboratorio. Cada planta de *A. thaliana* fue obtenida mediante germinación *in vitro* y posteriormente, fue transferida a cultivo en tierra. Para introducir las semillas *in vitro*, estas fueron esterilizadas superficialmente, mediante un lavado inicial en una solución de cloro comercial 50% (v/v), con agitación fuerte durante 7 minutos. Luego, se lavaron tres veces en agua estéril durante 3 minutos y se dejaron estratificar durante 2 días en oscuridad a 4°C. Luego, las semillas fueron sembradas en placas con medio Murashige-Skoog (Murashige y Skoog, 1962), el que fue suplementado con sacarosa 0,1%, agar 0,8% y kanamicina 50 mg/L. Las semillas fueron germinadas en una cámara de crecimiento con una intensidad luminosa de 100 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y bajo un foto período de 16h luz/ 8h oscuridad a 25°C. Las plántulas obtenidas se mantuvieron durante 3 semanas en las condiciones antes descritas. Luego, fueron transferidas a maceteros con una mezcla de sustratos de tierra; vermiculita (3:1) y fueron crecidas en una cámara de crecimiento de 100 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 25 °C durante 3 semanas.

4.2. Tratamientos experimentales

Los tratamientos experimentales de estrés abiótico, descritos a continuación, fueron íntegramente realizados en el laboratorio del Dr. Enrique Peñaloza Hernández en dependencias del Instituto de Investigaciones Agropecuarias-CRI Carillanca. Este material vegetal tratado, constituyó el punto de partida de este trabajo de tesis. Sin embargo, se consideró pertinente hacer una referencia detallada del cómo fue efectuado cada tipo de tratamiento.

4.2.1. Estrés por baja temperatura (frío)

Semillas de plantas transgénicas (T3) de *T. aestivum* fueron sembradas en maceteros con tierra y crecidas a 23°C con un fotoperíodo de 10 h, 85% de humedad relativa y 150 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa (Peñaloza y col, comunicación personal). La concentración promedio de fósforo inorgánico (Pi) en las raíces fue de $0,008 \pm 0,001 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido, para aquellas plantas crecidas en la condición de déficit de fosfato (denominado P0) y de $0,011 \pm 0,0017 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ para plantas crecidas en condiciones de suficiencia de Pi (denominado P1) (Peñaloza y col, comunicación personal). En la etapa de crecimiento 13 (estado de tres hojas), una parte de los maceteros (plantas experimentales), fueron sumergidas en baño frío hasta que la temperatura del suelo alcanzó los 5°C. Una vez que los maceteros estuvieron fríos, fueron transferidos a una cámara de crecimiento, en la cual el estrés por frío fue efectivo, registrando una temperatura en el aire de 5°C, el cual fue impuesto durante tres días (Peñaloza y col, comunicación personal). La otra parte de los maceteros (plantas control) fueron mantenidos en las mismas condiciones descritas inicialmente.

4.2.2. Estrés por baja disponibilidad de oxígeno (hipoxia)

Las semillas de trigo transgénico fueron sembradas y crecidas en las mismas condiciones antes detalladas. Se usaron concentraciones de Pi de $0,0097 \pm 0,0021$ $\mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido para la condición P0 (déficit) y de $0,0135 \pm 0,0023$ $\mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido para la condición P1 (suficiencia). Igualmente, se utilizaron plantas en el estado de tres hojas tanto para la condición control como para la condición experimental. La condición de hipoxia radicular, se logró mediante el diseño de un sistema cerrado con inyecciones periódicas de nitrógeno gaseoso, que fue monitoreado, por una serie de sensores insertos en el suelo (Peñaloza y col, comunicación personal). En estas condiciones se registró una hipoxia del 3% en el sistema radicular que alcanzó a ser extendida durante ~ 8 h. Adicionalmente, plantas control fueron mantenidas a 23°C en condiciones de normoxia, es decir, aproximadamente a una concentración de 21% de O₂ en el aire.

4.2.3. Estrés combinado de baja temperatura y baja disponibilidad de oxígeno (frío-hipoxia)

Las plantas se sembraron y crecieron en las condiciones anteriormente descritas. Se usaron concentraciones de Pi de $0,0068 \pm 0,002$ $\mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido para la condición P0 (déficit) y de $0,0127 \pm 0,004$ $\mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido para la condición P1 (suficiencia). El estrés se indujo en plantas en el estado fenológico de tres hojas, las cuales fueron mantenidas a 5°C y 3% de O₂ durante 3 días (Peñaloza y col, comunicación personal).

4.2.4. Estrés por alta temperatura (calor)

Plantas de trigo en el estado de 5 hojas fueron sometidas al régimen de estrés térmico. Inicialmente la temperatura se mantuvo a 18°C y se elevó paulatinamente a 37°C, extendiéndose esta condición, durante 8 h. Plantas designadas como control, se mantuvieron a 23°C/18°C. Las concentraciones de Pi fueron de $0,0088 \pm 0,0021 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido, para la condición de déficit y de $0,0129 \pm 0,003 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido para plantas con suficiencia de fosfato (Peñaloza y col, comunicación personal).

4.2.5. Estrés por sequía

Al igual que el estrés por alta temperatura, el estrés por sequía se llevó a cabo en plantas en el estado fenológico de 5 hojas. En este ensayo, la concentración de Pi en plantas P0 fue de $0,009 \pm 0,0026 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido y de $0,014 \pm 0,0035 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido en plantas P1. El estrés por sequía se inició omitiendo el riego y se extendió durante 7 días (Peñaloza y col, comunicación personal). El registro de la humedad del suelo (medición volumétrica agua/sustrato) fue de $0,11 \text{ m}^3/\text{m}^3$ en la condición de sequía, mientras que en la condición control fue de $0,2 \text{ m}^3/\text{m}^3$. Según el método gravimétrico, este rango correspondió a 60% de capacidad de campo y 38% de punto de marchitez permanente, respectivamente. Plantas control fueron mantenidas con riego permanente a 23°C/18°C (Peñaloza y col, comunicación personal).

4.2.6. Estrés combinado de alta temperatura y sequía (calor-sequía)

Plantas en el estado de 5 hojas fueron mantenidas a 23°C/18°C con riego continuo (con una humedad volumétrica de 0,10 m³/m³), fueron designadas como control. Plantas donde el riego fue omitido durante 7 días (con una humedad de 0,19 m³/m³) fueron mantenidas a 37°C durante 8 h (Peñaloza y col, comunicación personal). La concentración de Pi en plantas P0 fue de 0,009 ± 0,0026 μmol Pi mg⁻¹ tejido y de 0,014 ± 0,0035 μmol Pi mg⁻¹ tejido en plantas P1.

4.3. Preparación de muestras

La raíz completa (raíz principal y raíces laterales) de plantas crecidas en las condiciones antes descritas, constituyó el principal tejido utilizado. Una vez efectuados cada uno de los ensayos de estrés, las plantas fueron extraídas desde los maceteros y su raíz fue cosechada, limpiada (libre de tierra) y congelada en nitrógeno líquido. Este material fue almacenado a -80°C hasta su uso.

4.4. Ensayo bioquímico para actividad específica GUS

Aproximadamente, 30-50 mg de tejido radicular congelado fueron transferidos a tubos de micro centrifuga donde fueron pulverizados en nitrógeno líquido y homogeneizados en 150 μl de buffer de extracción GUS (NaPO₄ 50 mM, pH 7.0; EDTA 10 mM, pH 8,0; 0,1% v/v Tritón X-100; lauril sarcosina de sodio 1mg/L; β-mercaptoetanol 10 Mm; PMSF 25 mg/ml). Las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 15 minutos

a 4 °C y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y usado como fuente de enzima para el ensayo GUS.

Para la cuantificación de proteínas totales, se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976), usando una curva estándar de BSA para extrapolar las cantidades de proteína total en cada muestra. La medición de proteínas totales fue realizada en un lector de micro placas a 570 nm.

La actividad GUS se midió adoptando una cinética de reacción para la evolución del sustrato 4-metil-umbeliferil- β -D-glucurónido (MUG), descrito por Jefferson (1987), como blanco para la enzima β -glucuronidasa (GUS), presente en las muestras problema.

La reacción se inició al mezclar en un tubo de micro centrifuga 50 μ l de extracto crudo de enzima con 950 μ l de buffer para ensayo GUS (MUG 2 mM en buffer de extracción de proteínas), homogeneizando bien y tomando tiempos de incubación a 37°C de 15, 30, 60, 100 y 120 minutos. Estos tiempos fueron variables y se ajustaron en la medida de la evolución del sustrato. La reacción fue detenida, al transferir 200 μ l de la mezcla de reacción a 1800 μ l de solución de detención (Na_2CO_3 0,2 M, pH 9.5). La cantidad de producto fluorescente generado en la reacción fue medido con un filtro de excitación Ex360/40 (340-380 nm) y de emisión Em460/10 (455-465 nm) en un equipo Fluorímetro *VersaFluor* (Bio – Rad, USA). La actividad GUS fue expresada como pmoles de 4-metil-umbeliferil (MU)/min/ μ g de proteína total extraída.

4.5. Extracción de RNA total desde plantas de trigo

RNA total fue extraído a partir de raíces de trigo utilizando el método del reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para ello, 100 mg de tejido congelado a -80°C fueron pulverizados con pistilos usando nitrógeno líquido. Se agregó 1 ml de reactivo Trizol y se agitó la muestra vigorosamente. El tejido homogeneizado, se incubó durante 5 minutos en hielo y se agregaron 200 μl de una mezcla cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). Inmediatamente se aplicó una agitación vigorosa por 30 segundos y se incubó durante 2 minutos en hielo. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C . Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregaron 0,5 ml de isopropanol, dejando precipitar la reacción durante 30 minutos a -20°C . Posteriormente, se centrifugó por 15 minutos a 4°C y luego se retiró el sobrenadante, agregando 0,5 ml de etanol 75% (preparado con agua DEPC). Se centrifugó durante 4 minutos a 14.000 rpm y se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y tratando de no dejar residuos de etanol. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 30 μl de agua libre de nucleasas. El RNA total extraído fue guardado a -80°C .

4.6. Espectrofotometría y electroforesis en condiciones denaturantes

Las muestras de RNA total fueron cuantificadas mediante espectrofotometría UV utilizando un equipo UV-VIS Spectrophotometer Shimadzu. Para ello, se resuspendió cuidadosamente el RNA y se hicieron diluciones de las muestras en agua libre de nucleasas, en el rango de 1:30 a 1:60, según la cantidad de precipitado obtenido. Se calculó la concentración de RNA total (C_{RNA}), utilizando la fórmula $C_{\text{RNA}} = A_{260} * F_{\text{dil}} *$

$40/1000$, donde C es la concentración de RNA, A_{260} es la absorbancia a 260 nm, F_{dil} es el factor de dilución de la muestra de RNA, 40 es el factor de corrección específico para RNA, y se divide por 1000 para expresar la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A partir de esta medida, se calculó el volumen de RNA necesario para cargar 1 μg de RNA total en un gel en condiciones denaturantes. Las muestras de RNA se prepararon agregando 1 volumen de buffer de carga 5X (0,16% de una solución de bromofenol azul saturado, EDTA 4 mM, formaldehído 2,7 %, glicerol 20%, formamida 30,8%, MOPS 4X) por cada 4 volúmenes de RNA. Se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las muestras fueron incubadas 10 minutos a 65°C y se colocaron inmediatamente en hielo para evitar su renaturación. Para preparar buffer de corrida, se utilizó MOPS 10X (MOPS 200 mM; acetato de sodio 50 mM; EDTA 10 mM, pH 7,0 ajustado con ácido acético glacial). Cada gel denaturante de MOPS/formaldehído se preparó a una concentración de agarosa de 1,5 %. Los gels fueron corridos a 80-100 volts durante 20 minutos (Sambrook y col, 1989).

4.7. Real time PCR

Para realizar las reacciones de real time PCR (o qPCR) las preparaciones de RNA se trataron previamente con DNasa (Fermentas, USA), con el objeto de eliminar el DNA remanente. El protocolo se llevó a cabo según instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. 1 μg de RNA total fue tratado para cada muestra. Se utilizó inhibidor de ribonucleasas (Ribolock; Fermentas, USA) y agua libre de nucleasas hasta 10 μl totales. La mezcla de reacción se incubó con DNasa a 37°C durante 30

minutos y luego se agregó 1ul de EDTA 25 mM incubándose a 65°C durante 10 minutos. El RNA tratado fue guardado a -80°C hasta su uso.

Para la cuantificación de la expresión génica, se utilizó una estrategia en un solo paso. Para ello, se utilizó el sistema Brilliant II @SYBR® Green qPCR Master Mix 1-Step (Stratagene® Agilent Technologies, USA) que en una única mezcla de reacción permite completar el proceso de transcripción reversa (RT) y de la amplificación de los fragmentos de interés. Se utilizó el sistema completo de equipamiento MX3000P (Stratagene @ Agilent Technologies, USA). La reacción se preparó según instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. A partir de 1 µg de RNA tratado con DNasa, se hizo una dilución 1:16, y se tomaron 2 µl de esta alícuota para cada reacción, en un volumen final de 20 µl (0,1 µg de RNA; partidores 0,3 µM; ROX 300 µM; MgCl₂ 1 mM). El qPCR de *UBIQUITINA* fue desarrollado para la normalización de la expresión génica. La expresión génica fue normalizada por sustracción del valor de C_T de *UBIQUITINA* desde el valor de C_T del gen de interés (*GUS*). El ratio de expresión génica experimental / control fue obtenido desde la ecuación $2^{\Delta\Delta C_T}$, donde $\Delta\Delta C_T$ representa ΔC_T (experimental) - ΔC_T (control), según lo reportado por Livak y col (2001). Las características de los partidores usados para qPCR se detallan en la siguiente tabla:

Gen	Secuencia partidores 5' - 3' (F/R)	Tm (°C)	Tamaño amplicon (pb)	Eficiencia amplific. (%)
<i>GUS</i> (gen blanco)	GTTGGCGGTAACAAGAAAGG TAGCAATTCCCGAGGCTGT	83- 84	178	90
<i>UBIQUITINA</i> (gen referencia)	GTTGATTTTTGCTGGGAAGC GATCTTGGCCTTCACGTTGT	83-84	200	89.6

El programa utilizado para la reacción de qPCR fue: 1 ciclo de 50°C por 45 min (Reacción RT); 1 ciclo de 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 40 s, 1 ciclo de 95°C por 1 min, 55°C por 30 s. En cada ensayo, se analizaron 3 réplicas biológicas, es decir, se utilizaron 3 plantas distintas de la línea seleccionada. Cada reacción de amplificación se realizó en triplicado (réplicas técnicas). La especificidad de los amplicones obtenidos fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Los datos obtenidos mediante qPCR fueron procesados usando el software MxPro (Stratagene Agilent Technologies, Inc. 2009; USA). Este programa permite visualizar las curvas de eficiencia, amplificación, y disociación (especificidad), además de obtener la T_m (temperatura de "melting" o fusión) de cada producto de PCR obtenido. En los cálculos y la normalización de datos, se utilizó el método o modelo matemático Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$; Livak y col, 2001). Este método de cuantificación relativa, asume que la eficiencia de amplificación de la muestra experimental y la muestra control son iguales.

4.8. Localización histoquímica de la expresión GUS

Los ensayos de tinción histoquímica para actividad GUS, fueron desarrollados como describe Jefferson (1987) con algunas modificaciones. Fragmentos de raíces de plantas de trigo, descongeladas en hielo, fueron fijados en acetona 90% durante 2 h a -20°C. Las muestras fueron lavadas dos veces en buffer de lavado (NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,0) y luego embebidas en solución de tinción (NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,0; EDTA 10mM; K₄Fe(CN)₆* 3H₂O 0,5 mM; K₃Fe(CN)₆ 0,5 mM; 5-bromo-4cloro-3-indol-b-glucuronido (X-GLUC) 1 mM; 0,1% (v/v) de Tritón X-100), donde se infiltraron con

vacío durante 30-60 min a ~ 500 mmHg. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 24-48 h. En el caso de tejidos con pigmentos (hojas de *A. thaliana*) fueron lavados, varias veces, con etanol 70% (v/v) para su total remoción. Muestras de raíces de plantas representativas de cada línea en estudio, fueron montadas en portaobjetos para su observación microscópica o macroscópica.

4.9. Cuantificación de fósforo soluble en raíces

El fósforo soluble fue extraído desde raíces de trigo congelado, que fueron pesadas y reducidas a polvo fino, con un 1% (v/v) de ácido acético. El homogeneizado fue centrifugado y el sobrenadante utilizado para la cuantificación de fósforo (Pi) de acuerdo a Ames (1966). Modificación del protocolo original se hizo mediante el ajuste del volumen final a una micro placa de 96 pocillos. La reacción se incubó a 54°C durante 20 min y se midió absorbancia a 820 nm. El contenido de Pi en la muestra se calculó utilizando una curva estándar y se expresó según peso fresco de tejido.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis histoquímico y actividad específica β -glucuronidasa dirigida por el promotor *AtPht1;4* en distintas líneas de trigo

Se estableció previamente, una región de 3,0 Kb río arriba del gen de *AtPht1;4*, fusionada al gen reportero *GUS* de *E. coli* e introducida en *T. aestivum* cv. Bobwhite vía bombardeo de partículas (Peñaloza y col, comunicación personal). Este sistema de tipo promotor: gen reportero, planteó el estudio de la actividad promotora *AtPht1;4::GUS* en una planta monocotiledónea (trigo) como sistema heterólogo. De esta manera, fueron obtenidos varios eventos de transformación que confirmaron ser transgénicos mediante análisis de PCR (Peñaloza y col, comunicación personal). Este trabajo de tesis tienen como punto de partida el material vegetal recién descrito, es decir, utilizará las líneas de trigo transgénico generadas por Peñaloza y col, para hacer una evaluación de las mismas frente a distintos tipos de estrés abiótico, adicionales a la deficiencia de Pi.

Inicialmente, se propuso evaluar el desempeño de tres líneas T3 (IIA292, IIA5 y XI720) para así poder escoger a la más representativa entre todas ellas. Al ser analizadas mediante ensayos de actividad específica GUS, se pudo distinguir que las tres líneas escogidas, difirieron notoriamente en sus niveles de expresión, al ser comparadas frente a una condición control. Se estableció una escala decreciente respecto de la fuerza con la cual se promueve la expresión génica *AtPht1;4::GUS* en cada una de ellas. De este modo, la línea IIA292 presentó los mayores niveles de actividad específica GUS, con valores que se elevan por sobre los 2 pmoles de Mu/min/ug proteína total y que alcanzaron en promedio los 3,5 pmoles de Mu/min/ug proteína

total (Figura 1). La línea IIA5 presentó niveles de actividad GUS promedio, que fueron cercanos a 1 pmol de Mu/min/ug proteína total (Figura 1). La menor actividad fue observada en plantas de la línea portadora del intrón del gen *Adh1*, es decir la línea XI720, cuya actividad GUS promedio fue inferior a 0,01 pmoles de Mu/min/ug proteína total.

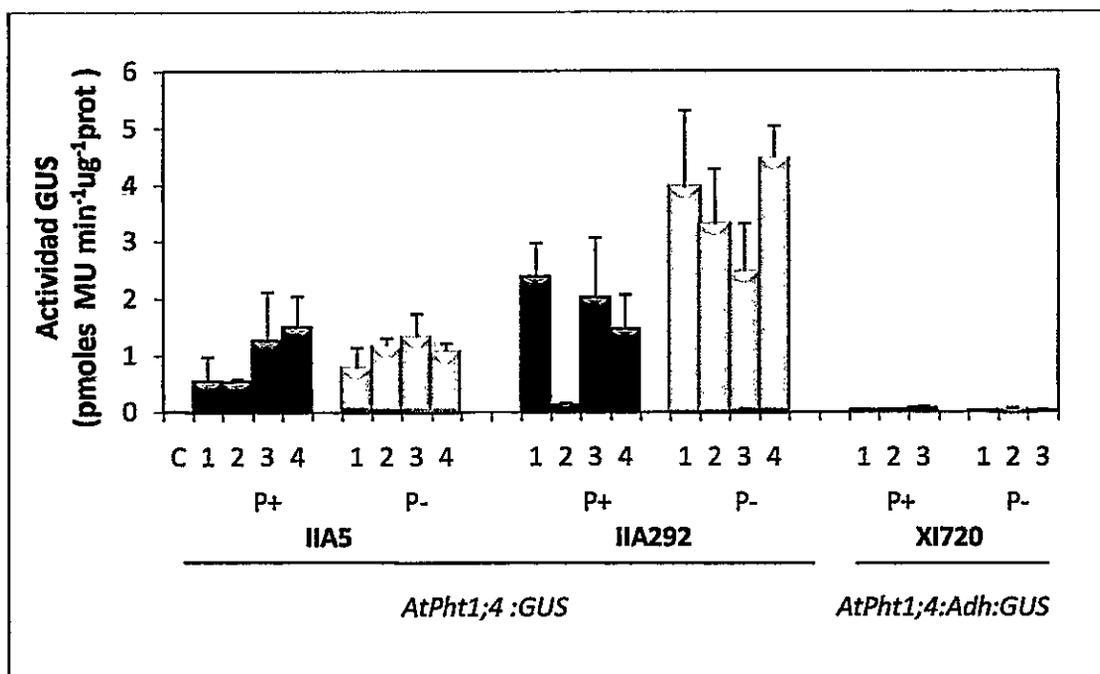


Figura 1. Actividad específica β -glucuronidasa (GUS) en líneas de trigo transgénico para las construcciones *AtPht1:4::GUS* y *AtPht1:4:Adh::GUS*. Para cada línea (IIA5, IIA292 y XI720) se muestran 3-4 muestras de raíces de plantas transgénicas (T3) en condiciones de suficiencia de Pi (barras grises) y en condiciones de déficit de Pi (barras blancas). C corresponde a una muestra control negativo de actividad β -glucuronidasa. Cada barra representa prom \pm SD (n=3).

Al analizar las líneas mediante tinción histoquímica GUS de muestras de raíz, se pudo apreciar la misma tendencia antes mencionada. En cada línea, se tomaron muestras

de raíces desarrolladas en condiciones de suficiencia como de déficit de Pi. La línea IIA292, nuevamente mostró un mayor grado de expresión GUS en cada muestra de raíz (Figura 2), además, de exhibir tinción para casi la totalidad de las muestras en condiciones de déficit de Pi (n=6). La línea IIA5 mostró un grado de tinción GUS mucho menor respecto de la línea IIA292 (Figura 2, B). En relación a la línea XI720 (portadora de intrón), no mostró tinción GUS en ninguna de las muestras analizadas (Figura 2, C), tanto para condiciones de déficit como de suficiencia, lo que es consistente con los bajísimos valores de actividad enzimática exhibidos (Figura 1). Estos resultados indicaron que la línea IIA292 demostró ser la más representativa y con una mayor estabilidad en la expresión GUS para cada planta, aún cuando, aproximadamente el 20% de ellas no exhibió actividad ni tinción histoquímica GUS en condiciones de suficiencia de Pi. La línea IIA5 mostró un mayor grado de variabilidad intra línea especialmente en condiciones de suficiencia y sus valores de actividad fueron considerados muy bajos, por lo que su análisis progresó solamente en este respecto (actividad GUS) y de modo comparativo, respecto de la línea IIA292 en los siguientes tratamientos experimentales. El comportamiento de la línea XI720 determinó que fuese descartada de ensayos posteriores, pues al parecer la presencia del intrón *Adh1* en el sistema *AtPht1,4:GUS* en trigo, tendría más bien un efecto inhibitorio.

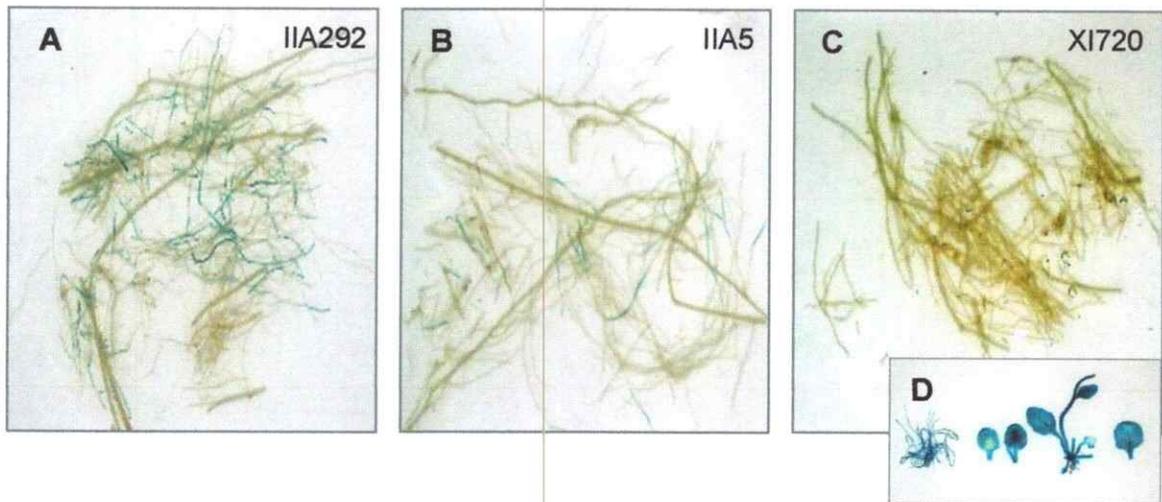


Figura 2. Tinción histoquímica GUS en muestras representativas de las líneas de *T. aestivum* propuestas para el presente estudio. Fragmentos de la raíz de trigo de una planta perteneciente a la línea IIA292 (A), a la línea IIA5 (B) y a la línea XI720 (C), en respuesta a déficit de fósforo. En (D) se observa el control positivo de tinción de la raíz de *A. thaliana* portadora de la fusión constitutiva 35S::GUS. Las imágenes fueron fotografiadas utilizando el mismo aumento.

5.2. Expresión de *AtPht1;4::GUS* en trigo relativo a la disponibilidad de fósforo

La cuantificación de la actividad β -glucuronidasa también permitió constatar, tal y como se ha descrito en literatura para el promotor endógeno de *Arabidopsis* (Muchhal y col, 1996; Smith y col, 1997; Okumura y col, 1998; Mudge y col, 2002), que en el sistema heterólogo utilizado, el promotor *AtPht1;4* promovió mayores niveles de expresión *GUS* en raíces que se desarrollaron bajo condiciones de déficit de fósforo que en presencia de este. La actividad *GUS* de raíces creciendo en tierra, en condiciones de déficit, fue en promedio entre 1 a 2 veces mayor que creciendo en condiciones de suficiencia (Figura 1, barras blancas versus barras negras en cada línea), multiplicándose esta condición hasta 4 veces en algunas plantas, especialmente las pertenecientes a la línea IIA292 (dato no mostrado).

Como primera aproximación hacia la evaluación de la expresión génica mediante qPCR, se efectuaron reacciones de RT-PCR semi cuantitativo, para correlacionar la actividad GUS detectada en raíces. De este modo, mRNA de β -glucuronidasa fue mayormente amplificado en raíces de trigo bajo condiciones de déficit de fosfato que en condiciones de suficiencia (Figura 3, P1+ versus P1- y P2+ versus P2-). Esto resulta ser consistente con la información que existe en la literatura sobre la expresión del promotor *AtPht1;4* (Mudge y col, 2002), y con lo observado previamente para los análisis de actividad GUS y tinción histoquímica (Figuras 1 y 2).

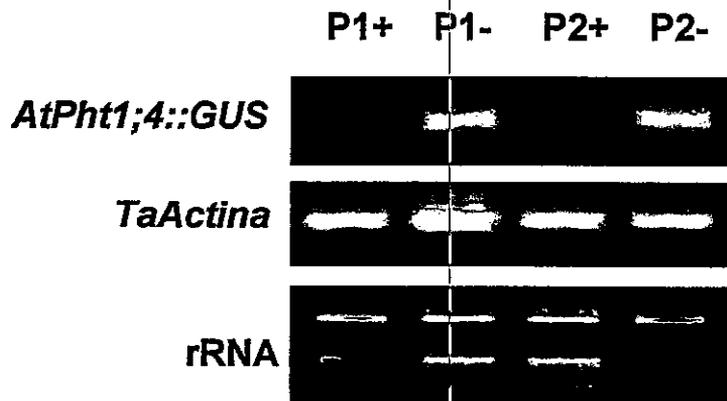
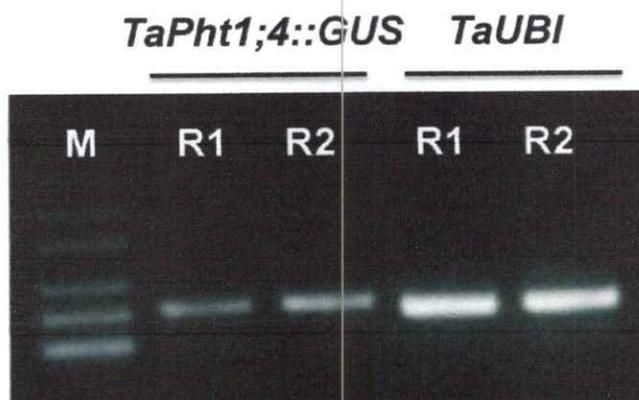


Figura 3. Análisis RT-PCR semi cuantitativo de la expresión génica de la fusión *AtPht1;4::GUS* en la raíz de plantas de *T. aestivum*, según disponibilidad de fosfato. Los niveles de transcritos fueron monitoreados en plantas nombradas como P1 y P2, representantes de la línea IIA292, en suficiencia de Pi (+) y en condiciones de déficit de Pi (-). *TaActina*, corresponde a la amplificación del gen de referencia *Actina*. rRNA, corresponde a las muestras del RNA total utilizado para efectuar las amplificaciones corridas en un gel de agarosa denaturante.

La elección de los partidores para qPCR, tanto para el gen de referencia como para el gen blanco, fue hecha en base a antecedentes de literatura (Brunner y col, 2004; Nicot y col, 2005). El criterio de búsqueda para el gen de referencia fue el grado de

estabilidad de su expresión génica frente a condiciones experimentales similares a las que se planteó analizar. Tras una serie de pruebas de partidores, entre los cuales se evaluaron los genes *26S*, *PT1* y *UBIQUITINA*, finalmente se escogió al gen *UBIQUITINA* como gen normalizador (Figura 4). Lo anterior, se fundó principalmente en la estabilidad de su expresión frente a condiciones abióticas diferentes, la nula formación de dímeros de partidador y la eficiencia de amplificación medida a través de una curva estándar para qPCR.

A



B

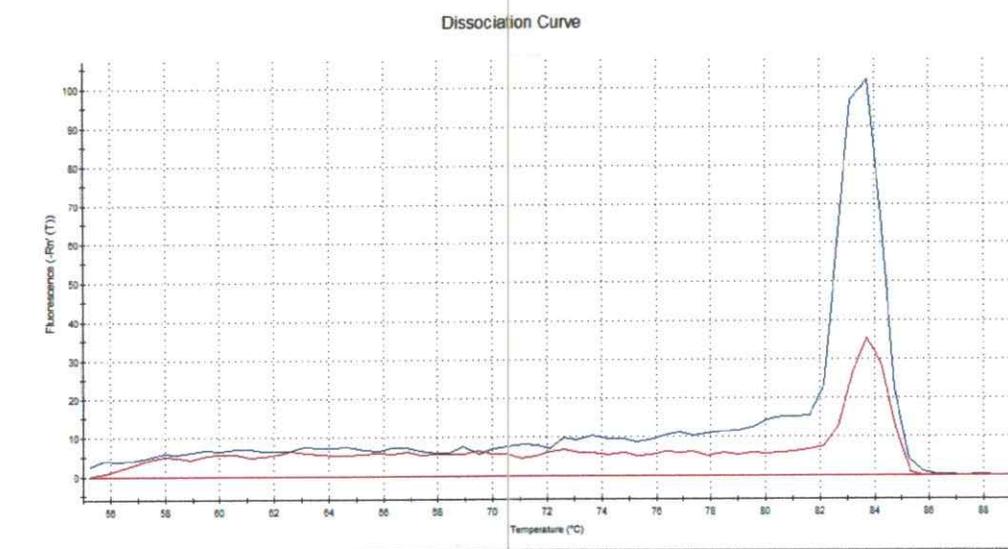


Figura 4. Evaluación de la especificidad de amplificación obtenida mediante qPCR para la expresión génica de *AtPht1;4::GUS* y para el gen de referencia *UBI* en *T. aestivum*. La amplificación fue evaluada en una planta representativa de la línea IIA292, mediante dos réplicas técnicas R1 y R2, frente a la condición de deficiencia de fósforo. (A) Gel de agarosa 1,5% para los amplicones generados por los partidores *TaPht1;4::GUS* y *TaUBI* en trigo. M, Estándar de peso molecular 100 bp. (B) Curva de disociación para los partidores *TaPht1;4::GUS* (rojo) y *UBI* (azul).

5.3. Localización tisular de la expresión del sistema reportero *AtPht1;4::GUS* en raíces de trigo en la condición de déficit de fosfato

Para poder entender la forma en que se manifestó la expresión de la fusión *AtPht1;4::GUS* en el sistema radical de trigo, es decir para conocer su localización tisular, se planteó analizar algunas de las plantas de la línea IIA292, mediante la observación microscópica de raíces sometidas a tinción histoquímica GUS. Como control positivo de tinción, se utilizaron raíces de *A. thaliana* transgénicas para la fusión de tipo constitutiva *35S::GUS* (Figura 5, A, B y C). Además se utilizó este control con la finalidad de evidenciar que la expresión dirigida por un promotor fuerte y de tipo constitutivo, es muy diferente a la de un promotor tejido específico e inducible (en este caso, por déficit de Pi) como *AtPht1;4*. El patrón de expresión de la fusión *35S::GUS* en *Arabidopsis* se distribuyó de manera uniforme en el sistema radicular completo, incluyendo a los pelos radiculares, lo que evidenció el carácter de promotor constitutivo. Al analizar la raíz de plantas de trigo *AtPht1;4::GUS*, se observó un patrón de expresión particular (Figura 5, D, E y F). Desde un punto de vista longitudinal, se pudo apreciar una intensa señal GUS en la corteza que rodea al sistema vascular tanto en la raíz primaria como secundaria. Este patrón de distribución de la actividad GUS fue de forma discontinua y a modo de paquetes discretos. También, se observó señal GUS, pero de forma muy débil, en algunas partes de la epidermis y endodermis en la zona de maduración de la raíz. No se observó señal de tinción GUS en estructuras externas, como pelos radiculares, cuya importancia es gravitante en la adquisición de nutrientes, especialmente de Pi. Tampoco, se observó señal en la punta de la raíz, correspondiente a la zona meristemática ni en la zona de elongación. Adicionalmente, se realizó tinción GUS en las hojas de trigo *AtPht1;4::GUS* (dato no

mostrado), las que exhibieron una muy débil señal GUS. Estos resultados confirmarían el carácter de *AtPht1;4* como un promotor tejido específico, es decir cuya expresión génica está restringida, casi exclusivamente, a la raíz. Sin embargo, sugieren además un cierto grado de especificidad a nivel celular.

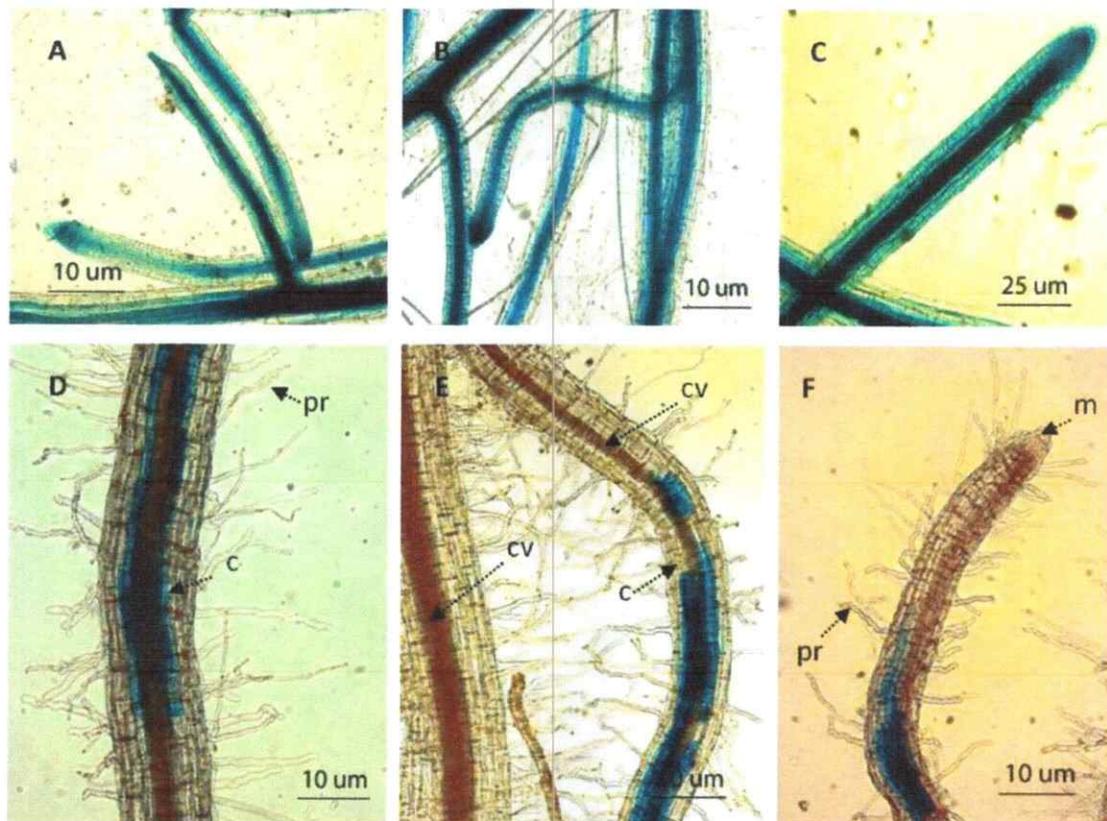


Figura 5. Localización histoquímica de actividad específica GUS en la raíz de plantas transgénicas de trigo portadoras del casete de expresión *AtPht1;4::GUS* frente a déficit de fosfato. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía óptica. Como control positivo de tinción, se utilizaron raíces de plantas de *A. thaliana* transgénicas para la fusión *35S::GUS* (A, B, C). Plantas de trigo en el estado de tres hojas exhiben una moderada y restringida actividad GUS en raíces (D, E, F). Una fuerte señal GUS fue encontrada en corteza (c) y tejido circundante al cilindro vascular (cv). No se observó señal en pelos radiculares (pr) ni en la punta de la raíz y tejido meristemático (m). A, B, D, E y F, tienen un aumento de 100X. C, tiene un aumento de 400X.

5.4. Análisis *in silico* de la región promotora *AtPht1;4* y elementos regulatorios de respuesta a señales medioambientales de estrés

El análisis *in silico* de la región promotora *AtPht1;4* (2,3 Kb), usando la base de datos PLACE (Plant *cis-acting* regulatory DNA elements) realizado por Kathikeyan y col. (2009), reveló la presencia de un número de putativos elementos *cis* que responderían o estarían asociados a distintas señales medioambientales (Kathikeyan y col, 2009). En el estudio citado anteriormente, se encontraron dos sitios para AtMyb2 (-1928 y -710) y un sitio para AtMyc2 (-1809), los cuales son reguladores transcripcionales positivos que responden a estímulos de déficit de agua y ABA (ácido abscísico) (Abe y col, 1997; Abe y col, 2003). Además, se identificaron dos cajas o dominios WRKY (WRKY domain) en las posiciones -1717 y -1699, que al parecer son reconocidas por los factores de transcripción WRKY, los cuales responden a estrés biótico y abiótico. También ha sido posible identificar dos dominios P1BS en las posiciones -1350 y -395 que, se postularía, podrían ser potencialmente reconocidas por el factor de transcripción de tipo MYB R2R3, denominado PHR1 (Rubio y col, 2001).

Partiendo de la base, de que las líneas estudiadas aquí son portadoras de una región río arriba del gen *AtPht1;4*, de 3 kb, mucho mayor a la reportada para el promotor *AtPht1;4*, de 2,3 kb; nuevos análisis *in silico* fueron efectuados (Figura 6). Aunque existió concordancia en algunos de los elementos *cis* descritos por Kathikeyan y col (2009), dado que coincide parte de la región promotora, también se presentaron algunas diferencias. Entre los elementos presentes, se identificaron algunos de los elementos de respuesta a estrés descritos por Kathikeyan y col (2009) aunque en una mayor frecuencia (Figura 6), como los de tipo MYCATERD1A y MYCATRD22 con tres elementos de respuesta a deshidratación (sequía) y ABA, respectivamente.

Adicionalmente, se hallaron cuatro motivos de respuesta a MYB1AT, cinco a MYB2CONSENSUSAT, uno a MYBATRD22, siete a MYBCORE y catorce a ACGTATERD1, todos ellos involucrados con la respuesta a deshidratación (Figura 6). Un número importante de ocho dominios P1BS, también fueron encontrados para la respuesta a deficiencia de fosfato. Sin embargo, se identificaron nuevos elementos de respuesta a señales medioambientales. Se hallaron dieciséis elementos MYCONSENSUSAT, de respuesta tanto a deshidratación como a bajas temperaturas. Además, se identificaron tres tipos de elementos diferentes y exclusivos para la respuesta a bajas temperaturas: dos elementos LTREs (low-temperature-responsive elements), un elemento CBF y un elemento CRT/DRE (C-repeat/dehydration-responsive elements). Finalmente, cinco elementos de inducción en anaerobiosis (anaerobic induction elements, AREs), y otros cinco de respuesta a calor (heat-stress-responsive elements, HSEs) fueron identificados (Figura 6). Contando con estos nuevos antecedentes, es que se planteó evaluar el efecto de señales medioambientales de calor, sequía, hipoxia y bajas temperaturas, así como combinaciones de ellas.

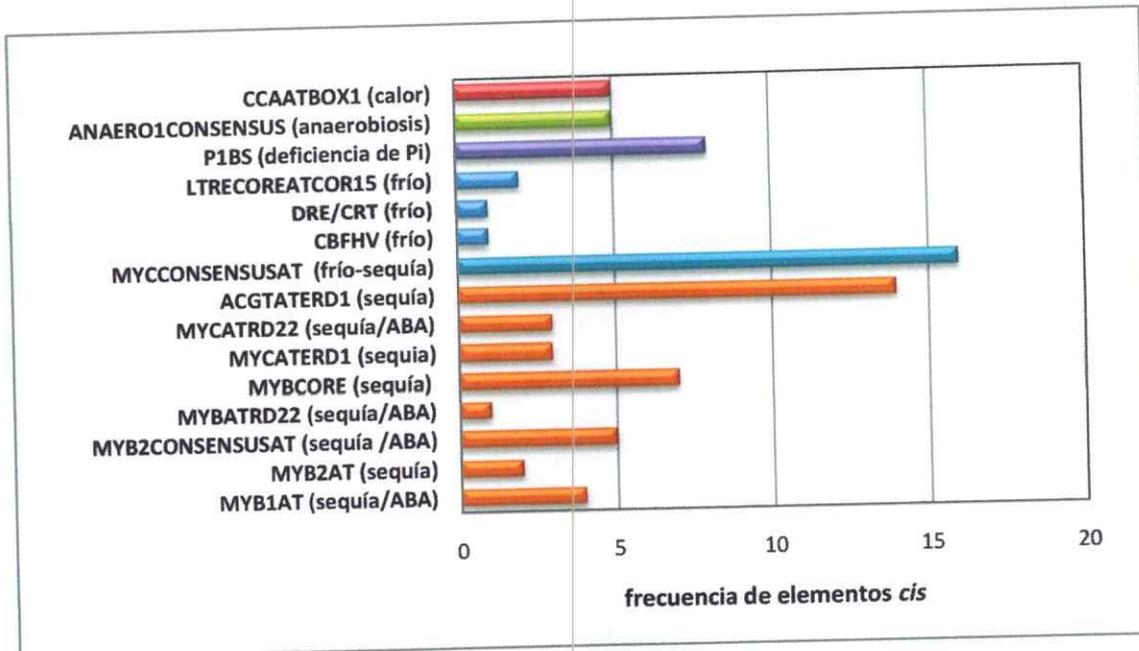


Figura 6. Frecuencia de elementos regulatorios cis presentes en 3 kb “río arriba” de la secuencia génica *AtPht1;4*. Las barras muestran la frecuencia de los elementos *cis* relacionados con las señales de estrés abiótico propuestas para el presente estudio, que se encuentran presentes en la región promotora de la construcción *AtPht1;4::GUS*. Estos elementos fueron determinados mediante el uso de la base de datos PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>). Los colores agrupan las barras según tipo de estrés abiótico involucrado: rojo (calor o alta temperatura), verde (anaerobiosis), morado (deficiencia de fósforo), celeste (frío o baja temperatura), turquesa (frío/sequía), naranja (sequía).

5.5. Análisis cuantitativo de actividad y expresión génica GUS en trigo transgénico *AtPht1;4::GUS* frente a la condición de hipoxia

Al plantear diferentes tratamientos experimentales de estrés abiótico, se trató de establecer una asociación entre la condición de déficit de Pi y una nueva señal medioambiental, que pudiera traducirse en un cambio en la demanda interna de fósforo. Para poder interpretar los resultados de cada ensayo, se debió establecer primero, si la inducción del sistema reportero fue efectiva. Es decir, se debió partir de

la base de un sistema inducido frente a déficit de Pi para adicionarle un efecto de sinergia sobre esta inducción o bien uno de represión generado por la nueva señal medioambiental. En el caso del ensayo de hipoxia, así como para el resto de los ensayos de estrés, fragmentos de raíces de plantas de trigo *AtPht1;4::GUS* crecidas en tierra, con suficiencia o carencia de fosfato, fueron testeados para actividad específica GUS. La condición de suficiencia de fosfato se ensayó con el propósito de establecer una comparación, y a la vez un control para poder testear continuamente la inducción del sistema generada frente a déficit.

Las condiciones establecidas para el ensayo de hipoxia permitieron alcanzar un estado de hipoxia efectiva en el sistema radicular de 3% de O₂ durante 8 h, aproximadamente. Basándose en mediciones cuantitativas de expresión del gen reportero, realizadas a través de mediciones de actividad específica GUS, se pudo corroborar una vez más, el grado de variación entre las distintas plantas transgénicas pertenecientes a una misma línea estudiada. Este fenómeno fue evidenciado en cada uno de los tratamientos sucesivamente efectuados. La condición de hipoxia así establecida, generó una disminución significativa ($P < 0,05$) en la actividad GUS en la línea IIA5 en presencia como en ausencia de fosfato (Figura 7). En la línea IIA292, también se observó una marcada reducción en la actividad, cercana al 50%, para plantas en condiciones de déficit y no se observó efecto del tratamiento de hipoxia en presencia de este.

En términos de expresión génica, la respuesta de la línea IIA292 frente a la condición establecida como hipoxia, se tradujo en un efecto no significativo tanto en la condición de suficiencia como en condiciones de déficit de fosfato (Figura 8).

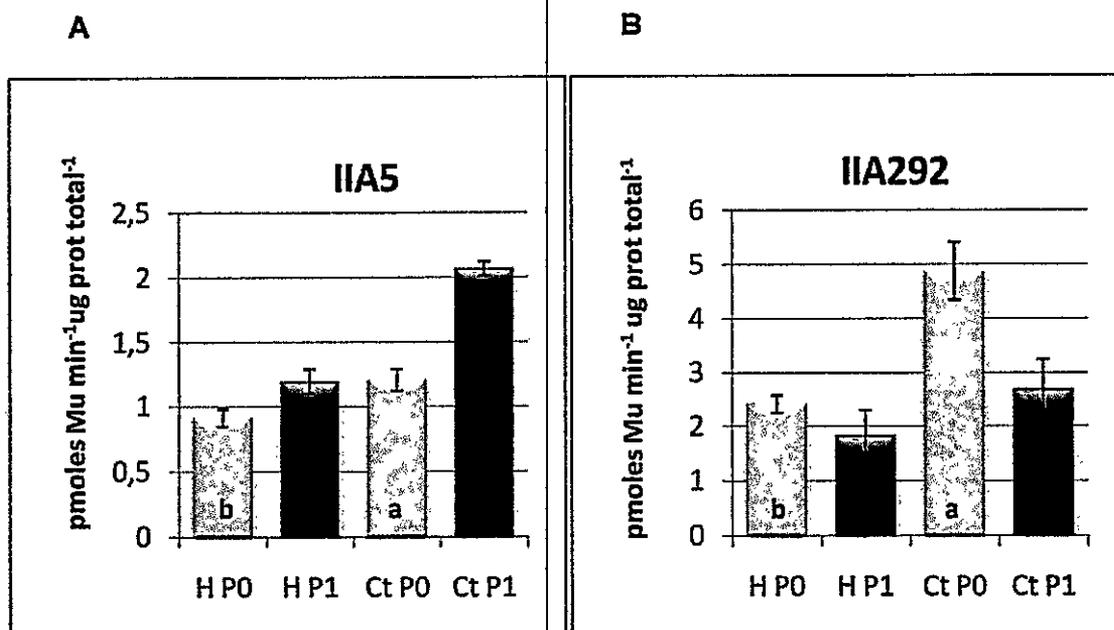


Figura 7. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión génica *Ph1;4::GUS* en respuesta a hipoxia. (A) Línea IIA5 y (B) línea IIA292. El estado de hipoxia (H), se indujo manteniendo un 3% de O₂ durante 8 h. El control (Ct) se mantuvo a 23°C/18°C en condiciones de normoxia. La concentración promedio de Pi en raíces fue de $0,0097 \pm 0,0021 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido en condiciones limitantes de Pi (P0, barras blancas) y de $0,0135 \pm 0,0023 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido en suficiencia de Pi (P1, barras grises). Cada barra de error representa promedio \pm SD (n=3). Barras del mismo color y marcadas con la misma letra indican que los valores promedios no son significativamente diferentes (test t- student, P<0,05)

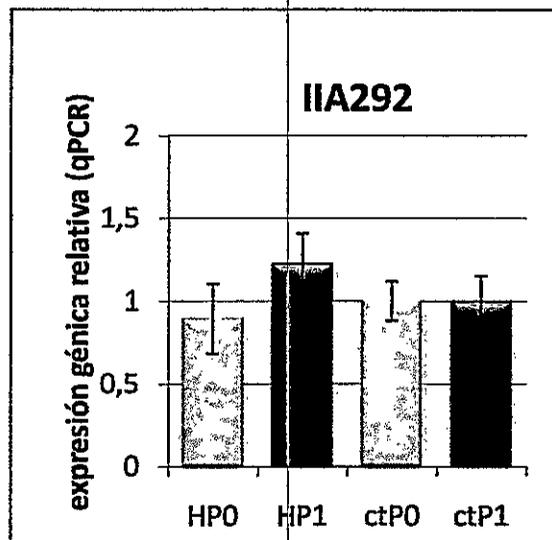


Figura 8. Niveles de expresión génica *GUS* mediante qPCR en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *Pht1;4::GUS* en la línea IIA292 en respuesta a hipoxia. La expresión génica se determinó mediante qPCR utilizando el gen *UBIQUITINA* como gen de referencia, y según el método de cuantificación relativa 2ddCt. HPO, condición de hipoxia y déficit de Pi. HP1, condición de hipoxia y suficiencia de Pi. ctPO, condición control con déficit de Pi. ctP1, condición control con suficiencia de Pi. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) calculada según $SD \Delta Ct = S\sqrt{(SD1^2 + SD2^2)}$ de los valores de Ct para qPCR (n=3).

Los resultados de tinción histoquímica junto a la actividad específica β -glucuronidasa permitieron, en su conjunto, establecer empíricamente un parámetro para la funcionalidad, según el cual, a partir de aproximadamente 0,5 pmoles de Mu/min'ug de proteína total, se pudo apreciar una coloración GUS efectiva en la raíz de las plantas ensayadas. Es decir, para valores de actividad inferiores a este umbral, no se presentó tinción GUS aparente y por lo tanto no se consideraron estos valores fidedignos, o más bien representativos de la actividad específica GUS. De este modo, la tinción GUS sirvió como una medida para apoyar consistentemente los resultados de actividad. Es el caso de la línea XI720, donde no se observó señal de tinción alguna

(Figura 2, C) lo que es consistente con los bajos niveles de actividad observados tanto antes como después realizar el ensayo de hipoxia (dato no mostrado).

5.6. Análisis cuantitativo de actividad y expresión génica GUS en trigo transgénico *AtPht1;4::GUS* frente a la condición de alta temperatura

En la línea IIA5, las condiciones de alta temperatura establecidas provocaron una reducción en la actividad GUS en condiciones de fosfato limitante y un efecto nulo en su presencia (Figura 9). En cuanto a la línea IIA292, también vio reducida su expresión sólo en presencia de fosfato, y en condiciones limitantes, esta línea no resultó afectada (Figura 9). Respecto de la expresión génica, ésta no mostró ser significativamente afectada (Figura 10).

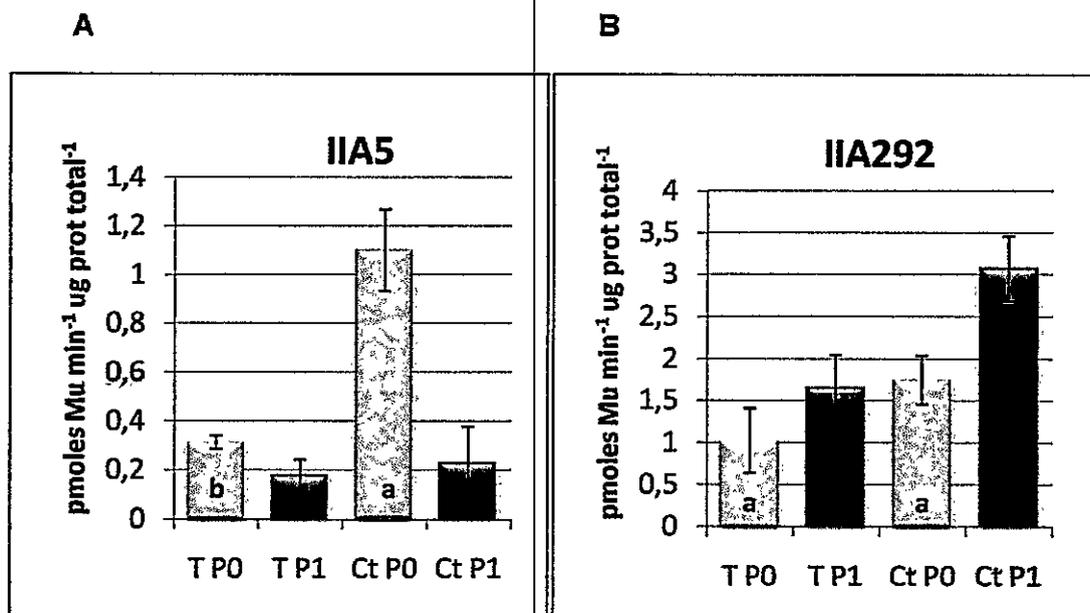


Figura 9. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión génica *Pht1;4::GUS* en respuesta a alta temperatura. (A) Línea IIA5 y (B) línea IIA292. Inicialmente la temperatura se mantuvo a 18°C y se elevó paulatinamente a 37°C (T), extendiéndose esta condición durante 8 h. El control (Ct) se mantuvo a 23°C/18°C. La concentración de Pi en raíces fue de $0,0088 \pm 0,0021 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido para la condición de deficiencia de fósforo (P0, barras blancas) y $0,0129 \pm 0,003 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido para la condición de suficiencia (P1, barras grises). Cada barra de error representa promedio \pm SD (n= 3-4). Barras del mismo color y marcadas con la misma letra indican que los valores promedios no son significativamente diferentes (Test t-student, $P < 0,05$).

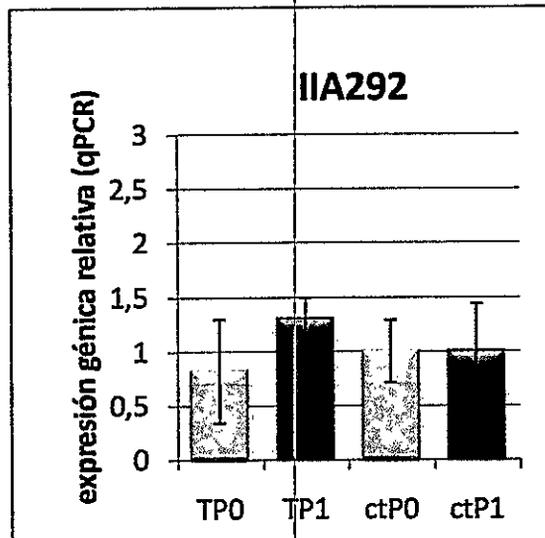


Figura 10. Niveles de expresión génica *GUS* mediante qPCR en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *Pht1;4::GUS* en la línea IIA292 en respuesta a alta temperatura. La expresión génica se determinó mediante qPCR utilizando el gen *UBI* como gen de referencia, y según el método de cuantificación relativa 2ddCt. TPO, condición de alta temperatura y déficit de Pi. TP1, condición de alta temperatura y suficiencia de Pi. ctPO, condición control con déficit de Pi. ctP1, condición control con suficiencia de Pi. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) calculada según $SD \Delta Ct = S\sqrt{(SD1^2 + SD2^2)}$ de los valores de Ct para qPCR (n=3).

5.7. Análisis cuantitativo de actividad y expresión génica *GUS* en trigo transgénico *AtPht1;4::GUS* frente a la condición de sequía

Tras haber inducido el estrés, las mediciones de actividad específica β -glucuronidasa en plantas IIA292 mostraron una reducción significativa en el estado de déficit de fósforo y se mostraron invariantes en condiciones de suficiencia (Figura 11). En cuanto, a la línea IIA5 no se observó efecto del tratamiento respecto de las plantas control, independientemente, de los niveles de fósforo presentes. En relación, a la expresión génica, se observó un incremento significativo de la expresión *GUS* en

plantas de la línea IIA292 con déficit de fósforo, y sometidas al tratamiento de sequía, que fue cercano a 10 veces de inducción relativo a la condición control (Figura 12). La situación de suficiencia de fósforo combinada a la de sequía no significó cambio alguno.

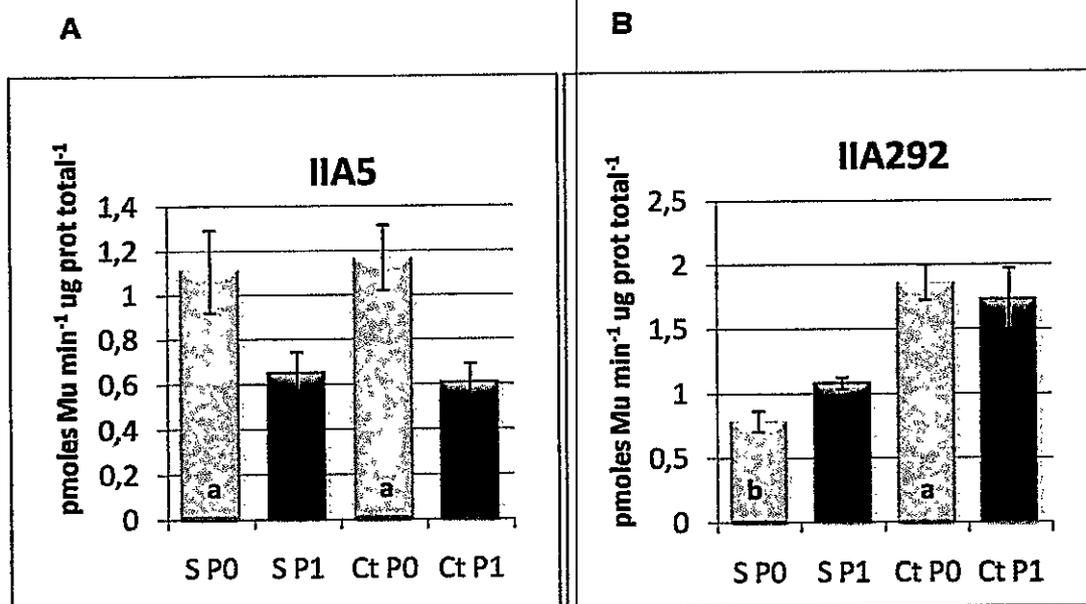


Figura 11. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión génica *Pht1;4::GUS* en respuesta a sequía. (A) Línea IIA5 y (B) línea IIA292. El estrés por sequía (S), se indujo por 7 días a 23°C. El control (Ct) se mantuvo con riego permanente a 23°C/18°C. La concentración de Pi en raíces fue de $0,009 \pm 0,0026 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido (P0, barras blancas) y de $0,014 \pm 0,0035 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido (P1, barras grises). Cada barra de error representa promedio \pm SD (n=4). Barras del mismo color y marcadas con la misma letra, indican que los valores promedios no son significativamente diferentes (Test t- student, $P < 0,05$).

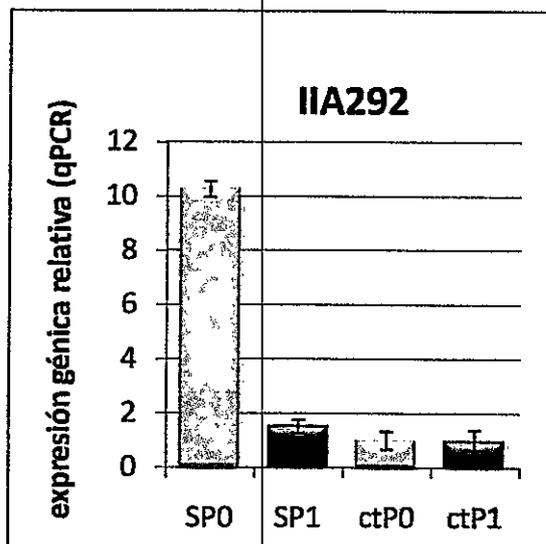


Figura 12. Niveles de expresión génica GUS mediante qPCR en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *Pht1;4::GUS* en la línea IIA292 en respuesta a sequía. La expresión génica se determinó mediante qPCR utilizando el gen *UBI* como gen de referencia, y según el método de cuantificación relativa 2^{-ddCt}. SP0, condición de sequía y déficit de Pi. SP1, condición de sequía y suficiencia de Pi. ctP0, condición control con déficit de Pi. ctP1, condición control con suficiencia de Pi. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) calculada según $SD \Delta Ct = S\sqrt{(SD1^2 + SD2^2)}$ de los valores de Ct para qPCR (n=4).

5.8. Análisis cuantitativo de actividad GUS en trigo transgénico *AtPht1;4::GUS* frente a la combinación de estrés por sequía y alta temperatura

Según las muestras control tanto en la presencia como en ausencia de fosfato, el tratamiento combinado de sequía y alta temperatura, provocó una significativa disminución de la actividad GUS cercana al 50% en la línea IIA292 (Figura 13). Para la condición de mono estrés, específicamente de sequía, la actividad no se vio afectada independiente del estatus de fosfato. En alta temperatura, la actividad se vio nuevamente reducida de una manera significativa y cercana al 50%. En la línea IIA5, respecto del tratamiento combinado, no se observaron diferencias significativas tanto

en ausencia como en presencia de fosfato (Figura 13). Cuando las muestras fueron sometidas a alta temperatura y sequía por separado, no se observó resultado alguno, salvo en el tratamiento de alta temperatura en la presencia de fosfato, en el cual, se pudo observar una disminución de la actividad cercana a la mitad. Para este tipo de tratamiento, la expresión génica no pudo ser evaluada. La combinación de ambos tipos de estrés, así como el tratamiento individual de ellos resulta en una clara inhibición de la actividad promotora *AtPht1;4::GUS*.

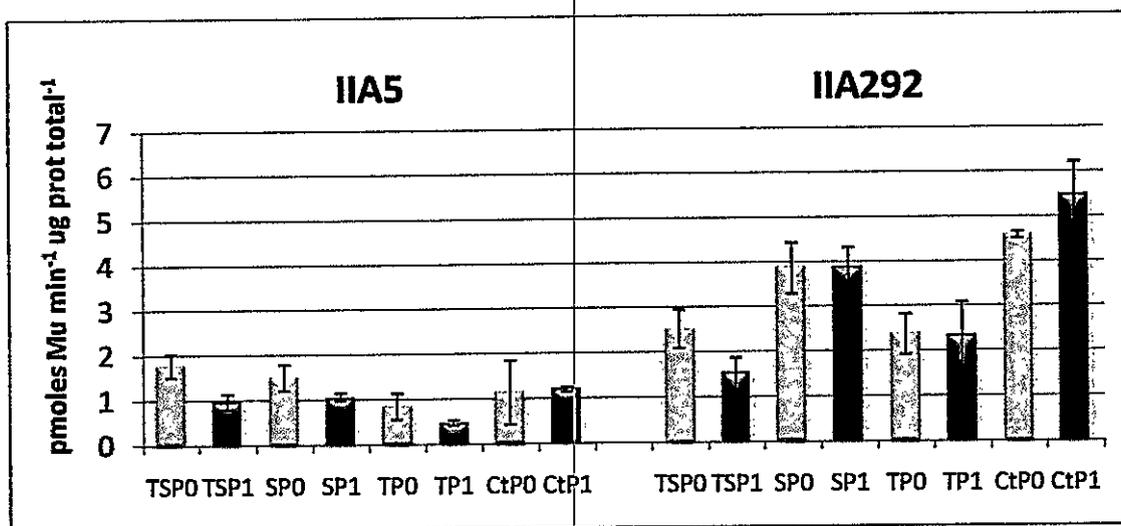


Figura 13. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión génica *Pht1;4::GUS* en las líneas IIA5 y IIA292 en respuesta a la combinación de estrés por alta temperatura y sequía. El estrés por sequía (S) se indujo por 7 días a 23°C y tras ello se incrementó la temperatura a 37°C (T). El control se mantuvo con riego permanente a 23°C/18°C. La concentración de Pi en raíces fue de $0,009 \pm 0,0026 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido (PO, barras blancas) y $0,014 \pm 0,0035 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido (P1, barras grises). Cada barra de error representa promedio \pm SD ($n=3$).

5.9. Análisis cuantitativo de actividad y expresión génica GUS en trigo transgénico *AtPht1;4::GUS* frente a la condición de frío

Antes de analizar el efecto del ensayo de frío, se verificó la inducción de *AtPht1;4::GUS* frente a déficit de fosfato, en plantas control de las líneas IIA5 y IIA292, como en ensayos anteriores. Se determinó que la inducción de la actividad GUS en *AtPht1;4::GUS* (IIA292) frente a déficit de Pi fue de ~ 2 .

El tratamiento de frío incrementó una unidad, aproximadamente, la actividad específica GUS en la línea IIA292 en condiciones de déficit de fosfato, respecto de la condición control (Figura 14). Sin embargo, los análisis de expresión (qPCR) para *AtPht1;4::GUS* (IIA292), corroboraron los resultados de actividad y mostraron un importante estallido transcripcional, del orden de trescientas veces de inducción por frío ante déficit de Pi, respecto del control sin tratamiento (Figura 15).

En el caso de suficiencia de fosfato, el tratamiento con frío no significó variación alguna. En la línea IIA5, no fue posible apreciar el efecto observado en IIA292. Sin embargo, esta tendencia fue desestimada debido a que los valores de actividad registrados fueron inferiores al umbral antes descrito, es decir, fueron mucho menores a 0,5 pmoles de Mu/min/ug de proteína total, situación corroborada a la vez, con la ausencia de tinción GUS efectiva (dato no mostrado).

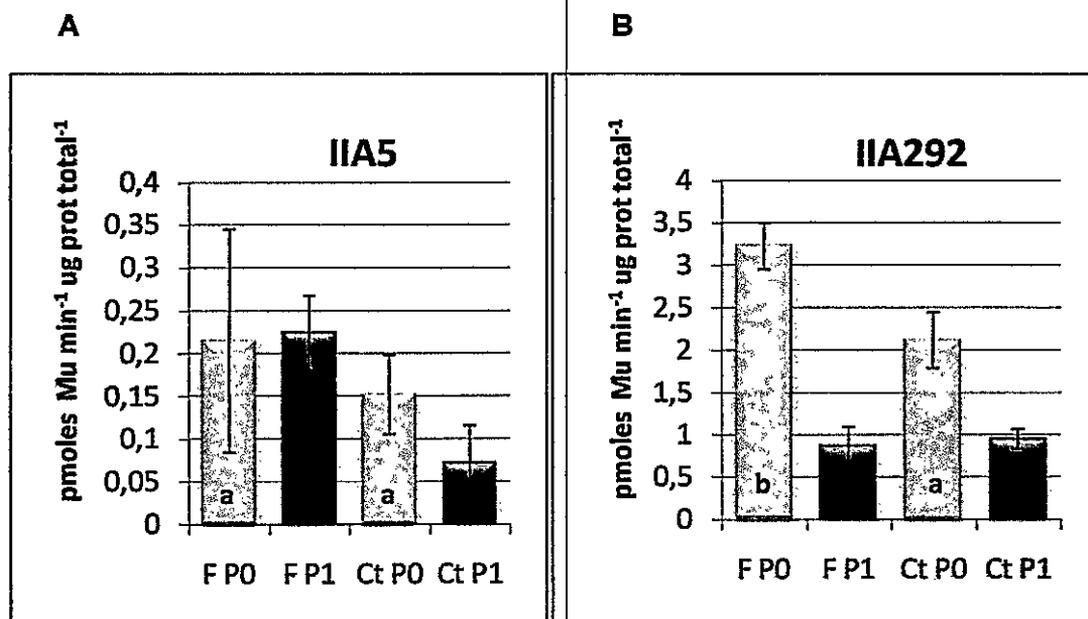


Figura 14. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *Ph1;4::GUS* en respuesta a estrés por frío. (A) Línea IIA5 y (B) línea IIA292. El estrés por frío (F) se indujo durante 3 días a 5°C. El control (Ct), se mantuvo a 23°C. La concentración de Pi en raíces fue de $0,008 \pm 0,001 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido (P0, barras blancas) y de $0,011 \pm 0,0017 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido (P1, barras grises). Cada barra de error representa promedio \pm SD (n=3-4). Barras del mismo color y marcadas con la misma letra, indican que los valores promedios no son significativamente diferentes (Test t-student, $P < 0,05$).

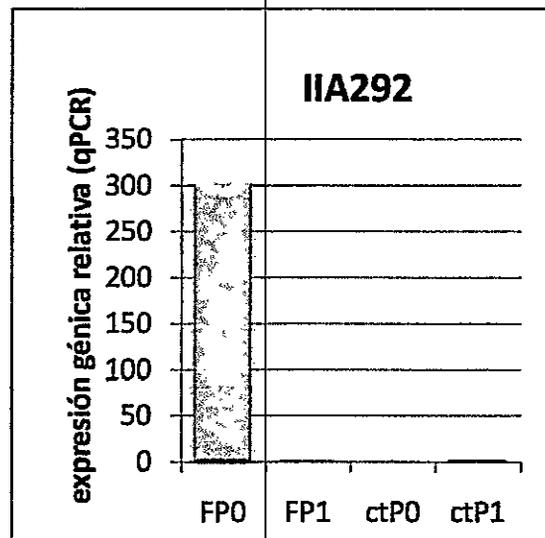


Figura 15. Niveles de expresión génica *GUS* mediante qPCR en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *AtPht1;4::GUS* para la línea IIA292 en respuesta a frío. La expresión génica se determinó mediante qPCR utilizando el gen *UBI* como gen de referencia, y según el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. FP0, condición de frío y déficit de Pi. FP1, condición de frío y suficiencia de Pi. ctPO, condición control con déficit de Pi. ctP1, condición control con suficiencia de Pi. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) calculada según $SD \Delta Ct = S\sqrt{(SD1^2 + SD2^2)}$ de los valores de Ct para qPCR ($n=4$).

6.0. Análisis cuantitativo de actividad y expresión génica *GUS* en trigo transgénico *AtPht1;4::GUS* frente a la combinación de estrés por hipoxia y frío

Al combinar ambos tipos de estrés, se tiene que la línea IIA292 exhibió un significativo incremento en la actividad enzimática *GUS* en la condición de déficit (P0) no observado en la condición de suficiencia (P1) (Figura 16). El análisis de expresión mediante qPCR mostró una tendencia similar (Figura 17). Sin embargo, se presentó un importante aumento de más de doscientas veces en las muestras sometidas tanto a frío como a hipoxia en el estatus de carencia de fosfato (P0) y relativo a las muestras sin tratar.

La línea IIA5 no mostró una variación o diferencia significativa de la actividad β -glucuronidasa independiente de los niveles de fosfato presentes. Sin embargo, como antes se mencionó, los valores de actividad enzimática para la línea IIA5 no son comparables a la línea IIA292, presentando la primera, valores de actividad muy inferiores y estrechamente cercanos al umbral empíricamente establecido, siendo por lo tanto, poco representativos y desestimables.

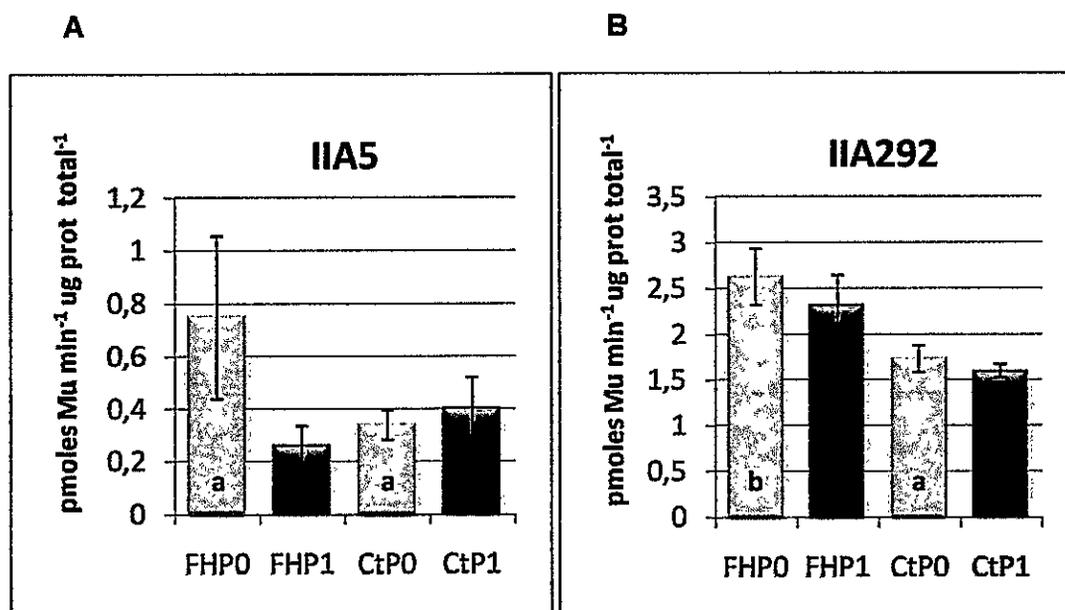


Figura 16. Actividad GUS en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión *AtPht1;4::GUS* en respuesta a la combinación de estrés por frío e hipoxia. (A) Línea IIA5 y (B) línea IIA292. La combinación de estrés por frío e hipoxia (FH), se indujo durante 3 días a 5°C y 3% de O₂. El control (Ct) se mantuvo en normoxia a 23°C/18°C. La concentración de Pi en raíces fue de $0,0068 \pm 0,002 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido (P0, barras blancas) y de $0,0127 \pm 0,004 \mu\text{mol Pi mg}^{-1}$ tejido (P1, barras grises). Cada barra de error representa promedio \pm SD (n= 3-4). Barras del mismo color y marcadas con la misma letra, indican que los valores promedios no son significativamente diferentes (Test t-student, P<0,05).

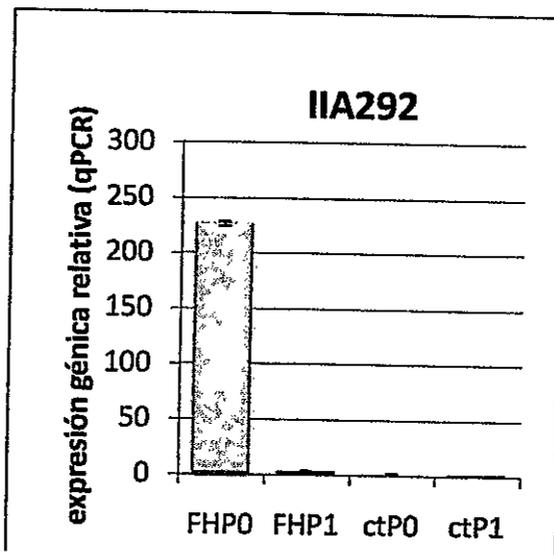


Figura 17. Niveles de expresión génica *GUS* mediante qPCR en plantas transgénicas de trigo T3 portadoras de la fusión génica *AtPht1;4::GUS* en la línea IIA292 en respuesta a frío e hipoxia. La expresión génica se determinó mediante qPCR utilizando el gen *UBI* como gen de referencia, y según el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. FHP0, condición de frío, hipoxia y déficit de Pi. FHP1, condición de frío, hipoxia y suficiencia de Pi. ctP0, condición control con déficit de Pi. ctP1, condición control con suficiencia de Pi. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) calculada según $SD_{\Delta Ct} = \sqrt{SD_1^2 + SD_2^2}$ de los valores de Ct para qPCR (n=4).

6. DISCUSIÓN

6.1. Evaluación de líneas transgénicas para el promotor *AtPht1;4* en trigo

Una efectiva aproximación para estudiar la expresión y regulación transcripcional de genes en sistemas heterólogos, es el monitoreo de la actividad de genes reporteros. El gen reportero GUS ha sido exitosamente utilizado en numerosos trabajos de investigación (Jefferson y col, 1987; Karthikeyan y col, 2002; Campillo y col, 2004). En este estudio, se hizo una evaluación del sistema promotor/gen reportero *AtPht1;4::GUS*, que consistió de la región promotora del gen para el transportador de alta afinidad *Pht1;4* de *Arabidopsis* (*AtPht1;4*) fusionada al gen reportero *GUS* e insertada en el genoma de trigo vía biobalística (método recurrentemente usado para la transformación genética de especies monocotiledóneas, pues resulta ser mucho más eficiente en estas especies que la transformación mediada por *A. tumefaciens*).

Inicialmente, se planteó evaluar tres líneas de trigo *AtPht1;4::GUS* con el objeto de caracterizarlas en relación a la fuerza con que es promovida la expresión génica en cada una de ellas. Numerosos estudios han mostrado que la inclusión de un intrón génico es frecuentemente esencial para altos niveles de expresión de un gen foráneo, incluyendo genes reporteros (Mc Elroy y col, 1990; Luerhsen y Walbot, 1991; Cornejo y col, 1993; Snowden y col, 1996). Sin embargo, el gen *AtPht1;4* no contiene intrones nativos en su secuencia génica para ser utilizados con esta finalidad (aunque posee un intrón, este se encuentra en la región 5'UTR y su función se relacionaría con la localización). Para soslayar la presencia o la ausencia de intrón, se planteó evaluar dos tipos de construcciones génicas. Una construcción sin intrón, representada por las

líneas IIA5 y IIA292 y una construcción con el intrón del gen *Adh1* de *Z. mays*, representada a través de la línea XI720. Resultados de los ensayos de tinción histoquímica y actividad GUS, mostraron que *AtPht1;4::GUS* fue funcionalmente expresado en raíces, especialmente en aquellas plantas que se encontraron en condiciones de déficit. Sin embargo, el promotor *AtPht1;4* en su forma nativa, para las líneas IIA5 y IIA292, exhibió bajos niveles de expresión del reportero GUS, además de presentar un alto grado de variabilidad, tanto de forma inter como intra línea. Al comparar las líneas IIA292 y IIA5, se vio que la primera promueve aproximadamente el doble de la expresión GUS que la segunda (Figura 1). La modificación del promotor *AtPht1;4* mediante la incorporación de un intrón foráneo (derivativo del gen *Adh1* de maíz) resultó en muy bajos niveles de expresión de actividad reportera GUS, en la línea XI720, en condiciones de deficiencia como de suficiencia de Pi. Un estudio similar realizado en cebada, para los promotores nativos de los genes *HvPht1;1* y *HvPht1;2* (Schümann y col, 2004), mostró que estos también dirigen bajos niveles de expresión génica de aproximadamente 1 a 2 pmoles de Mu/min/ug de proteína total en condiciones de déficit. Estos valores son muy parecidos a los obtenidos para la línea IIA5. Sin embargo, en el estudio de Schümann y col (2004), la inclusión del intrón del gen *Adh 1* de maíz (es decir la misma secuencia que se utilizó en este estudio), mostró un dramático incremento en la actividad GUS cercano a veinte veces, para distintas líneas crecidas en condiciones de déficit de Pi, respecto de las líneas portadoras de los promotores nativos (Schümann y col, 2004). Es decir, la inclusión de un intrón afectó de forma positiva y fuertemente la actividad promotora en cebada, lo cual no fue posible apreciar en nuestro sistema de expresión en trigo.

Al comparar la actividad GUS, promovida por *AtPht1;4::GUS* entre plantas pertenecientes a una misma línea (intra línea), tanto en IIA5 como en IIA292

(Figura 1), también se encontró que la expresión del gen reportero *GUS* había sido silenciada de forma total o parcialmente. Se pudo apreciar que aún cuando IIA292 muestra valores más homogéneos, tanto en condiciones de suficiencia como de déficit, existen algunas plantas (aproximadamente un 20%) con prácticamente nula expresión *GUS* (Figura 1). Esto último pudo observarse en los análisis de actividad, tinción histoquímica *GUS* y además en los experimentos de qPCR, en la presencia de fosfato como en su ausencia.

El éxito en el proceso de transformación genética no es únicamente determinado por la efectiva integración de transgenes en el genoma de la planta, sino también en la habilidad de estos transgenes para ser establemente expresados en las siguientes o sucesivas generaciones. El uso de bombardeo de partículas, como un efectivo, reproducible y viable método, para introducir genes que controlan importantes rasgos de interés económico, ha revolucionado la investigación en el cultivo de trigo, en las últimas décadas (Anand y col, 2003; Alspeter y col, 1996). Sin embargo, esta tecnología ha sido cada vez más cuestionada y catalogada como limitada, por la baja frecuencia de generación de plantas que muestren o exhiban altos niveles de expresión. Este problema, se ha visto exacerbado por reportes de silenciamiento génico en trigo, detectado al hacer un seguimiento sobre varias generaciones de plantas transgénicas (Anand y col, 2003; Alvarez y col, 2000; Demeke y col, 1999). Transgenes que han sido integrados en el genoma de trigo, y que fueron incorporados mediante bombardeo de partículas, pueden ser transmitidos y en la mayoría de los casos expresados hasta la tercera generación (Basri y col, 2005). Este podría ser el caso, de las líneas de trigo estudiadas aquí, donde se ha evidenciado que la expresión del gen *GUS* aparece disminuida o completamente ausente, sobre algún número de plantas en distintas líneas que son homocigotas, a partir de la tercera generación.

Se ha reportado, que el porcentaje de plantas transgénicas de trigo que son susceptibles al fenómeno de silenciamiento génico (Chen y col, 1998; Anand y col, 2003), es muy superior a los niveles de silenciamiento reportado en otras especies de monocotiledóneas, tales como arroz y sorgo (Chareonpornwattana y col, 1999; Krishnaveni y col, 2001). Esto probablemente sea una consecuencia de la complejidad del genoma de trigo, dado su gran tamaño (17000 Mb) y su carácter poliploide (hexaploide), hecho que transforma en una gran desafío cualquier tipo de manipulación genética (Patnaik y Khurana, 2001).

Una inestable expresión de transgenes es frecuentemente relacionada con la integración de múltiples copias en el genoma de la planta (Muller y col, 1996); un efecto posicional, dado la ocurrencia de numerosos re-arreglos cromosomales en los sitios de integración (Weiler y Wakimoto, 1995) y el efecto de metilación del loci transgénico (Srivastava y col, 1996). Se ha visto, que la expresión de un transgén en una planta es inversamente proporcional al número de copias del plásmido incorporadas. Se argumenta que varias copias de un transgén pueden generar co-supresión y silenciamiento (Fagard y Vaucheret, 2000; Daí y col, 2002; Shou y col, 2004; Asem y Hassam, 2008).

Para poder determinar el número de copias existentes en distintas líneas transgénicas, es necesario efectuar un ensayo de Southern blot. Sin embargo, las líneas estudiadas aquí, no han sido objeto de este tipo de caracterización. Los resultados de expresión génica GUS muestran un alto grado de variabilidad entre las líneas, con plantas silenciadas en todas ellas, y una línea totalmente silenciada (X1720), lo que debe estar correlacionado de forma directa respecto del número de copias del plásmido incorporado en cada una de ellas.

Tras evaluar las distintas líneas según la fuerza con que se promovió la expresión *AtPht1;4::GUS* y poder postular que presentaron diversos grados de silenciamiento, se escogió a IIA292, como la mejor línea para representar el sistema reportero, aún cuando, presentó bajos niveles de expresión y como se mencionó anteriormente, también exhibió plantas con nula actividad GUS. Por lo tanto, se planteó evaluar los siguientes experimentos en esta línea, aunque de igual modo, se contó con IIA5 como referente para los ensayos de actividad.

6.2. Evaluación del sistema *AtPht1;4::GUS* en trigo según el estatus de fósforo

Una vez elegidas las líneas blanco, se planteó establecer la capacidad de respuesta del sistema reportero *AtPht1;4::GUS* en trigo frente al déficit de Pi. Una de las más importantes características de los transportadores de fósforo de alta afinidad, como *AtPht1;4* (o *AtPT2*) es su inducción en condiciones de baja concentración de fósforo (Muchhal y col, 1996). En plantas de *Arabidopsis* portadoras de la construcción reportera *AtPht1;4::GUS*, se ha visto que la actividad *GUS* se incrementa como una consecuencia directa de los cambios en la concentración de Pi en el medio (Clarkson y col, 1978; Drew y col, 1984).

En el sistema de estudio planteado se pudo corroborar que frente a condiciones de déficit de Pi, la fusión génica *AtPht1;4::GUS* en trigo, reportó mayores niveles de actividad GUS que frente a condiciones de suficiencia. Es decir, se pudo constatar la inducción génica del sistema reportero frente a déficit, tanto en la línea IIA5 como en la línea IIA292, siendo en esta última notoriamente más marcada. A pesar, de que cierto porcentaje de las plantas en ambas líneas no presentaron expresión GUS, aún fue

posible estimar la capacidad de respuesta del sistema frente a déficit de Pi en el resto de los ejemplares, al omitir los valores de expresión nula y poco consistente. Con este sesgo, se procedió a trabajar en los siguientes ensayos.

Ha sido reportado, que el sistema *AtPht1;4::GUS* en *A. thaliana* y *N. tabacum* promueve actividad GUS únicamente en condiciones de deficiencia de Pi (Karthikeyan y col, 2002). Sin embargo, a pesar de lo descrito por la literatura, la fusión *AtPht1;4::GUS* en trigo, promovió también actividad en condiciones de suficiencia, lo que fue evidenciado mediante actividad y tinción histoquímica GUS. Una explicación para esta condición, es que los valores de actividad y expresión GUS reportados frente a suficiencia sean basales. Al observar los valores de actividad promedio, vemos que la inducción frente a déficit fue únicamente cercana al doble, lo anterior implica que la inducción que vemos frente a déficit debió haber sido más marcada aún, para poder diferenciarse más claramente de la condición de suficiencia y no evidenciar valores tan comparables. Esto hace suponer que para el caso de la línea IIA292 (línea que mostró el mejor desempeño) se promovió actividad GUS únicamente de forma parcial, según lo comentado anteriormente, las líneas podrían presentar distintos grados de silenciamiento génico, teniéndose una línea IIA292, donde la inducción es apreciable, pero de un modo incompleto, como si fuera una línea heterocigota. En el caso de la línea IIA5, mostró niveles de actividad tanto en la condición de déficit como de suficiencia, bastante parejos, o sea, donde la inducción génica no fue tan evidente. Finalmente, a pesar de no exhibir niveles de expresión considerables, se tiene que la inducción génica igualmente fue apreciable en la condición de déficit, especialmente para la línea con mayor expresión (IIA292). Por lo tanto, este sistema, se postuló como igualmente válido para poder estimar la respuesta de *AtPht1;4::GUS* frente a los tratamientos experimentales inicialmente propuestos. La inducción del promotor

AtPht1;4 a bajos niveles de Pi en trigo, sugiere que los elementos *cis* para el déficit de Pi, pueden funcionar tanto en células de *Arabidopsis* como en trigo, lo que evidencia un alto grado de conservación de este tipo de respuestas en especies mono y dicotiledóneas, tal como ha sido predicho *in silico*. (Tittarelli y col, 2007) y ha sido reportado en especies como maíz (Coelho y col, 2010).

6.3. Localización tisular de la expresión de *AtPht1;4::GUS* en trigo

Antes de efectuar los tratamientos de estrés abiótico, surgió la interrogante sobre la forma en la cual se estaba expresando la fusión reportera *AtPht1;4::GUS* en la raíz trigo, es decir, se planteó determinar su localización celular. Una de las ventajas de usar genes reporteros, como *GUS*, es la facilidad para observar los patrones de expresión génica tejido y órgano específico. En este trabajo se pudo corroborar que la actividad de el promotor *AtPht1;4* en trigo (sistema heterólogo), se restringe casi exclusivamente a la raíz, confirmándose el carácter de promotor tejido-específico.

En *Arabidopsis*, ocho de los nueve miembros de la familia de transportadores *Pht1* son expresados en raíces, asumiéndose que colectivamente se encargan de mediar la toma de Pi desde el suelo y su transporte hacia el resto de la planta (Bucher y col, 2001; Mudge y col, 2002; Okumura 1998). Sin embargo, el rol particular de cada uno de ellos y su contribución en el transporte de Pi no es del todo conocido. Reportes sobre el patrón de expresión de *AtPht1;4::GUS* en la raíz de *Arabidopsis*, han mostrado expresión *GUS* en la mayor parte de ésta, siendo muy evidente en epidermis así como en tejido indiferenciado (zona meristemática) presente en la punta de la raíz y en la zona de elongación (Karthikeyan y col, 2002). También, una fuerte señal de

actividad GUS ha sido detectada en tejido vascular de regiones diferenciadas o zona de maduración (Mudge y col, 2002; Karthikeyan y col, 2002). Del mismo modo, se ha reportado una alta actividad en estructuras externas de la raíz, como pelos radicales o tricoblastos (Karthikeyan y col, 2002). El sistema *AtPht1;4::GUS* en trigo, cumplió parcialmente con lo anteriormente descrito. Se observó una muy débil señal en epidermis y no se vio expresión del reportero GUS en pelos radicales o tricoblastos, tanto en condiciones de suficiencia como de déficit. Tampoco, fue posible observar señal de actividad GUS en otras estructuras externas de la raíz, como el capuchón protector del meristema radical (root cap) ni en la punta de la raíz (root tip). Sin embargo, una fuerte señal GUS, fue detectada en el tejido que circunda y forma parte del sistema vascular, principalmente en la corteza de raíces maduras o diferenciadas. Los tricoblastos o pelos radicales son estructuras que son reconocidas como el principal sitio de toma de fosfato desde la solución del suelo (Gahoonia y col, 1998). El desarrollo y elongación de pelos radicales, es considerado un importante componente en la incorporación de fosfato, debido a la gran superficie de exploración que abarcan y a la habilidad que tienen para acceder a los poros presentes en el suelo. Cerca del 63% de la incorporación de fosfato, procede vía pelos radicales, especialmente en condiciones de deficiencia (Gahoonia y col, 1998). Sin embargo, los resultados obtenidos para *AtPht1;4::GUS* en trigo, no concordaron con la adquisición de fosfato por esta vía. Al parecer estos resultados indicarían que en el sistema heterólogo estudiado aquí, el promotor *AtPht1;4* no tendría relación con dirigir la expresión de un transportador para la transferencia de Pi desde el suelo hacia la planta, sino más bien, controlaría a un transportador involucrado con el traspaso de fosfato (Pi) desde las células de la raíz hacia el sistema vascular, es decir tendría un papel en la carga del xilema.

Un estudio reciente mostró, mediante deleciones del promotor *AtPht1;4* en maíz, que la presencia de un intrón 5'UTR, es gravitante para la expresión en estructuras como el ápice o punta de la raíz (Coelho y col, 2010). Es probable, que en el sistema *AtPht1;4::GUS* estudiado, este intrón pudiera encontrarse ausente, debido a la ocurrencia de re-arreglos en el locus de inserción o bien parcialmente metilado producto de un potencial fenómeno de silenciamiento génico, que terminaría afectando directamente el patrón de expresión de este promotor.

Generalmente, se asume que los transportadores de fosfato (Pi) de alta afinidad están involucrados en la toma de fosfato por la raíz, mientras que los de baja afinidad se encargan de regular el movimiento de fosfato hacia la planta. Esta presunción, se debe a numerosas publicaciones existentes sobre la expresión diferencial en raíces de un número de transportadores de fosfato de alta afinidad clonados (Muchhal y col, 1996; Smith y col, 1997; Liu y col, 1998a y 1998b). Sin embargo, estudios realizados a la fecha, han sugerido la existencia de dos tipos de sistemas de transportadores de alta afinidad operando bajo condiciones de deficiencia de Pi. Uno que respondería rápidamente y de forma específica ante el déficit de Pi y otro que se expresaría durante la deficiencia, pero también en condiciones de suficiencia. En el primer caso, esta función podría ser llevada a cabo por el transportador *AtPht1;4* mientras que en el segundo caso, se tendría a otro transportador de alta afinidad denominado *AtPht1;2*, que incrementaría su expresión hasta dos veces bajo condiciones de deficiencia respecto a las de suficiencia. Se ha reportado, que la expresión del transportador *AtPht1;2* se encuentra totalmente ausente del tejido meristemático presente en la punta de la raíz (root tip) y de la estructura de capuchón que protege a dicha zona meristemática (root cap) y sus niveles de expresión disminuyen en las ramificaciones hacia la formación de raíces secundarias. Otro transportador de esta familia, *AtPht1;3*

es expresado fuertemente en tejido vascular con bajos niveles de expresión en células epidérmicas cercanas a la punta de la raíz y raíces laterales. Es decir, el patrón de expresión de los transportadores *Pht1* es complejo y con solapamiento en los sitios de expresión para algunos miembros de esta familia (Mudge y col 2002; Karthikeyan y col, 2002). El patrón de expresión del promotor *AtPht1;4* en trigo, coincide parcialmente con el documentado para ese promotor y para otros miembros de esta familia. Lo cual no es raro, dado el alto nivel de identidad que ellos exhiben en su estructura transcripcional.

6.4. *AtPht1;4::GUS* en trigo y su respuesta a los tratamientos experimentales de estrés abiótico

El estudio de los elementos *cis* y *trans*, relacionados con estrés, presentes en los promotores de genes tipo *Pht1* ha sido escasamente documentado. Ha sido demostrado que los elementos *cis* presentes en los promotores de genes del tipo *AtPht1*, en sistemas heterólogos, son suficientes para mediar la respuesta frente a déficit de fosfato (Karthikeyan y col, 2002; Koyama y col, 2005; Tittarelli y col, 2007). Aparte de los elementos de respuesta a déficit de Pi, comunes a todos los promotores de tipo *Pht1*, tales como P1BS y PHO-like (Franco-Zorrilla y col, 2004; Hammond y col, 2004), existen otros elementos *cis* que pueden resultar importantes en la regulación transcripcional de los promotores *Pht1 in vivo*. El análisis *in silico* de la región promotora *AtPht1;4* (3,0 Kb) utilizada en las construcciones ensayadas en este estudio (Figura 6), reveló la existencia de un número importante de elementos regulatorios que estarían relacionados con diferentes señales medioambientales de estrés,

principalmente, con la respuesta frente a deshidratación (o sequía), con las bajas temperaturas, o combinaciones de ambas, como en el caso de los dieciséis elementos MYCCONSENSUSAT (Figura 6). Esta evidencia *in silico*, constituyó el punto de partida para establecer una asociación *in vivo* mediante los distintos tratamientos de estrés que se planteó estudiar.

Al hacer una estimación de la condición inicialmente descrita, es decir, que las líneas presentarían cierto grado de silenciamiento, se determinó analizar un número de plantas, entre las cuales se escogió, únicamente, aquellas cuyos valores de actividad (líneas IIA5 y IIA292) y expresión GUS (línea 292), mostraron mayor coherencia. Como antes fue mencionado, se estableció empíricamente un valor o parámetro para la expresión de la actividad GUS. Generalmente, por sobre un valor de actividad de 0,5 pmoles de Mu/min/ug proteína total, la coloración azul pudo ser efectivamente apreciada en las muestras de raíces sometidas a tinción. Esto permitió determinar aquellos ejemplares donde la inducción frente a déficit de fosfato fue efectiva.

Para el ensayo de hipoxia (o baja disponibilidad de oxígeno), inicialmente los valores de actividad de la línea IIA292 en suficiencia versus déficit de las plantas control, mostraron una tasa de inducción de $-pi/+pi \sim 2$, lo que permitió certificar la funcionalidad del sistema *AtPht1;4::GUS*, es decir su capacidad de detectar el déficit y responder a este mediante un aumento o inducción de la expresión génica. Respecto de la hipoxia misma, se vio que la inducción se mantuvo pero a una tasa menor y determinó una disminución significativa de la actividad frente a déficit de fosfato, es decir se reprimió la actividad del sistema reportero *AtPht1;4::GUS* por causa de esta señal. No se observó efecto de la hipoxia durante suficiencia de fosfato, lo que demuestra que la condición de déficit de Pi es la que determina la versatilidad de

respuesta del promotor *AtPht1;4* frente a otros tipos de estímulos. Quizás, 8 h de tratamiento en la condición de hipoxia, no fueron suficientes para provocar un incremento en la inducción génica. Para evaluar la funcionalidad de esta metodología, se midió la expresión génica para el gen *Adh1* (Peñaloza *et al*, comunicación personal), un conocido gen marcador o indicador de aclimatación a bajas concentraciones de O₂ (Andrews y col, 1993; Drew, 1997). Se vio que 8 h son insuficientes para gatillar un cambio significativo en la expresión de este gen, mientras que 12 h de hipoxia provocaron un incremento de, aproximadamente, 14 veces, respecto de la condición control.

Estos datos se vieron confirmados al observar nuestros análisis de expresión mediante qPCR, donde no se apreciaron cambios significativos entre la condición control y el tratamiento experimental. Por lo tanto, se estima que nuevos experimentos deben ser efectuados a partir de 12 h para poder ver un posible efecto sobre la inducción génica *AtPht1;4::GUS*. Probablemente, 8 h de hipoxia no signifiquen un estrés de fosfato en la planta, siendo aún capaz de sostener su metabolismo sin hacer el *switch* completo hacia un metabolismo de tipo fermentativo o glicolítico, al incrementar la utilización de fotoasimilados, sustentando la producción de energía por la vía regular de fosforilación oxidativa.

Respecto del tratamiento de alta temperatura, al observar los resultados de actividad y de expresión génica *AtPht1;4::GUS* (IIA292), vemos que no fue posible verificar el sistema de inducción en los controles, por lo que no se pudo establecer una respuesta clara frente al tratamiento, en este sentido.

Al observar los resultados de expresión GUS (qPCR) para IIA292 frente al tratamiento de sequía, se vio una inducción de la respuesta frente a déficit de Pi de, aproximadamente, diez veces, respecto del control. Por lo tanto, el tratamiento de

sequía fue capaz de provocar una respuesta a nivel transcripcional que sin embargo, no llegó a ser evidenciado a nivel de la traducción de este mRNA. Por lo tanto, *AtPht1;4* se estaría comportando como un gen inducible por sequía, ya que los elementos de respuesta relacionados con deshidratación desplegados en su promotor, fueron capaces de responder de forma directa a la condición de sequía impuesta. La sequía involucra la pérdida de agua y deshidratación tanto a temperaturas normales como elevadas. La contracción de las células conduce a pérdidas de turgor, estrés osmótico y cambios en el potencial de membrana. Bajo una condición de severa pérdida de agua desde la célula, puede ocurrir desintegración de su membrana y la abolición de muchos procesos metabólicos (Mahajan y Tuteja, 2006). Es por ello, que la ausencia del agua disponible podría disminuir, por ejemplo, la tasa fotosintética, y por lo tanto, podría incrementarse la demanda interna de Pi por una escasa generación de ATP. Tiene sentido, entonces, que un período de sequía de varios días, promueva la expresión de transportadores de fosfato de alta afinidad.

Según los resultados de actividad GUS para el ensayo combinado de shock térmico y sequía, no fue posible apreciar una clara inducción en ninguna de las dos líneas en estudio para la condición control. Al comparar la condición control versus el ensayo combinado, sin fosfato, se produjo una disminución de la actividad GUS en IIA292, mientras que en IIA5 no se observaron diferencias significativas. Este ensayo, replicaría la condición de los ensayos individuales, es decir, de no mostrar una significativa variación respecto de la condición control, aunque tienden a la baja de la actividad GUS. Probablemente, esto se deba al no haber podido establecer un mayor grado de inducción frente a déficit de fosfato en estas plantas, quizás, una diferencia más notoria hubiera determinado una mayor fuerza de respuesta frente a estímulos como este.

En el tratamiento de frío o baja temperatura, el análisis de expresión (qPCR) para *AtPht1;4::GUS* (IIA292), corroboró los resultados de actividad y a la vez, mostró un importante estallido transcripcional, del orden de trescientas veces de inducción por frío ante déficit de Pi. Nuevamente, quedando de manifiesto, el potencial grado de silenciamiento que podrían sufrir estas plantas, las cuales no fueron capaces de traducir este incremento transcripcional a un nivel funcional, manifestando únicamente un aumento moderado de la actividad frente a la combinación frío-déficit de fosfato. Finalmente, los resultados del ensayo combinado de frío-hipoxia reforzaron la tendencia mostrada por los ensayos individuales. A pesar, de la baja tasa de inducción $-pi/+pi \sim 1$, en plantas control *AtPht1;4::GUS* (IIA292), se vio que la combinación frío-hipoxia y déficit de Pi, incrementó la actividad *AtPht1;4::GUS* (IIA292) en, aproximadamente, una unidad. Nuevamente, a nivel transcripcional, la combinación de tratamientos se tradujo en un gran incremento en la expresión, mayor a doscientas veces. Como antes se mencionó, el tratamiento individual de hipoxia, probablemente, no sería efectivo durante 8 h y por el contrario, tendería a reducir la actividad, aproximadamente a la mitad, mientras, que el tratamiento individual de frío incrementó la actividad alrededor de una unidad. Al combinar ambos tipos de estrés, y producirse un balance entre sus efectos, podemos ver que el frío aún en combinación con la hipoxia, estimularía fuertemente la actividad GUS cuando existe una condición limitante de fosfato. A nivel transcripcional, el efecto del frío se vio manifestado fuertemente, aunque de forma levemente menor versus la situación de frío como estrés único.

Podemos decir, entonces, que *AtPht1;4* actuaría como gen de tipo COR o de respuesta a frío ("cold responsive genes"; COR-genes), es decir un gen que es regulado a través de los elementos de respuesta de tipo específico presentes en su

promotor (*cis-acting elements*) llamados C-repeat/dehydration–responsive elements (CRT/DRE) o low temperature responsive elements (LTREs) (Beck y col, 2007). La secuencia promotora *AtPht1;4* estudiada, contó con cuatro elementos *cis* de este tipo, además de dieciséis MYCCONSENSUSAT, los cuales serían responsables de una gran inducción génica en frío en combinación con la deficiencia de fosfato. Respecto de la importancia biológica de la inducción de *AtPht1;4* frente a frío, ha sido reportado un rol relevante de nutrientes como el N y P en la aclimatación a bajas temperaturas, las cuales inhiben el proceso de fotosíntesis, y en consecuencia, reducen la disponibilidad de fosfato inorgánico (Hurry y col, 2000). Debido a esto, los transportadores de fosfato de alta afinidad resultarían fundamentales para restablecer la homeostasis interna de Pi. La inducción de promotor *AtPht1;4* frente a frío, podría indicar un reajuste del estatus celular de Pi y el restablecimiento de la producción de azúcares, a través de fotosíntesis.

6.5. Perspectivas

La disponibilidad de fosfato es un factor limitante en el crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas. Tanto en el contexto ecológico como agrícola, las plantas crecen en suelos con bajo contenido de fosfato soluble, y particularmente en el caso del trigo cultivado en Chile, en los suelos ácidos del Sur, donde la solubilidad de fosfato es aún menor. Las plantas responden a esta situación mediante una serie de adaptaciones y cambios fisiológicos, metabólicos y del desarrollo que tienen por objeto aumentar la adquisición de este nutriente vital desde el suelo para poder sustentar su crecimiento y supervivencia. Sumado a la baja disponibilidad de fosfato, las plantas se

ven enfrentadas a condiciones ambientales que también podrían influenciar la incorporación de este nutriente. Esta situación resulta particularmente importante, en términos de su efecto en la producción agrícola. Este trabajo de tesis proporcionó una mirada hacia la comprensión de este respecto, al estudiar un promotor para un transportador de fosfato en trigo frente a tratamientos de estrés que simulaban condiciones del cultivo en campo. De este modo, fue posible establecer la existencia de una influencia directa en la respuesta de este promotor en términos transcripcionales, que estaría vinculada a estímulos de bajas temperaturas y en menor grado de sequía, frente al déficit de fosfato. Lo anterior permitiría sugerir una mayor incorporación y/o distribución de este nutriente por parte de la planta, al verse enfrentada a tales condiciones de estrés. Tal información podría resultar relevante en términos de estimular la producción de cultivos de importancia económica como trigo. Sin embargo, dada la complejidad de la respuesta frente a deficiencia de fosfato, la explotación del potencial de esta respuesta dependerá de un dominio más acabado del sistema regulatorio. Se requieren trabajos adicionales para identificar otros componentes del sistema regulatorio, tales como factores de transcripción, y la coordinación con otras redes de señalización, así como la relación con hormonas y azúcares, involucrados en la respuesta a deficiencia de fosfato, antes de poder hacer una aproximación hacia la agricultura sustentable. Sin embargo, el uso de líneas transgénicas para promotores relacionados con la adquisición de fosfato, resulta ser una valiosa herramienta informativa como una aproximación hacia la comprensión de la respuesta transcripcional asociada a potenciales interrelaciones entre la asimilación y metabolismo de fosfato y señales medioambientales.

7. CONCLUSIONES

- Se determinó los niveles de actividad GUS para tres líneas diferentes y se estableció que la línea representante de la construcción con el intrón del gen *Adh1* de maíz, XI720, exhibió niveles de expresión considerablemente más bajos que las líneas para la construcción sin intrón. Esto podría explicarse por un efecto de represión de la expresión por parte del mismo intrón. La línea IIA292 presentó el nivel mayor y más homogéneo de expresión entre plantas, por lo que fue seleccionada para ensayos posteriores.
- A pesar del grado de silenciamiento observado en las líneas estudiadas, se pudo efectivamente establecer una expresión *GUS* de tipo raíz-específica e inducida frente a deficiencia de fosfato, en el sistema heterólogo planteado, tal como ha sido reportado para el promotor *AtPht1;4*.
- La localización tisular de la expresión *GUS*, situó la expresión del sistema promotor-gen reportero *AtPht1;4::GUS* circundando al tejido vascular, lo que permitiría postular un importante papel de *Pht1;4* en el transporte de Pi desde la raíz hacia el resto de la planta por la vía del xilema.
- Se estableció que las bajas temperaturas, y en menor grado la sequía (o baja disponibilidad de agua), tuvieron un importante efecto en la respuesta del promotor *AtPht1;4* en trigo frente a deficiencia de fosfato, sugiriendo una fuerte influencia del frío sobre el patrón de expresión de genes relacionados con la adquisición de fosfato.

- Se proporcionó una visión de cómo otros tipos de señales medioambientales, adicionales al déficit de fosfato, son capaces de influenciar una respuesta gatillada a nivel transcripcional, al afectar de forma directa la actividad de un promotor para un gen relacionado con el estatus de fosfato

8. BIBLIOGRAFÍA

Alspeter F, Vasil V, Srivastava V, Stoger E and Vasil IK 1996a. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) plants. Plant Cell Report 16, 12-17.

Alvarez ML, Guelman S, Halford NG, Lustig S, Reggiardo MI, Ryabushkina N, Screwry P, Stein J and Vallejos RH 2000. Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMW subunit. Theor Appl Genet 100, 319-327.

Ames B 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Methods Enzymol 8, 115-118.

Anand A, Trik H, Gill B, Muthukrishnan S 2003. Stable transgene expression and random gene silencing in wheat. Plant Biotechnology Journal 1, 241- 251.

Andrews DL, Cobb BG, Jonhson JR, Drew MC 1993. Hypoxic and anoxic induction of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of seedlings of *Zea mays*: *Adh* transcripts and enzyme activity. Plant Physiol 101, 407-14.

Assem SK, Hassam OS 2008. Real time quantitative PCR analysis of transgenic maize plants produced by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. J Appl Sci Res 4, 408-414.

Aung K, Lin S, Wu C, Huang Y, Su C, Chiou T 2006. *Pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol* 141, 1000-1011.

Bari R, Datt B, Stitt M, Scheible W 2006. PHO2, MicroRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol* 141, 988-999.

Basri Z 2005. Transgene inheritance in transgenic wheat. *Jurnal Matematika dans Sains* 10 (1), 1-9.

Beck EH, Fettig S, Knake C, Hartig K, Bhattarai T 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J Biosci* 32 (3), 501-510.

Borie F and Rubio R 2003. Total and organic phosphorus in Chilean volcanic soils. *Gayana Bot* 60, 69-78.

Bradford M 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brunner AM, Yakovlev IA, and Strauss SH 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology* 4, 14-20.

Busch MA, Bomblies K, Weigel D 1999. Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* 285, 585-587.

Callis J, Frommm M, Walbot V 1987. Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev* 1, 1183-1200.

Casas- Mollano JA, Lao NT, Kavanagh TA 2006. Intron-regulated expression of SUVH3, and *Arabidopsis* Su(var)3-9 homologue. *J Exp Bot* 57, 3301-3311.

Curie C, Liboz T, Montane MH, Rouan D, Axelos M, Lescure B 1992. The activation process of *Arabidopsis thaliana* A1 gene encoding the translation elongation factor EF- α is conserved among Angiosperms. *Plant Mol Biol* 18, 1083-1089.

Chareonpornwattana S, Thara KV, Wang L, Datta SK, Panbangred W and Muthukrishnan S 1999. Inheritance expression and silencing of a chitinase transgene in rice. *Theor Appl Genet* 98, 371-378.

Chen WP, Gu X, Liang GH, Muthukrishnan S, Chen PD, Liu DJ and Gill BS. 1998. Introduction and constitutively expression of and rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the *bar* gene as a selectable marker. *Theor Appl Genet* 97, 1296-1306.

Chiou T, Aung K, Lin S, Wu C, Chiang S, Su C 2006. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 412-421.

Clarkson DT, Scattergood CB 1982. Growth and phosphate transport in barley and tomato plants during the development of, and recovery from phosphate-stress. *J Exp Bot* 33, 865-875.

Coelho G, Carneiro N, Karthikeyan A, Rhaghothama K, Shaffer R, Brandao R, Paiva L, Souza I, Alves V, Imolesi A, Carvalho C, Carneiro A 2010. A Phosphate Transporter Promoter from *Arabidopsis thaliana* *AtPHT1;4* Gene Drives Preferential Gene Expression in Transgenic Maize Roots Under Phosphorus Starvation. *Plant Mol Biol Rep* DOI 10.1007/s11105-010-0199-8.

Dai S, Zheng P, Marmey P, Zhang S, Tian W, Chen SY, Beachy RN, Fau C 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breeding* 7, 25-33.

Davies TGE, Ying J, Xu Q, Li ZS, Li J, Gordon-Weeks R 2002. Expression analysis of putative high-affinity phosphate transporters in Chinese winter wheats. *Plant, Cell and Environment* 25, 1325–1339.

De la Fuente JM, Ramírez-Rodríguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276, 1566–1568.

Demeke T, Hucl P, Baga M, Caswell K, Leung N and Chibbard RN 1999. Transgene Inheritance and silencing in hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 99, 947-953.

Devaiah BN, Karthikeyan AS, Raghothama KG 2007a. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143, 1789-1801.

Devaiah BN, Nagarajan V, Raghothama KG 2007b. Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription *ZaT6*. *Plant Physiol* 145, 147-159.

Devaiah BN, Madhuvanthi R, Karthikeyan AS, Raghothama KG 2009. Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the *MYB62* transcription factor in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 2 (1), 43–58.

Deyholos MK and Sieburth LE 2000. Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the *AGAMOUS* second intron. *Plant Cell* 12, 1799-1810.

Drew MC 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol* 48, 223-250.

Drew MC, Saker LR 1984. Uptake and long-distance transport of phosphate, potassium, and chloride in relation to internal ion concentration in barley: evidence on non allosteric regulation. *Planta* 160, 500-507.

Eastmond PJ, Graham IA 2003. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Current Opinion in Plant Biology* 6, 231–235.

Franco - Zorilla 2004. The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J Exp Bot* 55 (396), 285-293.

Gahoonia TS, Nielsen NF 1998. Direct evidence on participation of root hairs in phosphorus (^{32}P) uptake from soil. *Plant Soil* 198, 147-152.

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* 27, 297-300.

Jain A, Vasconcellos M, Sahi S, Raghotama K 2007. Molecular mechanism of plant adaptation to phosphate deficiency. *Plant Breed Rev* 29, 329-419.

Jefferson R, Kavanagh T, Bevan M 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene-fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6, 3901-3907.

Jeong Y, Mun J, Lee I, Woo JC, Hong CB, Kim S 2006. Distinct roles of the first introns on the expression of Arabidopsis profiling gene family members. *Plant Physiol* 140, 196-209.

Karandashov V, Nagy R, Wegmuller S, Amrhein N, Bucher M. 2004. Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101, 6285-6290.

Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, D'Urzo MP, Damsz B, Raghothama KG 2002. Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters. *Plant Physiol* 130, 221-233.

Karthikeyan AS, Devaiah N, Ballachanda D, Raghothama KG 2009. Promoter deletion analysis elucidates the role of *cis* elements and 5'UTR intron in spatiotemporal regulation of *AtPht1;4* expression in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* 136, 10–18.

Koyama T, Ono T, Shimizu M .2005. Promoter of *Arabidopsis thaliana* phosphate transporter gene drives root- specific expression of transgene in rice. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 38–42.

Krishnaveni S, Jeoung JK, Muthukrishnan S and Liang G 2001. Transgenic sorghum plants constitutively expressing arice chitinase gene show improved resistance to stalk rot. *J Genet Breed* 55, 151-158.

Liu CM, Muchhal US, Uthappa M, Kononowicz AK, Raghothama KG 1998a. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* 116, 91-99.

Liu H, Trieu AT, Blaylock LA, Harrison MJ 1998b. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol Plant-Microbe Interact* 11, 14-22.

Livak KJ, Schmittgen TD 2001. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the 2-method. *METHODS* 25, 402-408.

Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Herrera-Estrella L 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 280–287.

Lyer LM, kumptla SP, Chandresekharan MB and Hall TC 2000. Transgene silencing in monocot. *Plant Mol Biol* 43, 323-346.

Mc Elroy D 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell* 2, 163-171.

Misson J, Raghothama KG, Jain A 2005. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 11934–11939.

Misson J, Thibaud MC, Bechtold N, Raghothama KG, Nussaume L 2004. Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Molecular Biology* 55, 727–741.

Morcuende R, Bari R, Gibon Y, Zheng W, Pant BD, Blasing O, Usadel B, Czechowski T, Udvardi MK, Stitt M, Scheible Wr 2007. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory network of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ* 30, 85-112.

Muchhal US, Pardo JM, Raghothama KG 1996. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 10519–10523.

Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW 2002. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. *The Plant Journal* 31, 341–353.

Mukatira UT, Liu C, Varadarajan DK, Raghothama KG 2001. Negative regulation of phosphate starvation-induced genes. *Plant Physiology* 127, 1854–1862.

Muller E, Lorz H and Lutjike S 1996. Variability of transgene expression in clonal cell lines of wheat. *Plant Sci* 114, 71-82.

Murashige T, Skoog FA 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473-497.

Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L and Evers D 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56, 2907–2914.

Okumura S, Mitsukawa N, Shirano Y, Shibata D 1998. Phosphate transporter gene family of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* 5, 261-269.

Patnaik D and Khurana P 2001. Wheat biotechnology: a mini-review. *Eur J Biotechnology* 4, 1-29.

Peñaloza E, Gutierrez A, Martinez J, Muñoz G, Bravo L Corcuera LJ 2002. Differential gene expression in proteoid root clusters of white lupin (*Lupinus albus*). *Physiologia Plantarum* 116, 28–36.

Peñaloza E, Muñoz G, Salvo-Garrido H, Silva H, Corcuera LJ 2005. Phosphate deficiency regulates phosphoenolpyruvate carboxylase expression in proteoid root clusters of white lupin. *Journal of Experimental Biology* 56, 145–153.

Rae AL, Cybinski DH, Jarney JM, Smith FW 2003. Characterization of two phosphate transporters from barley: evidence for diverse function and kinetic properties among members of the Pht1 family. *Plant Mol Biol* 53, 27-36.

Raghothama KG 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 665-693.

Raghothama KG, Karthikeyan AS 2005. Phosphate acquisition. *Plant Soil* 274, 37-49.

Reisenauer HM 1966. Mineral nutrients in soil solution. In Altman PL, Dittmer DS, eds. *Environmental Biology*. Bethesda MD: Federation of American Societies for Experimental Biology 507-508.

Romer W, Schilling G 1986. Phosphorus requirement of the wheat plant at various stages of its life cycle. *Plant and Soil* 91, 221-229.

Rose AB, Beliakoft JA 2000. Intron-mediated enhancement of gene expression independent of unique intron sequences and splicing. *Plant Physiol* 122, 535-542.

Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development* 15, 2122–2133.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Schunmann PHD, Richardson AE, Smith FW, Delhaize E 2004a. Characterization of promoter expression patterns derive from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany* 55, 855–865.

Schunmann PHD, Richardson AE, Vickers CE, Delhaize E 2004b. Promoter analysis of the barley Pht1;1 phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. *Plant Physiology* 136, 4205–4214.

Shireen K, Assem and Osama S Hassan L 2008. Real Time quantitative PCR Analysis of Transgenic Maize Plants Produced by Agrobacterium-mediated Transformation and Particle Bombardment. *Journal of Applied Sciences Research* (4)4, 408-414.

Shou H, Frame BR, Whittam AS, Wang K 2004. Assesment of transgenic maize events produced by particle bombardment or Agrobacterium-mediated transformation. *Mol breeding* 13, 201-208.

Smith FW, Ealing PM, Dong B, Delhaize E 1997. The cloning of two Arabidopsis genes belonging to a phosphate transporter family. *The Plant Journal* 11, 83-92.

Srivastava V, Vasil V and Vasil IK 1996. Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat (*Triticum Aestivum L.*). *Theor Appl Genet* 92, 1031-1037.

Ticconi C, Abel S 2004. Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends in Plant Science* 9, 548-555.

Tittarelli A, Milla L, Vargas F, Morales A, Neupert C, Meisel L, Salvo- G H, Peñaloza E, Muñoz G, Corcuera L, Silva H 2007. Isolation and comparative análisis of the wheat TaPT2 Promoter: Identification in silico of new putative regulatory motifs conserved between monocots and dicots. *Journal of Experimental Botany* 58 (10), 2573-2682.

Weiler KS and Wakimoto BT 1995. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 29, 577-605.

Xiao K, Liu J, Dewbre G, Harrison M, Wang ZY 2006. Isolation and characterization of root-specific phosphate transporter promoters from *Medicago truncatula*. *Plant Biol* 8, 439-449.

Yi K, Wu Z, Zhou J, Du L, Guo L, Wu Y, Wu P 2005. OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiol* 138, 2087-2096.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14, 415-421.