

UCH-FC
Biot. Mole
T164
c.1



ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

“Construcción y verificación de vectores para sobre expresar VvSDH1, una posible sorbitol deshidrogenasa de *Vitis vinifera* (vid)”

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

Por

YU-WEN TANG HSU

Director de Seminario de Título: Michael Handford, PhD
Co – Directora: Dra. Claudia Stange

Abril 2011
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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

YU-WEN TANG HSU

“Construcción y verificación de vectores para sobre expresar VvSDH1, una posible sorbitol deshidrogenasa de Vitis vinifera (vid)”

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

Dr. Michael Handford
Directora Seminario de Título

Dra. Claudia Stange
Co-Directora

Comisión de Evaluación

Dra. Lorena Norambuena
Presidente

Dr. Francisco Pérez
Evaluador



Santiago de Chile, noviembre de 2011

BIOGRAFÍA



Nací 31 de Diciembre 1983. Si, prematura mas encima, apurada de no perderme las fiestas supongo. O por el susto de los fuegos artificiales en la ciudad de Taipei, no lo se. Creci en esa ciudad hasta los 7 años. En 1990 llegamos a Chile. Para ser preciso a Iquique. Como muchos otros asiáticos llegamos a la ciudad por razones de negocio. Mi papá trabajaba, y aún trabaja, en la zona franca. Pero por supuesto que en esa epoca, yo con mis 7 añitos no entendía nada. Pensaba que estaba de vacaciones en un lugar extraño. Con gente que hablaba un idioma extraño. Algo asi como Alicia en el país de

las maravillas. Eventualmente, cuando me saque mi primer rojo en vocabulario (lógico, estaba recién aprendiendo que “hora” era distinto de “hola” y de “ola”), me di cuenta que no estaba de vacaciones. Pase mis primeras vacaciones de verano aprendiendo castellano. Menos mal que al ser tan pequeña aprendi bastante rápido. Algo que nunca aprendí eso sí fue a poner artículos, por lo que si leen “la enzima” y luego “el enzima” en el mismo parrafo... perdón.

Estudí en el “Colegio Lirima” desde segundo básico a 4to medio. Siempre me gusto mucho la biología. Y como muchos en algún momento pensé en estudiar medicina. Pero posteriormente, después de haber tomado el curso de verano en biotecnología en Baucheff, me di cuenta que podía ser una opción interesante. Debo decir que el Dr. Asenjo tenía razón. Recuerdo muy bien que en una clase de biorreactores ese verano, después de hacerle una pregunta al profe, el profesor me apunto con el dedo en un salón de cómo 500 alumnos... y me dijo: “usted, va ser una futura biotecnologa”. Y tenía razón, aquí estamos hoy...



DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS

Mirando hacia atrás, desde el punto donde estoy parada hoy, efectivamente hay mucho que agradecer y muchos a quienes agradecer. No sólo por el término de la tesis, que creo que ha sido una de las más tramitadas en el laboratorio, sino por lo que representa este día... que es el término de una etapa y comienzo de otra.

Desde el punto de vista profesional, es el comienzo de una vida laboral. Y más allá del conocimiento adquirido en las clases de biología celular, microbiología, fisiología vegetal o fisicoquímica, etc. - de los cuales no queda mucho, como dicen... "materia pasada... materia olvidada" (particularmente de fisicoquímica)-, lo que más atesoro son esos "pedacitos del carácter" y de "como se hacen las cosas" de los profesores que quedan grabados en mi mente. Debo decir que he aprendido mucho de mis profesores. No solo de las cosas que me enseñaron de forma consciente, sino también lo que me han enseñado en forma inconsciente. Como dicen, "uno enseña de la forma en la que le ha sido enseñado". Y mi profe/jefe, me ha enseñado a ser una persona que cree en sus alumnos. Los buenos jefes te dan órdenes claras y te piden los resultados que ellos quieren, los excelentes te dan las herramientas y esperan que tú llegues a los resultados que andan buscando, porque saben que de ese modo se llega a resultados más grandiosos. Profe Mike, gracias por su paciencia, interés y preocupación.. Gracias por haberme permitido explorar otras áreas de interés para mí, a pesar de que eso implicó quizás distender un poco el término de mi tesis. Para mí ese tiempo y espacio significó abrirme nuevos caminos.

El comienzo de una nueva etapa, abrirse nuevos caminos... de alguna forma, hace varios años atrás, cuando empezaba la vida universitaria tuve la misma sensación. La diferencia es que esta vez sigo persiguiendo mis sueños, pero ya menos ingenua y con muchas más herramientas. Cuando salí del colegio pensaba que la universidad me daría todas las respuestas. Lo cierto es que me encontré con más preguntas. Y luego, me encontré con la incertidumbre del "y ¿después de esto que?". Pero también me encontré con un excelente grupo de compañeros y amigos que me decían "Oye tranquila...nos sentimos igual que tu". Han sido y espero que lo sigan siendo, un increíble apoyo. Desde cosas pequeñas como: "no me sale el PCR", a las dramas como: "me quiero cambiar de carrera", siempre han estado allí. A mi "grupito de estudio"-Fran, Gi, Cinthia - gracias por haber dado la pelea hasta el final junto a mí en aquellos ramos "corta cabeza". Los trasnoches de estudio, llenos de humo de cigarro, y esos proyectos con más hoyos que un colador se recuerdan con risas y cariño. Al team MH, son un excelente grupo. A mi "compañerito *vitis*", kokeke por aceptarme con mis monguidades de... "si, solo tenemos como 10 pares de partidores distintos para el mismo gen" y "Mmm... sorry entendí exactamente lo contrario del paper... es que omití el NO hay sorbitol...pensé que era un Si" (aun no me explico como tan loca). A los otros teams, compañeros y profesores, que siempre están dispuestos a ayudar con algún experimento, por la excelente convivencia, y las celebraciones de cumpleaños, cocktail de tesis etc. A la Lore, la Nally y "ella" por su simple y sencilla compañía, porque nos juntamos a hacer nada, pero mucho a la vez. A las LPs et al., gracias por ser un tubo de escape en momentos de estrés, un hombro sobre el cual llorar en momentos de depresión y las alma de

la la fiestas en momentos de celebración. (¿y la junta LP, cuando?). A los amigos de la vida... Dasfne, ñoñas, pero top.

Una nueva etapa = enfrentarse a la incertidumbre. Para mi ha sido un gran tema en los últimos años de pre-grado. Para alguien que solia ser un "control maniac" no es fácil vivir con esa sensación. He mejorado, pero aún me queda por aprender. Y de las dos mejores personas de las cuales puedo aprender son mis propios padres. Si la incertidumbre de que hacer después de la carrera es grande, no me puedo imaginar la incertidumbre que hay que enfrentar al estar en un trabajo nuevo, ir a un país nuevo y donde hablan un idioma nuevo. Al comparar los dos, lo primero es en verdad una pataleta de cabra chica. A pesar de ello, nunca me han hecho sentir así. Siempre hay un consuelo, un "no importa, nosotros te apoyamos". Muchas veces no entienden de lo que hablo, del porque por el momento sólo aspiro al sueldo que aspiro. Aún así, no me presionan y me apoyan. Gracias por eso, y por mil millones de otras cosas.

Ha sido una etapa con muchas lecciones, no solo en la "U", también en la vida. No todas las lecciones son tan ortodoxas y pueden venir de las personas menos esperadas. Personas como los hermanos chicos. Chopo, para mi ha sido (y aun es) una travesía vivir contigo. Contigo me he visto enfrentada a poner en practica (o al menos tratar) cosas que sé, pero no siempre las aplico. Como el hecho que no siempre tengo la razón, que hay más de una forma de hacer las cosas, a confiar y a escuchar, a controlar menos y dar mas espacio. En realidad tu y el Andy han forjado gran parte de mi carácter (muchas veces poniéndolo a prueba). Los papás me han dado la pauta, y ustedes lo han puesto a prueba. A ustedes dos y a los papás dedico con mucho cariño el esfuerzo realizado en ésta tesis. Y flaco, "I hope to be arround" (espero estar...por ahí?...suena raro en castellano) para cuando tu te titules. (y el Andy, pero para eso falta arto)

La verdad de las cosas es que el primer prerrequisito para aprender esas "lecciones de la vida", es ser capaz de mirarse al espejo. Mirarse al espejo, aprender de los errores y no desmoronarse es una de las cosas más difíciles de hacer. Por eso gracias Robert, porque tu lo haces más fácil. Es más, a veces me miro al espejo y no lo entiendo o no veo nada. Tú me lo explicas de una forma que no es hiriente y muy concreta. He aprendido mucho contigo. Me alegra mucho que estes a mi lado, no puedo pensar en un mejor aliado/compañero para enfrentar las nuevas "aventuras" . (Además, junto a ti esta toda tu familia. Tus padres, tu hermana y el Jose, los chikillos. No sólo tengo un aliado... tengo como un batallón, de quienes también estoy muy agradecida) Siempre me haz apoyado, incluso cuando no estabas de acuerdo...gracias por eso y por muchas otras cosas.

Alguna vez un amigo me dijo: a veces, la "meta" por si sólo no es el objetivo... más bien lo que aprendes en el camino. Finalmente puedo decir que he llegado a la "meta" y también he aprendido mucho en el camino...gracias a todos los que caminaron junto a mí.

感謝

回頭過去，有許多值得感謝，並感謝許多人。但今不但結束了論文，也是一個階段的結束和另一個開始。從專業的角度來看，是工作生活的開始。超越所獲得的知識在細胞生物學類，微生物學，植物生理學或物理和化學之，最珍貴的是教師的教導我們有關“人格”和“如何做事”刻在我心中。我必須說，從我的老師，我學到了很多。有人說：“我們教別人的方式，跟老師教過我們的方式一樣。我的老師教我如何做一個要相信自己的學生的人。好的領導者給你明確的指示和要求你他們想要的結果，優秀領導給你工具，並期望你得到結果，因為他們知道，這樣你可以得到偉大的結果。Profe Mike，感謝您的耐心和關注... 感謝您讓我去探索我感興趣的其他領域。

一個新階段的開始，開闢新的天地... 幾年前，當我開始大學生活有同樣的感覺。所不同的是，這一次我不在那麼天真。當我離開學校，我認為大學會給我所有的答案。事實是，我發現更多的問題。後來，我感受到了“在這之後是什麼？”。但我也遇到了很多朋友和同事告訴我：“嘿，不要失望... 我們有同樣的感覺”。他們一直是不可思議的支持。從小東西：“no me sale el PCR”，到“我想改變職業，”你們一直支持我。A mi “grupito de estudio”-Fran, Gi, Cinthia - gracias por haber dado la pelea hasta el final junto a mí en aquellos ramos “corta cabeza”. Los traspasos de estudio, llenos de humo de cigarro, y esos proyectos con más hoyos que un colador se recuerdan con risas y cariño. Al team MH, son un excelente grupo. A mi “compañerito vitis”, kokeke por aceptarme con mis monguidades de... “si, solo tenemos como 10 pares de partidos distintos para el mismo gen” y “Mmm... sorry entendí exactamente lo contrario del paper... es que omití el NO hay sorbitol... pensé que era un SI” (aun no me explico como tan loca). A los otros teams, compañeros y profesores, que siempre están dispuestos a ayudar con algún experimento, por la excelente convivencia, y las celebraciones de cumpleaños, cocktail de tesis etc. A la Lore, la Nally y “ella” por su simple y sencilla compañía, porque nos juntamos a hacer nada, pero mucho a la vez. A las LPs et al., gracias por ser un tubo de escape en momentos de estrés, un hombro sobre el cual llorar en momentos de depresión y las alma de la fiestas en momentos de celebración. (¿y la junta LP, cuando?). A los amigos de la vida... Dasfne, ñoñas, pero top.

一個新的階段=面對未知的未來。最近幾年，對我來說這是一個大問題。兩個最好的榜樣，我可以學習的地方是我的父母。如果我覺得大學畢業後混亂不知道該怎麼辦，我無法想像面對新工作，去一個新的國家，說一種新的語言，的不確定性。比較兩種情況，我覺得自己像一個小孩。但是，你們從來沒有讓我哪麼覺得。你們一直安慰我，你們總是說：“沒關係，我們會支持你。”很很多時候，你不明白我的意。為什麼暫時我只能渴望 那麼低的收入。不過，你們沒有給我壓力。一直支持我。謝謝。

這是一個有許多教訓的階段，不單在大學，在生活中也有許多教訓。並非所有的教訓是如此正統，一些教訓是誰都沒想到人教你的...比如弟弟. Chopo, 對我來住在一起不容易。有了你，我知道我並不總是正確的，即做事情不止一種方法，信任和傾聽，控制少，給更多的空間。事實是，你和 Andy 偽造我的性格的一部分。父母給我指導方針，你們測試它。A ustedes dos y a los papás dedico con mucho cariño el esfuerzo realizado en ésta tesis. Y flaco, “I hope to be arround” (espero estar...por ahí?...suena raro en castellano) para cuando tu te titules. (y el Andy, pero para eso falta arto)

要了解“生命教訓”，是要能照鏡子。照照鏡子，從錯誤中學習是最難做的事情之一。所以，謝謝 Robert 因為你讓這一切更容易。有時我照鏡子，不理解或看不到任何東西。你好心的解釋給我。我跟你學到了很多東西。我很高興你在我的一邊，我不能想到一個最好的朋友/夥伴面對新的“冒險”。(此外，你這整個家庭。你的父母，你的姐姐和姐夫，堂兄弟。我不但有一個合作夥伴... 我也很感謝他們) 你總是支持我，即使你不同意... gracias por eso y por muchas otras cosas.

一旦一個朋友告訴我有時。“目標”本身並不是目的...，而是你所前進的道路上了解到。最後，我可以說我已經達到了“目標”和在路上我學到了很多東西.....gracias a todos los que caminaron junto a mí.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Alcoholes de azúcar (Poliolos) en plantas.....	1
1.2. Sorbitol y su función en las plantas.....	2
1.3 Sorbitol deshidrogenasa.....	5
1.4 Sorbitol en especies no Rosaceae.....	6
1.5. <i>Vitis vinifera</i> (uva) como modelo de estudio.....	7
1.6 Estrategia desarrollada.....	7
2. OBJETIVOS.....	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Material Biológico.....	10
3.1.1 Crecimiento de bacterias <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
3.1.2 Crecimiento hidropónico de <i>Nicotiana tabacum</i>	11
3.1.3 DNA y RNA de vid.....	11
3.1.4 Preparación de células quimiocompetentes <i>E. coli</i> DB3.1.....	11
3.1.5 Preparación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> DH5 α	12
3.1.6 Preparación de células quimiocompetentes <i>A. tumefaciens</i> GV3101.....	12
3.2. Diseño y verificación <i>in silico</i> de partidores.....	13

3.3 Obtención de cDNAs.....	14
3.3.1 Tratamiento con DNAsa.....	14
3.3.2 Reacción de transcripción reversa (RT).....	15
3.4. Amplificación de <i>VvSDHI</i>	15
3.4.1 Amplificación de <i>VvSDHI</i> desde 5'UTR hasta 3'UTR a partir de cDNA total por PCR.....	15
3.4.2 Amplificación de <i>VvSDHI</i> desde codón de inicio hasta codón de término de transcripción, a partir de pCR8- <i>VvSDHI</i>	16
3.4.3 Amplificación de un fragmento interno de <i>VvSDHI</i> a partir de cDNA total por PCR.....	16
3.4.4 Geles de electroforesis de DNA	17
3.5. Clonación de <i>VvSDHI</i> en el vector pCR8.....	17
3.5.1 Purificación del fragmento <i>VvSDHI</i> desde geles de agarosa.....	17
3.5.2 Clonamiento de <i>VvSDHI</i> en el vector de entrada pCR8®.....	17
3.5.3 Transformación de <i>E. coli</i> DH5α competentes con pCR®8- <i>VvSDHI</i>	18
3.5.4 PCR de colonia, extracción y purificación de DNA plasmidial para la verificación de colonias bacterianas transformantes.....	19
3.5.5 Digestión enzimática de pCR8- <i>VvSDHI</i>	20
3.6 Clonamiento de <i>VvSDHI</i> en los vectores de destinación.....	20
3.6.1 Clonamiento de <i>VvSDHI</i> en los vectores pMDC44 y pGWB2.....	20
3.6.2 Extracción y purificación de DNA plasmidial para la verificación de colonias bacterianas transformantes.....	22
3.6.3 Determinación de la presencia y orientación de <i>VvSDHI</i> en pMDC44- <i>VvSDHI</i> y pGWB2- <i>VvSDHI</i> mediante PCR.....	23

3.6.4 Determinación de la presencia y orientación de <i>VvSDH1</i> en pMDC44- <i>VvSDH1</i> y pGWB2 mediante digestión enzimática.....	24
3.7 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con pMDC44- <i>VvSDH1</i> y pGWB2- <i>VvSDH1</i>	24
3.7.1 Verificación de la transformación de <i>A. tumefaciens</i> con pMDC44- <i>VvSDH1</i> y pGWB2- <i>VvSDH1</i> mediante PCR.....	25
3.8 Análisis funcional de pMDC44- <i>VvSDH1</i> y pGWB2- <i>VvSDH1</i>	26
3.8.1 Transformación transitoria de hojas de <i>N. tabacum</i> con <i>A. tumefaciens</i> portando pMDC44- <i>VvSDH1</i> y/o pGWB2- <i>VvSDH1</i>	26
3.8.2 Extracción de RNA total de hojas de tabacos transformados y análisis de expresión mediante RT-PCR.....	26
3.8.3 Localización subcelular de GFP- <i>VvSDH1</i> por microscopia de fluorescencia.....	27
3.9 Estudio <i>in-silico</i> de la posible función de <i>VvSDH1</i>	28
3.9.1 Dendograma de SDH conocidas y <i>VvSDH</i> candidata.....	28
3.9.2 Análisis <i>in-silico</i> de la posible función de <i>VvsDH1</i>	28
4. RESULTADOS	
4.1 Identificación y análisis de <i>VvSDH1</i>	29
4.1.1 Identificación y selección de una posible SDH de uva.....	29
4.2 Análisis bioinformático de la secuencia proteica de <i>VvSDH1</i>	32
4.3 Clonamiento de <i>VvSDH1</i> en el vector de entrada pCR8.....	33
4.4 Clonamiento de <i>VvSDH1</i> en el vector de sobreexpresión pGWB2 y transformación de <i>A. tumefaciens</i>	40
4.4.1 Transformación transitoria de hojas de tabaco con vector pGWB2- <i>VvSDH1</i> y análisis de expresión de <i>VvSDH1</i>	43
4.5 Análisis de la localización subcelular de <i>VvSDH1</i>	45

4.5.1 Estudio bioinformático.....	45
4.5.2 Construcción del vector de pMDC44- <i>VvSDH1</i>	47
4.5.3 Transformación transitoria de hojas de tabaco y análisis por microscopia de fluorescencia.....	50
4.6 Estudio in silico de la posible función de <i>VvSDH1</i> utilizando datos de microarreglos.....	52
5. DISCUSIÓN.....	58
6. PROYECCIONES Y CONCLUSIONES.....	68
7. ANEXO.....	70
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Partidores utilizados en este seminario de título.....	13
Tabla II: Tabla resumen de la similitud entre cuatro posibles SDH en vid.....	29
Tabla III: Porcentaje de identidad amino acídica entre sorbitol deshidrogenasas vegetales conocidas y putativas, alcohol deshidrogenasa y las SDH candidatas en vid.....	32
Tabla IV: Resumen de la ubicación subcelular de VvSDH1 predicho por diversas herramientas en línea.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sorbitol	2
Figura 2: Ruta metabólica de biosíntesis y degradación de sorbitol.....	4
Figura 3: Esquema del T-DNA de pGWB2.....	21
Figura 4: Esquema del T-DNA de pMDC44.....	21
Figura 5: Dendograma del alineamiento aminoacídico entre SDH vegetales conocidas y putativas, alcoholes deshidrogenasas y los candidatos de SDH en vid.....	31
Figura 6: Alineamiento mostrando sitios conservados en SDHs vegetales.....	33
Figura 7: Amplificación de <i>VvSDHI</i> a partir de cDNA total	34
Figura 8: Secuencias de clones pCR8- <i>VvSDHI</i>	35
Figura 9: Geles de agarosa mostrando resultado de digestión con XbaI de clones pCR8- <i>VvSDHI</i> : segunda clonación.....	37
Figura 10: Esquema de los sitios de corte de la enzima de restricción XbaI en pCR8- <i>VvSDHI</i>	38
Figura 11: Secuencias de clones pCR8- <i>VvSDHI</i>	39
Figura 12: Gel de agarosa mostrando resultado de la amplificación de 35S- <i>VvSDHI</i> mediante PCR.....	41
Figura 13: Esquema de los sitios de corte de la enzima XbaI en el vector pGWB2- <i>VvSDHI</i>	42
Figura 14: Gel de agarosa mostrando resultado de digestión con XbaI de clones de pGWB2- <i>VvSDHI</i>	42
Figura 15: Gel de agarosa mostrando resultado de PCR 18S.....	44
Figura 16: Gel de agarosa mostrando resultado de PCR de un fragmento interno de <i>VvSDHI</i> de 758 pb.....	45

Figura 17: Gel de agarosa mostrando resultado de PCR para amplificar GFP- <i>VvSDHI</i> de pMDC44- <i>VvSDHI</i>	48
Figura 18: Esquema de los fragmentos esperados en la digestión con XbaI de clones de pMDC44- <i>VvSDHI</i>	49
Figura19: Gel de agarosa mostrando resultado de digestión con XbaI de clones pMDC44- <i>VvSDHI</i>	49
Figura20: Hoja de tabaco transformada con vector pCambia-AtSDLprom.....	51
Figura 21: Hoja de tabaco transformada con pCambia1302.....	52
Figura 22: Hoja de tabaco transformada con vector pMDC44- <i>VvSDHI</i>	52
Figura 23: Expresión de <i>VvSDHI</i> en VV1 y VV2.....	55
Figura 24: Expresión de <i>VvSDHI</i> en VV3.....	56
Figura 25: Expresión de <i>VvSDHI</i> en VV5.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3' UTR:** del inglés “untranslated region”, región 3' no-traducida
5' UTR: del inglés “untranslated region”, región 3' no-traducida
ADH: Alcohol deshidrogenasa
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.
CaMV35S: Promotor 35S del Virus de Mosaico de Coliflor
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario
dNTPs: Deoxi- nucleótidos-trifosfato: dATP, dTTP, dGTP, dCTP.
DEPC: Dietil Pirocarbonato, compuesto que inactiva RNAsa por modificación covalente en residuos de histidina
DO: Densidad óptica
EST: “expressed sequence tag” o marcador de secuencia expresada
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization).
GFP: proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)
hSDH: SDH humana
kb: Kilobases (1000pb)
LB: Medio Luria Bertani
L-idonatoDH: L-idonato deshidrogenasa
RNA: Ácido ribonucleico ribosonal.
ORF: “open reading frame” o marco abierto de lectura
pb: Pares de bases
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
Np: nanopura
SDH: sorbitol deshidrogenasa-NAD dependiente
S6PDH: sorbitol 6-fosfato-deshidrogenasa-NAD dependiente
T_m: temperatura de apareamiento del ADN, temperatura a la cual dos hebras complementarias en solución se separan completamente.
U: unidad enzimática
UV: Luz ultra-violeta.

RESUMEN

Sorbitol es el principal producto fotosintético y la forma de carbono translocada vía el floema en especies pertenecientes a la familia Rosaceae como duraznos (*Prunus persica*), peras (*Pyrus spp*) y manzanas (*Malus x domestica*). Una vez en el órgano sumidero, una porción del alcohol de azúcar es oxidada a fructosa mediante una sorbitol deshidrogenasa dependiente de NAD (SDH). Pese a lo anterior, también se han encontrado SDH en especies no-Rosaceae, como tomate (*Solanum lycopersicum*), soya (*Glycine max*) y maíz (*Zea mays*), en los cuales la principal fuente de carbono translocada a través del floema es la sacarosa.

La presencia de sorbitol en especies no-Rosaceae ha sido relacionada a condiciones de estrés, tales como estrés hídrico, o de alta y/o baja temperatura. Como una primera aproximación para determinar el papel fisiológico de sorbitol y SDH en estas especies, en este seminario de título, se identificó una posible SDH de uva (*Vitis vinifera*) usando la genética reversa, la cual hemos denominado *VvSDH1*. *VvSDH1* posee todas las características moleculares y los dominios conservados presentes en SDHs de otras especies y se expresa en distintos tejidos de la planta, como fue demostrado mediante RT-PCR.

Como parte de la estrategia diseñada para determinar la actividad enzimática de esta proteína, el cDNA de *VvSDH1* fue clonado en un vector binario (pGWB2) comandado por el promotor 35S del virus del mosaico de coliflor. Se transformaron transitoriamente hojas de tabaco usando *Agrobacterium tumefaciens* portando este vector. El RNA extraído de estas muestras fue utilizado en reacciones de RT-PCR, determinando la eficiente expresión de *VvSDH1* y por ende la funcionalidad del vector.

Adicionalmente, con el fin de determinar la localización subcelular de *VvSDH1*, el cDNA de *VvSDH1* fue clonado en un vector binario (pMDC44) que permite la fusión N terminal de GFP a la posible SDH. Una vez más, se transformaron hojas de tabaco transitoriamente mediante *A.*

tumefaciens, y las muestras fueron observadas bajo microscopio de epifluorescencia. Los resultados mostraron que GFP-VvSDH1 está ubicada en el citoplasma, consistente con las predicciones bioinformáticas y su posible papel en la oxidación de sorbitol.

Finalmente, estudios bioinformáticos utilizando la base de datos de microarreglos Plexdb fueron realizados, como una primera aproximación hacia el descubrimiento de la posible función fisiológica de VvSDH1. Los resultados mostraron que la expresión de *VvSDH1* aumenta en órganos fotosintéticos bajo estrés hídrico, mientras que en órganos sumideros, la expresión permanece relativamente estable. La expresión de *VvSDH1* también aumenta a través del desarrollo de bayas en una manera similar al aumento del diámetro de las bayas. En su conjunto, estos resultados sugieren que VvSDH1 pudiese cumplir un papel importante en la acumulación de fructosa durante el desarrollo de la baya.

ABSTRACT

Sorbitol is the main product of photosynthesis and the form in which carbon is translocated via the phloem in species belonging to the Rosaceae family, which includes peaches (*Prunus persica*), pears (*Pyrus* spp) and apples (*Malus x domestica*). Once in the carbon sink organ, a proportion of this sugar alcohol is oxidised to fructose via NAD-dependent sorbitol dehydrogenase (SDH). Nevertheless, SDH has also been found in non-Rosaceae species, such as tomato (*Solanum lycopersicum*), soya (*Glycine max*) and maize (*Zea mays*), in which the main phloem-translocated carbon is sucrose.

Sorbitol presence in non-Rosaceae species has been linked to stress conditions, such as drought or stress due to high or low temperatures. As a first approach to determine the physiological role of sorbitol and SDH in these species, in this thesis, a putative SDH from grapevine (*Vitis vinifera*) was identified using a reverse genetics approach, which we have named VvSDH1. VvSDH1 possesses all the molecular characteristics and the conserved domains present in the SDHs of other species, and is expressed in various organs of the plant, as determined by RT-PCR.

As part of the strategy designed to determine the enzymatic activity of the protein, *VvSDH1* cDNA was cloned into a plant binary vector (pGWB2) under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Tobacco leaves were transiently-transformed using *Agrobacterium tumefaciens* harbouring this construct. RNA extracted from these samples was used in RT-PCR reactions, determining the efficient expression of *VvSDH1* and thus the functionality of the construct.

Additionally, in order to study the subcellular localisation of VvSDH1, *VvSDH1* cDNA was cloned into a plant binary vector (pMDC44) for the fusion of GFP at the N-terminus of the putative SDH. Once again, tobacco leaves were transiently-transformed using *A. tumefaciens*

and the samples were observed under an epifluorescence microscope. The results showed that GFP-VvSDH1 is located in the cytoplasm, consistent with predictions made by bioinformatic analyses and with its possible role in oxidising sorbitol.

Finally, bioinformatic studies using the microarray database Plexdb were performed, as a first approach towards discovering the possible physiological function of VvSDH1. The results demonstrated that *VvSDH1* expression in photosynthetic organs increases under drought conditions, while it remains relatively unchanged in sink organs. *VvSDH1* expression also increases throughout berry development as berry diameter increases. Taken together, these results suggest that VvSDH1 might play an important role in the accumulation of fructose during berry development.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Alcoholes de azúcar (polioles) en plantas

Los alcoholes de azúcar, también denominados polialcoholes o polioles, son la forma reducida de las aldosas y las cetosas. El grupo carbonilo de estos monosacáridos, aldehído y cetona respectivamente, ha sido reducido a un grupo hidroxilo dando lugar a un alcohol de azúcar. La cadena de carbono de éstos puede ser lineal, dando lugar a los alditoles o polioles alifáticos, o cíclicos conocidos como inositoles o ciclitoles. Además, los alditoles son clasificados de acuerdo al número de carbonos en su cadena, de tal manera que un alditol de seis carbonos se denomina hexitol. Dentro de los hexitoles más comunes en plantas superiores se encuentra el sorbitol (o glucitol), la forma reducida de la glucosa, manitol de la manosa y galactitol de la galactosa (Noiraud et al 2001).

Se han identificado 17 distintos alditoles en plantas superiores, de los cuales existen a lo menos 13 alditoles diferentes en angiospermas incluyendo sorbitol, manitol y galactitol (Lewis, 1984). Mientras que el manitol se encuentra ampliamente distribuido, presente en más de 100 especies de plantas (Lewis, 1984), el sorbitol es comúnmente encontrado en especies pertenecientes a la familia Rosaceae (manzana, pera, durazno, ciruela, entre otros) y Plantaginaceae (por ejemplo, llantén).

Numerosas funciones han sido atribuidas y/o asociadas a los polioles. En primer lugar, tanto manitol como sorbitol son productos fotosintéticos primarios (manitol en Apiceae, Oleaceae y Rubiceae [Pommerrenig et al 2007] y sorbitol en Rosaceae y Plantaginaceae) y son uno de las principales formas de fuentes de carbono que estas especies transportan a través del floema. Además, los polioles son osmolitos de gran importancia en situaciones de estrés abióticos tales como, estrés osmótico (Shen et al 1999), de temperaturas extremas (altas o bajas, Yancey, 1982; Carpenter, 1993) y salino o hídrico (Pommerrenig et al 2007). Esto se debe a que los grupos hidroxilos de estos alcoholes de azúcar podrían reemplazar al agua, en caso de escasez de ésta, en la formación de puentes de hidrogeno, estabilizando y protegiendo las membranas y las proteínas (Noiraud et al

2001). Además, pueden ser acumulados en altas concentraciones dentro de una célula vegetal para compensar un potencial hídrico disminuido (Popp et al 1995). Por otra parte, se ha planteado que se logra la estabilización de las proteínas y la protección contra su denaturación ya que las interacciones hidrófobas entre proteínas son más fuertes en solventes con polioles (como glicerol) que en agua. En parte, esto se produce debido a las fuerzas repulsivas que se generan entre los polioles y las regiones no-polares en la superficie de la proteína (Taravati et al 2007). Sin embargo, el mecanismo exacto de su acción aun no ha sido determinado.

1.2 Sorbitol y sus funciones en las plantas

Sorbitol o D-glucitol es un alditol de fórmula empírica $C_6H_{14}O_6$. Este alcohol de azúcar deriva de la reducción ya sea de D-glucosa o L-gulosa (Fig. 1) (Staněk 1963).

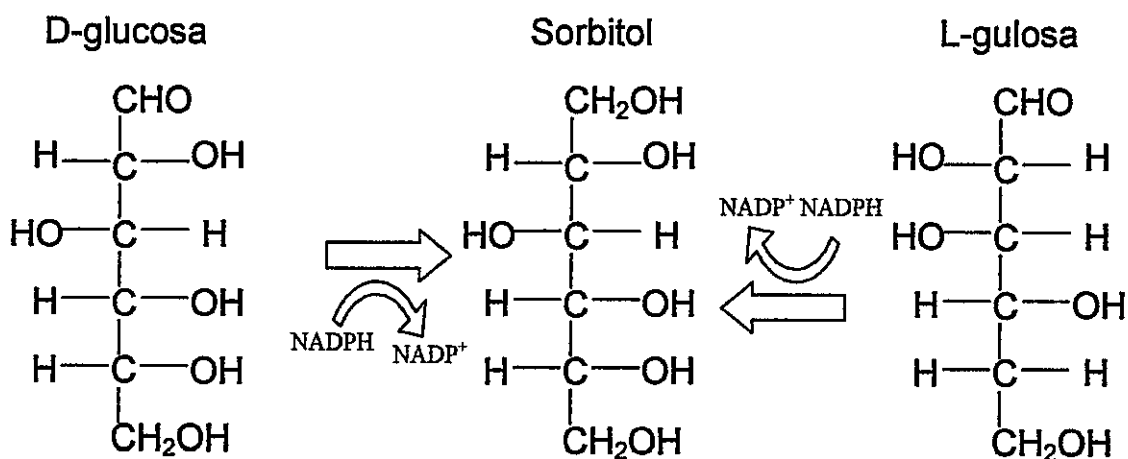


Fig 1: Sorbitol (o D-glucitol) es derivado de la reducción de D-glucosa o L-gulosa

Sorbitol es uno de los productos fotosintéticos más importantes y la forma principal de transporte de carbono a través del floema en plantas de importancia económica pertenecientes a la familia Rosaceae (Webb, et al 1962), en particular de la subfamilia Pomoidae (Ej. Manzana [*Malus x domestica*] y pera [*Pyrus communis*]) y Prunoidae (Ej. almendra [*Prunus dulcis*], cereza [*P. cerasus*], durazno [*P. persica*] y ciruela [*P. domestica*]) (Gao et al 2003). Vale decir, mientras que para la mayoría de las plantas la principal forma de carbono transportado a través del floema es la sacarosa,

para especies de la familia Rosaceae es el sorbitol, tanto así que en durazno, representa el 60-90% del carbono transportado, con una concentración de ~560 mM en la savia (Moing et al 1997).

En especies Rosaceae, el sorbitol deriva del mismo reservorio de hexosa fosfato que la sacarosa y se ha demostrado que las vías de biosíntesis de sorbitol y sacarosa, si bien son independientes entre si (no comparten enzimas en sus vías de biosíntesis), un intermediario en la formación de sorbitol, sorbitol-6-fosfato inhibe la sacarosa-fosfato-sintasa, una enzima clave en la síntesis de la sacarosa (Zhou et al 2002). El sorbitol formado en las hojas de la planta es translocado a través del floema hacia los órganos sumideros, por ejemplo, las hojas inmaduras, los frutos y las raíces. Una vez en el fruto, la enzima sorbitol-deshidrogenasa (SDH) convierte el sorbitol a fructosa (Hansen 1970; Newcomb et al 2006).

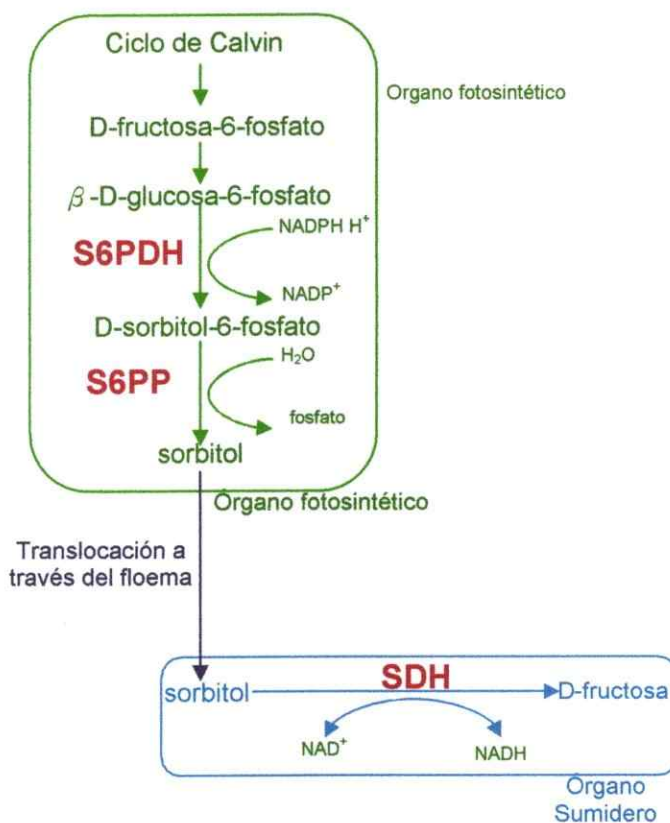


Fig 2 Ruta metabólica de la biosíntesis y metabolismo de sorbitol.

Además de ser el principal medio de translocación de carbono en esta familia, sorbitol es capaz de movilizar boro a través de la planta. El boro es un micronutriente esencial para el crecimiento de las plantas. Síntomas recurrentes causados por la deficiencia de boro son: un centro color café en raíces de almacenamiento (ej: rábanos), tallos ahuecados (ej: coliflor, brócoli) y una disminución en el número de semillas (Brown et al 1997). En especies donde la movilidad de boro se encuentra restringida, el boro es acumulado en las hojas maduras, desde donde es redistribuida a otras partes de la planta de forma lenta (Brown et al. 1997). Debido a la lenta redistribución, en condiciones de altas concentraciones de boro, las hojas maduras pueden sufrir toxicidad por el exceso de boro acumulado en ellas, siendo los síntomas más comunes la “quemadura” en el margen y/o punta de la hoja y/o la caída de ésta (Brown et al 1997). Por el contrario, en plantas que sintetizan alcoholes de azúcar, como el sorbitol, el boro es movilizado a través de la planta con facilidad (Brown et al 1996).

Esto se debe a que un dímero de sorbitol coordina el boro, facilitando su movilización y protegiendo la planta frente a los efectos que el exceso y/o deficiencia de este elemento pudiera producir. Este importante rol del sorbitol fue demostrado en plantas de tabaco, que normalmente no acumulan sorbitol, transformadas con la enzima sorbitol-6-fosfato-deshidrogenasa-NAD dependiente (S6PDH) de manzana. Debido a la acumulación de sorbitol, se aumentó la movilidad de boro en los tabacos transformados, y éstos fueron más tolerantes a la deficiencia de boro que sus contrapartes sin transformar (Brown et al 1999).

Por otra parte, el sorbitol cumple una función como osmoregulador frente a estrés hídrico y de temperatura. Se ha documentado un aumento de sorbitol en la savia en los frutos de durazno bajo estrés hídrico, ya sea por un aumento en la síntesis de éste (Escobar-Gutiérrez et al 1998) o por una disminución de la conversión de sorbitol a fructosa en los órganos sumideros (Lo Bianco et al 2000). También, se ha observado un aumento de sorbitol en la savia del manzano cuando éste fue sometido a temperaturas bajo cero durante la temporada de dormancia (Sakai 1961; Williams et al 1974).

1.3 Sorbitol deshidrogenasa (SDH)

La enzima sorbitol deshidrogenase (SDH, también conocida como L-idoitol 2-deshidrogenasa, EC 1.1.1.14) es una enzima dependiente de zinc que utiliza, de forma exclusiva, NAD^+ como co-factor. Actúa oxidando el carbono 5 del sorbitol, transformando un grupo alcohol a una cetona, dando como resultado una cetosa lineal, específicamente la fructosa. La fructosa, por su parte, puede entrar a la glicólisis o ser almacenado en la vacuola.

La SDH pertenece a la familia de las proteínas deshidrogenasa/reductasa de cadena mediana. Posee un parentesco lejano con las alcoholes deshidrogenasas (ADH), teniendo un 20% de identidad aminoacídica con éstas (Johansson et al 2001). Este parentesco explicaría la presencia en la SDH del sitio conservado para las ADHs de unión a Zinc (ADH_ZINC, PS00059), cuyo patrón es: G-H-E-x-{EL}-G-{AP}-x(4)-[GA]-x(2)-[IVSAC], en donde H (histidina) es el ligando a Zinc.

En cuanto a la ubicación subcelular de esta enzima, mediante análisis inmunohistoquímico en manzana, se ha detectado SDH tanto en pulpa como en tejido vascular del fruto, y en tejido vascular y mesófilo de hojas jóvenes y senescentes, indicando una distribución ubicua tanto en órganos fotosintéticos como en órganos sumideros. Además, los mismos investigadores estudiaron la ubicación subcelular de SDH de manzana detectando presencia de SDH en cloroplastos y citoplasma tanto en frutos como en hojas (Wang et al 2009).

1.4 Sorbitol en especies no-Rosaceae

En el caso de la mayoría de las especies no-Rosaceae, el carbono es translocado a través del floema principalmente en la forma de sacarosa (Biddulph, 1969). Sin embargo, se ha detectado la actividad de SDH y/o aislado genes *SDH* en especies que transportan carbono en forma de sacarosa, tales como en *Solanum lycopersicum* (tomate, Ohta et al 2005), *Glycine max* (soja, Kuo et al 1990) y *Zea mays* (maíz, Doehlert 1987). Además, mediante la información de bases de dato en línea se puede comprobar mediante alineamiento de EST que existen secuencias en distintas especies no-Rosaceae que presentan alta homología con la SDH de especies Rosaceae como la manzana (Anexo 1). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la función fisiológica que podrían tener las proteínas codificadas en los genes de estas especies.

Se ha sugerido que sorbitol podría tener una función osmoreguladora en las especies no-Rosaceae bajo estrés salino (Tari et al 2010), una función también cumplida en las Rosaceae como manzana (Šircelj et al. 2007). En el trabajo de Tari et al (2010), los investigadores observaron un aumento significativo en el contenido de sorbitol en hojas de tomate en condiciones de estrés salino (100 mM de NaCl por 7 días), mientras que en raíces, un órgano sumidero, este aumento no fue observado.

1.5 *Vitis vinifera* (uva) como modelo de estudio

Durante el desarrollo de la tesis de magister del alumno Patricio Mandujano (Mandujano, 2010), titulado "Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDL una probable sorbitol deshidrogenasa", se identificó una secuencia protéica de vid (*Vitis vinifera*) con alto grado de identidad con SDH conocidas. Por otra parte, la presencia de sorbitol ha sido detectada tanto en frutos maduros sanos (Flanzy 2003) como en la savia (Kalliopi et al 1979) de vides (*Vitis vinifera*, familia Vitaceae), a pesar de que esta especie transporta sacarosa como fuente de carbono. Además, se ha demostrado una gran abundancia de un posible transportador de sorbitol en etapas tempranas del desarrollo del fruto, que podría estar involucrado en la descarga de sorbitol desde el floema hacia las células de órganos sumideros (Deluc et al 2007). Todo lo anterior sugiere la presencia del metabolismo de sorbitol en esta especie.

De esta manera, *Vitis vinifera* resulta ser un especie interesante sobre la cual realizar estudios del metabolismo de sorbitol en especies no-Roseaceae. Además, el French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization (2007), secuenció y hizo público la secuencia del genoma de la vid (*Vitis vinifera*) de la variedad Pinot noir, facilitando estudios moleculares en esta especie.

1.6 Estrategia desarrollada

Los genes *SDH* son estudiados en nuestro laboratorio con la finalidad de investigar sobre el papel fisiológico de sorbitol, particularmente en especies no-Rosaceae. Este objetivo se ve reflejado en el trabajo de magister de Patricio Mandujano, donde se realizaron estudios sobre una posible SDH en *Arabidopsis thaliana* (AtSDL, NP_200010). Como se mencionó anteriormente, la inquietud por estudiar el metabolismo de sorbitol en uva nace a partir de su trabajo, y si bien en aquel tesis se identificó una secuencia de una posible SDH en uva, en este seminario de título se profundizó la búsqueda. Para identificar supuestas SDHs en *Vitis vinifera*, se realizaron BLAST utilizando las secuencias de las SDHs caracterizadas de manzana (MdSDH3, AAL37295, Nosarszewski et al.

2004), tomate (LeSDH, BAE47038, Ohta et al. 2005) y la secuencia de AtSDL (Mandujano, 2010).

De esa manera, se identificaron varios candidatos en vides (ver la primera sección de Resultados).

Dado la presencia de sorbitol en vides en bajas concentraciones (sección 1.4), y como primera aproximación para determinar las funciones de este alcohol de azúcar, y de las SDHs en vid, se inició el estudio de uno de los candidatos identificados. Para ello, se utilizaron recursos y algoritmos disponibles en la web para analizar las secuencias candidatas y escoger una para experimentos futuros. Específicamente, se aisló el cDNA de una SDH supuesta de vid, la cual fue nombrada *VvSDH1*, y se construyeron dos vectores binarios. El primero, en el vector binario pGWB2, tiene como objetivo la sobre expresión de *VvSDH1*, para posteriores estudios bioquímicos para determinar su especificidad de sustrato, así permitiendo comprobar si la proteína codificada efectivamente tiene actividad SDH. El segundo vector, pMDC44, permite crear una proteína fusión con GFP en el extremo N-terminal de la proteína. Con ambos vectores, se realizó una transformación transitoria de *Nicotiana tabacum* (tabaco) utilizando *Agrobacterium tumefaciens* para determinar la funcionalidad transcripcional de ellos, y con pMDC44-VvSDH, se determinó la localización subcelular de la proteína de fusión vía microscopía de fluorescencia. Además, en forma paralela, se realizó un estudio *in-silico*, analizando datos de la base de datos Pledb (www.plexdb.org) para evaluar la posible función de VvSDH1.

2 OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar, seleccionar y clonar en vectores binarios una posible SDH de vid (VvSDH1). Verificar a nivel molecular mediante la expresión transitoria en planta la funcionalidad de los vectores binarios contruidos, y evaluar *in-silico* la posible función fisiológica de VvSDH1 en *Vitis vinifera*.

Objetivos específicos

- Identificar secuencias candidatas para SDH de vid
- Clonar el cDNA de *VvSDH1*, una Sorbitol Deshidrogenasa putativa de uva (*Vitis vinifera*)
- Construir vectores binarios para sobre-expresar VvSDH1 y analizar su funcionalidad transcripcional mediante la expresión transitoria en hojas de tabaco, *Nicotiana tabacum*.
- Construir una proteína fusión GFP-VvSDH1 para estudiar la ubicación subcelular de VvSDH1
- Analizar y evaluar *in silico* la posible función fisiológica de VvSDH1 en *Vitis vinifera*

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Biológico

3.1.1 Crecimiento de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

Se crecieron bacterias *E. coli* cepa DH5 α , DB3.1 y One Shot[®] en medio LB líquido [NaCl 1% (p/v), Triptona 1% (p/v), Extracto de Levadura 0,5% (p/v), pH 7 a 25 °C] con agitación de 200 rpm o en placas con LB sólido [LB líquido más agar 1,6% (p/v)] en ambos casos por 16-18 hrs a 37 °C. Además en algunos casos se suplementó el LB con antibióticos para la selección de bacterias transformadas; espectomicina 100 μ g/mL, para las transformadas con el vector pCR8 y kanamicina 100 μ g/mL para las transformadas con los vectores pGWB2 o pMDC44.

La cepa GV3101 de *A. tumefaciens* fue crecida en medio LB líquido con agitación de 200 rpm o LB sólido por 36-48 hrs a 28 °C. La cepa GV3101 de *A. tumefaciens* posee la capacidad de infectar y transformar plantas gracias a que posee el plasmidio Ti ("Tumour inducing plasmid") modificado parte de lo cual se transfiere a la célula huésped (T-DNA). El plasmidio Ti modificado mantiene todo los genes de virulencia (*vir*) necesarios para la transferencia del T-DNA, actuando en trans. Vale decir, la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* es capaz de transferir T-DNA presente en otro plasmidio (gracias al plasmidio Ti modificado), razón por la cual es utilizado en sistemas binarios de transformación. El otro componente del sistema binario de transformación consiste en un vector binario (vector utilizado en el sistema binario), que permite clonar el gen de interés flanqueado por los bordes del T-DNA (LB y RB), como por ejemplos los vectores binarios utilizados en este seminario de título: pMDC44 y pGWB2. De esta manera *A. tumefaciens* cepa GV3101 transformadas con alguno de los vectores binarios permitirá transformar plantas, transfiriendo el gen de interés en las células huésped.

Es por lo anteriormente explicado, que para asegurar el correcto funcionamiento del sistema binario, el medio LB en que fueron crecidas las bacterias se suplementó con los antibióticos rifampicina (10 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL), para la selección de la cepa GV3101, del plasmidio Ti y del vector binario pMDC44 o pGWB2, respectivamente.

3.1.2 Crecimiento hidropónico de *Nicotiana tabacum*

Se crecieron plantas de tabaco, *Nicotiana tabacum*, silvestre (wild type, wt) en cultivo hidropónico (Gibeaut, 1997) a 23 °C, con 16 hrs de fotoperíodo con 2400 lux. Plantas de 6-8 semanas fueron utilizadas en los experimentos de agro-infiltración (sección 3.7).

3.1.3 Fuente de obtención de DNA y RNA de vid

Debido a que en el momento del inicio de este seminario de título, la temporada de uva estaba en su término, el DNA genómico de vid y las muestras de RNA (ambos de Cabernet Sauvignon) fueron proporcionados por José Tomás Matus del laboratorio de Dr. Patricio Arce de la P. Universidad Católica. Tres muestras de RNA fueron proporcionadas, rotuladas de la siguiente manera: RNA3, RNA4 y RNA5, provenientes de extracciones de RNA de baya en el momento de pinta, de hojas jóvenes y de baya (4 semanas post-pinta), respectivamente. Todas las muestras fueron observadas en geles de agarosa (sección 3.2.2) con el fin de cuantificar y comprobar la integridad del RNA.

3.1.4 Preparación de células quimiocompetentes *E. coli* DB3.1

Para hacer células *E. coli* DB3.1 quimiocompetentes, se creció una alícuota de 100 µL en 3 mL de LB líquido, sin antibióticos, a 37 °C por una noche. Al día siguiente, 500-750 µL del cultivo fue traspasado a un matraz con 50 mL de LB líquido, se incubó con agitación a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5-0,6 y se centrifugó (4 °C, 10 min, 3100 g). El sedimento fue resuspendido rápida y suavemente en 10 mL de CaCl₂ 0,1M frío y estéril y centrifugado (4 °C, 5 min, 3700 g). El sedimento se volvió a resuspender en 10 mL de CaCl₂ 0,1 M frío y estéril, se incubó (4 °C, 30 min) y

luego se centrifugó (4 °C, 5 min, 3700 g). El sedimento fue resuspendido en 2 mL de CaCl₂ 0,1 M frío y estéril e incubado (4 °C, 16 hrs). Al día siguiente, se adicionó 600 µL de glicerol 100% estéril y se guardaron alícuotas de 200 µL a -80 °C hasta su utilización.

3.1.5 Preparación de células electrocompetentes *E. coli* DH5α

Para la preparación de células electrocompetentes, se dejó crecer una alícuota de 40 µl de *E. coli* DH5α en 5 mL de medio LB líquido con el antibiótico ácido nalidíxico (50 µg/mL) con agitación por toda la noche. Al día siguiente se creció el inóculo en 100 mL de LB líquido ácido nalidíxico (50 µg/mL) en un matraz con agitación a 37 °C hasta un OD_{600nm} de 0,5-0,8. Luego, se incubó en hielo por aproximadamente 30 min. Transcurrido este tiempo se traspasó a tubos de 50 mL y se centrifugó (3800 g, 4 °C, 15 min). Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 volumen de agua destilada nanopura y se homogenizó y se volvió a centrifugar (3800 g, 4 °C, 15 min). Se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior. Luego, se resuspendió el sedimento en 10 mL de glicerol 10% frío y estéril y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 500 µL de glicerol frío estéril 10% y se alícuotó en 40 µL en tubos de eppendorf estéril.

3.1.6 Preparación de células quimiocompetentes *A. tumefaciens* GV3101

Para la preparación de células *A. tumefaciens* GV3101 quimiocompetentes se incubó un pre-inóculo de 20 µl de *A. tumefaciens* GV3101 en 5 mL de LB líquido suplementado con gentamicina y rifampicina (sección 3.1.1) con agitación a 28 °C por toda la noche. Al día siguiente se traspasó el cultivo a un matraz con 100 mL de LB líquido y se incubó en las mismas condiciones anteriores hasta un OD_{600nm} de 0.5 aproximadamente. Se traspasó a dos tubos de falcon de 50 mL y se incubó en hielo por 10 min. Se sedimentó (3000 g, 20 min, 4 °C) y se desechó el sobrenadante y el

sedimento fue resuspendido en 2 mL de CaCl₂ 20 mM estéril. Se alicuotó en 100 µL y se congelaron en nitrógeno líquido antes de guardar a -80 °C.

3.2 Diseño y verificación *in silico* de partidores

El diseño de los partidores fue realizado utilizando PerlPrimer, NCBI y ClustalW2.

Se seleccionó la secuencia de *VvSDHI* (número de acceso CAO24583), a partir de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), de acuerdo al porcentaje de similitud con las SDH conocidas y/o putativas mediante su comparación y alineamiento utilizando ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html; sección 4.1.1). Luego, se utilizó PerlPrimer (v1.1.17; <http://perlprimer.sourceforge.net/>) para diseñar partidores contra las regiones 5' y 3' UTR de *VvSDHI*, de acuerdo a los parámetros de T_m y el largo de partidior. Una vez diseñados los partidores, se realizó un BLAST nucleotídico contra el genoma de vid y tabaco, para asegurar la especificidad de los partidores para *VvSDHI*. De esta manera se diseñaron los partidores: VvSDHSpeF, VvSDHBstR, VvSDHSpe52, VvSDHBst33, Vv_int_2 F y Vv_int_2 R (Tabla I).

Tabla 1. Partidores utilizados en este seminario de título. Los distintos partidores se utilizaron para la clonación del fragmento de interés *VvSDHI*, comprobación del fragmento clonado, obtención de cDNA a partir de RNA, verificación de la calidad del cDNA obtenido y constatar la expresión transitoria en tabaco.

Nombre	Secuencia	Descripción
VvSDHSpeF	5'-GGCAACTAGTAAACTCAGAGGAGTCTCACTG-3'	Hibrida con el gen de interés 49nt rio arriba del codón de inicio en azul. Junto con VvSDHBstR amplifica un producto de ~1200pb
VvSDHBstR	5'-GGCAGGTGACCGTCTGGTAAGACTGGTAAGAC-3'	Hibrida con el gen de interés 75nt rio abajo del codón de término en azul. Junto con VvSDHSpeF amplifica un producto de ~1200pb.
VvSDHSpe52	5'-GGCAACTAGTAAAATGGGAAAAGGAGGGATG-3'	Codón de inicio en azul. Junto a VvSDHBst33 amplifican un producto de 1098pb.
VvSDHBst33	5'-GGCAGGTGACCGTCTAGAGGTTGAACATGACC-3'	Codón de término en azul y nucleotido a corregir en verde. Junto con VvSDHSpe52 amplifican un producto de 1098pb.
Vv_int_2 F	5'-GTGAAGTCTCTGGTGCCAGGGGA-3'	Hibrida con una región interna, 277nt rio abajo del codón de

Vv_int_2 R	5'- ACCTCCCTTTGGGAGAAGCCGA -3'	inicio. Junto con Vv_int 2R amplifica un producto de 758pb. Hibrida con una región interna, 1034nt río abajo del codón de inicio. Junto con Vv_int 2R amplifica un producto de 758pb.
GFPdirecto	5'-GAGGGTGAAGGTGATGCAAC-3'	Hibrida con una región interna 5' del gen de la proteína fluorescente verde Junto con VvSDHBst33 amplifican un producto de 1800pb.
35Sdirecto	5'-AAGATACAGTCTCAGAAGACC-3'	Hibrida con una región interna 5' del promotor CaMV35S. Junto con VvSDHBst33 amplifican un producto de 1560pb.
18Sdirecto	5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3'	Hibrida con una región interna 5' del gen 18S. Junto con 18Sreverso amplifica un producto de 200pb.
18Sreverso	5'-ACAATGATCCTCCGCAGGT-3'	Hibrida con una región interna 3' del gen 18S. Junto con 18Sdirecto amplifica un producto de 200pb.
OligoAP	5'-CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Hibrida con poli A en la región 3' de los mRNA.

Los partidores fueron sintetizados y entregados liofilizados por la empresa IDT. Se resuspendieron en agua np para conservar un stock a -20 °C (1 mM) y para las amplificaciones por PCR (sección 3.3, 3.4 y 3.5.4), se diluyeron a 10 µM.

3.3 Obtención de cDNAs

3.3.1 Tratamiento con DNAsa

Este tratamiento tiene como fin eliminar los posibles restos de DNA que pudiesen quedar en la muestra de RNA. Para ello se utilizó 2 µg de RNA total de cada muestra (3.1.3) y se trató con 1 U de DNAsaI (Fermentas), Buffer DNAsaI 1X, 10 U de RiboLoc RNase Inhibitor (Fermentas), y agua DEPC en un volumen total de 10 µL. Se incubó (37 °C, 30 min), se dejó en hielo (1 min) y finalmente, se adicionó 1 µL de EDTA 25 mM para detener la reacción.

3.3.2 Reacción de transcripción reversa (RT)

La reacción se llevó a cabo utilizando el sistema RT-ImProm-II Reverse Transcription System de Promega. Las muestras sometidas al tratamiento de DNAsa fueron divididos en dos tubos (5.5 µl de muestra en cada uno). A cada tubo, se le adicionó 0.5 µM Oligo-AP (Tabla I). De forma separada, se preparó la mezcla A: 1X ImProm-II Reaction Buffer, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs, 0.5 U de RiboLock RNAase Inhibitor, 1 µl ImProm-II Reverse Transcriptase y agua DEPC para inactivar cualquier RNAsa que pudiera estar presente. Se adicionó suficiente agua DEPC para que al adicionar la mezcla de RNA tratada con DNAsa y Oligo-AP, el volumen final fuese de 20 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador, que ejecutó el siguiente programa: 70 °C (5 min) para desenrollar las hebras de RNA (durante los cuales se incubó sólo la mezcla de RNA tratada con DNAsa y el partidor Oligo-AP), luego se detuvo el programa y las muestras fueron incubadas en hielo mientras que se les añadió la mezcla A. Una vez agregado, se volvieron las muestras al termociclador y se continuó el programa: 25 °C (5 min) para permitir el apareamiento del RNA con el partidor Oligo-AP, 42 °C (60 min) para la extensión del cDNA y finalmente la inactivación de la enzima a 70 °C (15 min).

3.4 Amplificación de *VvSDH1*

3.4.1 Amplificación de *VvSDH1* desde 5' UTR hasta 3'UTR a partir de cDNA total por PCR

Con la finalidad de amplificar el cDNA de *VvSDH1*, se realizaron reacciones de PCR utilizando como templado los cDNAs obtenidos (sección 3.3) y los partidores *VvSDHSpeF* y *VvSDHBstR* (Tabla I). La composición de cada mezcla fue la siguiente: 1X Dream Taq Green Buffer (Fermentas), 5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM *VvSDHSpeF*, 0,5 µM *VvSDHBstR*, 3 µl de cDNA total, 1 U Dream Taq polimerasa y agua libre de DNAsa (agua np) en un volumen final de 20 µl. El protocolo de reacción consistió en 3 min de "Hot-Start" a 94 °C, para asegurar el desapareamiento de las hebras. Transcurrido este tiempo, se adicionó Taq polimerasa y se continuó

con el paso siguiente que consistió en 2 min más de denaturación a 94°C, seguido por 10 ciclos de denaturación (94 °C, 15 seg), apareamiento de los partidores (55 °C, 30 seg) y polimerización (70 °C, 1 min). A continuación, se realizaron 30 ciclos de denaturación (94 °C, 15 seg), apareamiento de los partidores (55 °C, 30 seg) y elongación con un incremento de tiempo partiendo de 1 min aumentando en 5 segs en cada ciclo (70 °C). Finalmente, se realizó un ciclo de polimerización de 10 min a 72 °C, terminando el proceso a 10 °C.

3.4.2 Amplificación de *VvSDHI* desde codón de inicio hasta codón de término de transcripción, a partir de pCR8-*VvSDHI*

Se realizaron amplificaciones de *VvSDHI* a partir de pCR8-*VvSDHI* (sección 3.5.2). La composición de cada mezcla fue la siguiente: 1X Pfu Buffer con MgSO₄ incorporado (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM VvSDHSpe52, 0,5 µM VvSDHBst33, 1 µl de pCR8-*VvSDHI*, 1 U Pfu DNA Polimerasa y agua np en un volumen final de 20 µl. El protocolo de reacción utilizado fue el mismo a lo descrito en sección 3.4.1.

3.4.3 Amplificación de un fragmento interno de *VvSDHI* a partir de cDNA total por PCR

Con la finalidad de verificar la expresión de *VvSDHI*, se realizaron reacciones de PCR utilizando como templado los cDNAs obtenidos a partir de un RT-PCR (sección 3.3) realizado con el RNA de tabaco agroinfiltrado (sección 3.8.2) y los partidores Vv_int 2F y Vv_int 2 R (Tabla I).

La composición de cada mezcla fue la siguiente: 1X Taq Buffer (Invitrogen), 5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM Vv_int 2 F, 0,5µM Vv_int 2 R, 2 µl de cDNA total, 1 U Taq polimerasa (Invitrogen) y agua np en un volumen final de 20 µl. El protocolo de reacción consistió en 5 min de denaturación a 94°C, seguido por 35 ciclos de denaturación (94 °C, 15 seg), apareamiento de los partidores (60 °C, 30 seg) y polimerización (70 °C, 1 min). Finalmente, se realizó un ciclo de polimerización de 10 min a 72 °C, terminando el proceso a 10 °C.

3.4.4 Geles de electroforesis de DNA

Se prepararon geles de agarosa 1% o 1,5% dependiendo del tamaño o la separación de la(s) bandas que se espera observar mediante la electroforesis. Para la preparación de éstos, se agregó 1 g o 1,5 g de agarosa analítica a 100 mL de TAE 1% (0.04 M Tris-acetato pH 8; 0.001 M EDTA) y se adicionó 1 µg/mL de bromuro de etidio. Se calentó mediante microondas hasta que la solución se tornara transparente, sin cristales. Se enfrió bajo agua o en el meson hasta aprox 50-60 °C, antes de verter en la bandeja o molde. Una vez gelificado, se retiró cuidadosamente los peines y se trasladó a la cámara de electroforesis, la cual contenía suficiente TAE 1% para cubrir el gel. Se cargaron las muestras las cuales contenían buffer de carga (Fermentas) en una proporción de aproximadamente 1:5, muestra: buffer. Se corrió las muestras a corriente constante y voltaje de entre 90-100 V por aproximadamente 30-45 min para DNA y 70-80 V por 15-20 min para RNA. Finalmente, se observaron las muestras en una cámara oscura equipada de transiluminador UV y se capturó y analizó el imagen mediante el software GeneGenius Classic (SynGene®)

3.5 Clonación de *VvSDH1* en el vector *pCR8*

3.5.1 Purificación del fragmento *VvSDH1* desde geles de agarosa

El fragmento de *VvSDH1* amplificado por PCR (sección 3.4.1 o 3.4.2) fue cargado en geles de agarosa 1% y se separó la banda de interés de ~1200 pb o 1098 pb mediante electroforesis (sección 3.2.2). Luego, se purificó esta banda utilizando el *Wizard SV gel and PCR clean up system* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento fue recuperado en 20 µl de agua np.

3.5.2 Clonación de *VvSDH1* en el vector de entrada *pCR8*®

El vector de entrada utilizado fue *pCR8* (Invitrogen) y el ligamiento con la secuencia de interés se realizó mediante el sistema TOPO®TA. En éste, *pCR8* (~ 3 kb) es mantenido lineal mediante una topoisomerasa I unida de forma covalente a sus extremos (vector activado). Además, los extremos

poseen una timina desapareada el cual permite el ligamiento de fragmentos de PCR amplificados con Taq. Esto se debe a que la Taq polimerasa posee una actividad transferasa inespecífica, y adiciona una adenina en el extremo 3' de todos los fragmentos amplificados.

Cuando los fragmentos de *VvSDHI* fueron amplificados utilizando la enzima Pfu (sección 3.4.2), fue necesario adicionar la adenina desapareada, ya que a diferencia de la enzima Taq polimerasa ésta no posee actividad transferas inespecífica. Para ello, a cada 20 µl de muestra de PCR, se agregaron Buffer Taq 1X, MgCl₂ 3 mM, dATP 0.25 mM y Taq 1U (72 °C, 30 min). El protocolo de ligamiento del producto PCR (con extremos 3' con una adenina desapareada) con el vector pCR8 se realizó según las indicaciones del fabricante. De esta manera, la secuencia de interés quedó clonada en pCR8, dentro de los sitios attL1 y attL2, los cuales permiten la recombinación con sitios attR1 y attR2, respectivamente, presentes en los vectores de destinación pGWB2 y pMDC44 (Tecnología Gateway, Invitrogen). Además, pCR8 posee sitios de unión para los partidores M13 directo y M13 reverso río arriba y río debajo de los sitios attL1 y attL2, respectivamente, permitiendo la secuenciación del fragmento de interés.

3.5.3 Transformación de *E. coli* DH5α competentes con pCR8-*VvSDHI*

Células electrocompetentes de *E. coli* DH5α (sección 3.1.5) fueron transformados con los productos del ligamiento entre pCR8 y *VvSDHI*. Para eliminar las sales presentes en la mezcla, se realizó un paso de “desalting”, que consistió en dializar la muestra de pCR8-*VvSDHI* con filtros de membrana (Millipore) de 0.025µm en agua des-ionizada por 20 min. Luego, se transfirió la membrana a un pocillo con agua altamente des-ionizada (agua miliQ) y se dializó por 20 min más.

Se transformaron las células competentes (150 µl) con la muestra desalada utilizando un electroporador Gene Pulser Xcell™ de Bio-Rad (Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias). La electroporación se hizo en una cubeta de 2 mm mediante un pulso de 2.5 V. Luego, se agregó 1 mL LB líquido, se traspasó todo el contenido a un tubo de microcentrifuga y se incubó a 37 °C, 200 rpm,

por 90 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó (6500 g, 5 min) para eliminar el sobrenadante y se sembró en placas de LB sólido (sección 3.1.1).

3.5.4 PCR de colonia, extracción y purificación de DNA plasmidial para la verificación de colonias bacterianas transformantes

Para verificar la transformación de las colonias *E. coli* (sección 3.5.3), se picaron colonias al azar y se realizó un PCR de colonia. Las colonias picadas fueron resuspendidas en 5 µl de agua np y la mezcla utilizada para el PCR consistió en: 1X Buffer de reacción Biolasa (Bioline), 5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM VvSDHSpe52, 0,5 µM VvSDHBst33, 1 µl de suspensión de bacterias y 1 U Taq Biolasa. El protocolo de reacción consistió en denaturación (94 °C, 5 min), seguido por 32 ciclos de denaturación (94 °C, 30 seg), apareamiento de los partidores (55 °C, 30 seg) y polimerización (72 °C, 1 min), finalizando con un ciclo de polimerización (72 °C, 10 min), terminando el proceso a 10 °C. El producto de PCR fue observado en geles de agarosa 1% (sección 3.2.2) y las colonias transformadas fueron crecidas en 15 mL de LB líquido (sección 3.1.1) utilizando los 4 µl restantes de la suspensión de bacteria. Luego, 800 µl del cultivo fueron guardados en glicerol 20% a -80 °C como respaldo. El resto de la muestra fue utilizado para la purificación de DNA plasmidial mediante el kit "AxyPrep Plasmid Miniprep Kit" (Axygene) siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente las muestras fueron secuenciadas por la empresa Macrogen, utilizando partidores M13 directo y M13 reverso.

3.5.5 Digestión enzimática de pCR8-VvSDHI

Se comprobó la orientación de *VvSDHI* con respecto a los sitios de attL1 y attL2 en pCR8 mediante ensayos de digestión con la enzima de restricción XbaI (Fermentas). Según las recomendaciones del fabricante, la mezcla que se utilizó para realizar la digestión fue la siguiente: Buffer Tango IX, 1 µg de DNA, 5 U XbaI y agua np hasta un volumen final de 20 µl. Esta mezcla fue incubada (37 °C, 6 hrs) y luego analizada en un gel de agarosa 1%.

3.6 Clonación de *VvSDH1* en los vectores de destinación

3.6.1 Clonación de *VvSDH1* en los vectores pMDC44 y pGWB2

En este seminario de título, se escogieron dos vectores binarios de expresión, pGWB2 y pMDC44. Ambos vectores binarios utilizan el sistema Gateway para clonar el gen de interés. El sistema Gateway es una tecnología de clonamiento muy utilizada que aprovecha las propiedades de recombinación sitio específico del bacteriófago lambda (Landy 1989) para clonar de forma rápida y eficiente una secuencia de interés en diferentes vectores de expresión. Este sistema consiste en dos pasos; en primer lugar la secuencia de interés es clonada en un vector de entrada entre los sitios attL1 y attL2 presentes en ésta. En este seminario de título se escogió el vector de entrada pCR8 (sección 3.5.2). Luego mediante recombinación específica con los sitios attR1 y attR2 presentes en el vector de destinación, la secuencia de interés queda clonada en el vector de expresión.

Mientras que el vector pGWB2 ya se encontraba en el laboratorio al inicio de este seminario de título, el vector pMDC44 y células de *E. coli* cepa DB3 fueron proporcionados por el laboratorio de Dr. Ariel Orellana de la Universidad Andrés Bello. Estas células son resistentes a los efectos tóxicos del producto proteico del gen *ccdB* presente en los vectores de destinación diseñados para ser transformados mediante el sistema Gateway y fueron preparadas para hacer de ellas quimio-competentes (sección 3.1.4).

Tanto pGWB2 (Fig. 3) como pMDC44 (Fig. 4) permiten la selección de bacterias transformantes mediante el antibiótico kanamicina. Además, en ambos casos el gen de interés se clona en un fragmento del vector flanqueado por las secuencias LB ("T-left border") y RB ("T-right border"), bordes izquierdo y derecho del T-DNA. También dentro de las secuencias LB y RB se encuentra un gen de resistencia a higromicina (para la selección de plantas transformantes) y las secuencias para la recombinación específica, attR1 y attR2. Entre estas dos secuencias específicas para la recombinación, se encuentra el gen *ccdB*, el cual sirve como marcador de selección negativo para

células no transformadas. Se escogieron estos dos vectores binarios de destinación puesto a que cada uno permite cumplir objetivos distintos. pGWB2 (Nakagawa et al 2007) tiene como finalidad sobreexpresar la secuencia de interés mediante el promotor constitutivo y fuerte CaMV35S (Fig 3), mientras que pMDC44 (Curtis y Grossniklaus 2003) permite generar una proteína con GFP fusionado en el extremo N-terminal de la proteína de interés, también controlado por el promotor CaMV35S (Fig 4).

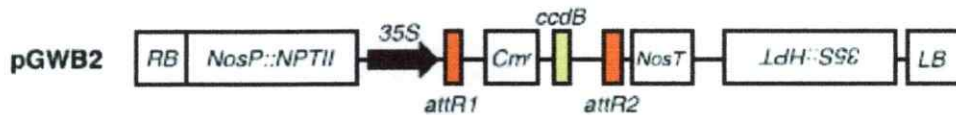


Fig 3. Esquema del T-DNA de pGWB2. Los componentes del T-DNA de pGWB2 son: RB (T-right border), LB (T-left border), NosP (Promotor nopalina sintetasa) para la expresión en tegido vegetal, NPTII (gen neomicina fosfotrasferasa II) para otorgar resistencia contra kanamicina, 35S (promotor fuerte y consitutivo), attR1 y attR2 (sitios de recombinación), NosT (terminador del gen nopalina sintetasa), HPT (higromicina B fosfotrasferasa) para otorgar resistencia contra higromicina y el gen letal *ccdB* el cual permite hacer una selección negativa.

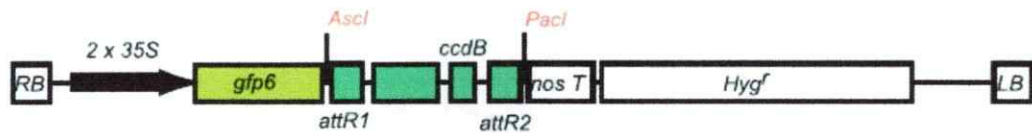


Fig 4. Esquema del T-DNA de pMDC44. Los componentes del T-DNA de pMDC44 son: RB (T-right border), LB (T-left border), 35S (promotor fuerte y consitutivo), *gfp6* (proteína fluorecente verde), attR1 y attR2 (sitios de recombinación), NosT (terminador del gen nopalina sintetasa), Hyg^r (resistencia contra higromicina) y el gen letal *ccdB* el cual permite hacer una selección negativa..

Para la recombinación entre pCR8-*VvSDHI* y pGWB2 o pMDC44, se utilizó Gateway LRClonase II Enzyme Mix y se preparó una mezcla, de acuerdo a las indicaciones del fabricante, compuesto por 50-150 ng pCR8-*VvSDHI*, 150 ng del vector binario de expresión (pMDC44 o pGWB2), una cantidad de Buffer TE pH 8 suficiente para completar 8 μ l y 2 μ l de LR ClonasaII. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, se detuvo la reacción con la Proteínasa K .

3.6.2 Extracción y purificación de DNA plasmidial para la verificación de colonias bacterianas transformantes

Los vectores binarios de expresión pGWB2-*VvSDHI* o pMDC44-*VvSDHI* fueron transformadas en células *E. coli* One Shot® (Invitrogen) quimiocompetentes según las indicaciones del fabricante y propagadas (sección 3.1.1). Al día siguiente, se realizó un PCR de colonia de la misma forma que se hizo con las células transformadas de *E. coli* DH5α y se realizaron cultivos en medio LB líquido de las colonias transformadas (sección 3.5.4). La preparación de DNA plasmidial se realizó mediante un método de lisis alcalina. Para la preparación se requiere de tres soluciones; Solución I: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM y EDTA pH 8 10 mM; Solución II: NaOH 0.2 N, SDS 1%; Solución III: Acetato de Potasio 5 M. Mientras que las soluciones I y III fueron almacenadas a 4 °C, la solución II fue preparada en el momento de usar.

Se centrifugaron los cultivos bacterianas (12.000 g, 5 min) y se desechó el sobrenadante. Luego, el sedimento fue resuspendido en Solución I (100 µl) con agitación vigorosa. Una vez resuspendido, se adicionó Solución II (200 µl) y se mezcló mediante inversión (5 veces). Tras incubar en hielo (5 min), se centrifugó (4 °C, 12.000 g, 5 min), se rescató el sobrenadante y se realizó una extracción con medio volumen de fenol: cloroformo (1:1). Se mezcló con agitación vigorosa y se volvió a centrifugar (4 °C, 12.000 g, 5 min). Se rescató la fase superior y se agregaron 2 volúmenes de isopropanol frío (-20 °C), mezclando mediante inversión (5 veces) e incubando (-80 °C, 5 min). Transcurrido este tiempo, se volvió a centrifugar (4 °C, 12.000 g, 5 min), se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 70% (800 µl). Luego, se centrifugó (4 °C, 12.000 g, 3 min), se desechó el etanol y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Una vez seco, se resuspendió en 50 µl buffer TE pH 8 o agua np. Finalmente, se eliminaron los posibles restos de RNA mediante un tratamiento con 2 µl de RNAsaA (Fermentas; 10 mg/ml; 20 min, 37 °C) y se guardaron las muestras de DNA plasmidial a -20 °C hasta su utilización.

3.6.3 Determinación de la presencia y orientación de *VvSDH1* en pMDC44-*VvSDH1* y pGWB2-*VvSDH1* mediante PCR

En el caso de pMDC44-*VvSDH1*, se utilizaron los partidores sentido GFPdirecto y antisentido *VvSDHBst33* (Tabla I). La mezcla utilizada para el PCR consistió en: 1X Buffer de reacción Biolasa (Bioline), 5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μM GFPdirecto, 0,5 μM *VvSDH1Bst33*, 1 μl pMDC44-*VvSDH1* (sección 3.6.2), 1 U Taq Biolasa y agua np para cumplir un volumen final 20 μl. El protocolo de reacción consistió en denaturación (94 °C, 5 min), seguido por 32 ciclos de denaturación, apareamiento de partidores y polimerización. El programa finaliza con un ciclo de polimerización (72 °C, 10 min), terminando el proceso a 10 °C. Los 32 ciclos de denaturación consistieron en 30 seg a 94°C. Los ciclos de apareamiento de los partidores se realizó a 4 distintas temperatura: 60, 62,5, 65,6 y 67 °C, en distintas filas del termociclador, todas por 50 seg, y la polimerización se realizó a 72 °C por 1 min 45 seg.

En el caso de pGWB2-*VvSDH1*, se utilizaron los partidores sentido 35Sdirecto y antisentido *VvSDHBst33* (Tabla I) y se utilizó la misma mezcla de reacción descrita arriba. En cuanto al protocolo del programa de PCR, se hizo un PCR de gradiente, al igual que en el caso anterior, con las siguientes dos diferencias en los 32 ciclos de denaturación, apareamiento de partidores y polimerización: Las temperaturas de apareamiento fueron 5: 58, 59,9, 64,1, 66 y 68 °C, cada uno en una fila distinta determinado por el termociclador y la polimerización se realizó por 1 min 30 seg a 72 °C (las condiciones de denaturación se mantuvieron iguales).

Otro ensayo para determinar la presencia de *VvSDH1* en los vectores binarios consistió en amplificar *VvSDH1* desde el codón de inicio hasta el codón de término de transcripción. Este ensayo fue realizado tanto para pMDC44-*VvSDH1*, como para pGWB2-*VvSDH1*. La mezcla de PCR fue la misma descrita arriba con la única diferencia de que los partidores utilizados fueron *VvSDHSpe52* y *VvSDHBst33*. El protocolo de reacción consistió en 5 min de denaturación a 94 °C, seguido por 32

ciclos de denaturación (94 °C, 15 seg), apareamiento de los partidores (55 °C, 30 seg) y polimerización (70 °C, 1 min). Finalmente, se realizó un ciclo de polimerización de 10 min a 72 °C, terminando el proceso a 10 °C.

3.6.4 Determinación de la presencia y orientación de *VvSDH1* en pMDC44-*VvSDH1* y pGWB2-*VvSDH1* mediante digestión enzimática

Para ambos vectores, se realizaron purificaciones de DNA plasmidial mediante el kit "AxyPrep Plasmid Miniprep Kit" (Axygene) siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego se realizaron ensayos de digestión para corroborar la presencia y orientación de *VvSDH1*, utilizando la enzima XbaI (Fermentas; sección 3.5.4).

3.7 Transformación de *A. tumefaciens* con pMDC44-*VvSDH1* y pGWB2-*VvSDH1*

A. tumefaciens cepa GV3101 quimiocompetentes fueron preparados en el laboratorio (sección 3.1.6). Una vez descongeladas, se les adicionó 50 ng del vector final (sección 3.6.2), se incubó en nitrógeno líquido por 5 min y se devolvieron al hielo. Se le adicionó 1 ml de LB líquido, se incubó (28 °C, 200 rpm, 16 hrs) y se sembraron en LB sólido con antibióticos (3.1.1).

3.7.1 Verificación de la transformación de *A. tumefaciens* con pMDC44-*VvSDH* y pGWB2-*VvSDH* mediante PCR

Se picaron colonias y se diluyeron en 5 µl de agua np. Un µl fue utilizado para realizar PCR de colonia (sección 3.5.4) y el resto fue utilizado para inocular cultivos de LB líquido (5 mL) con los respectivos antibióticos (28 °C, 200 rpm, 16 hrs). El día siguiente, 800 µl de la muestra fue guardado en glicerol al 20% a -80 °C y con la muestra restante se realizó una preparación de DNA plasmidial.

Para la preparación se requiere de tres soluciones; MPSI: Glucosa 50 mM, Tris pH 8.0 25 mM y EDTA 10 mM; MPSII: NaOH 0.2 N, SDS 1%; MPSIII: Acetato de Potasio 5 M, Acido acético glacial 11.5%. Las tres soluciones se prepararon en agua destilada. Se centrifugaron las muestras

(12.000 g, 5 min) y se resuspendió el sedimentado en MPSI (100 µl) mediante agitación vigorosa, incubando la suspensión a temperatura ambiente (5 min). Después, se agregó lisozima (20 µl de 20 mg/mL), se agitó vigorosamente (1 seg) y se incubó (37 °C, 15 min). Transcurrido este tiempo, se adicionó MPSII (200 µl; recién preparada), se mezcló mediante inversión (3-4 veces) y se incubó en hielo (5 min). Se agregó MPSIII (150 µl), se agitó vigorosamente (10 seg) y se volvió a incubar en hielo (5 min). Luego, se centrifugó (10.000 g, 5 min), se adicionaron 400 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) al sobrenadante rescatado, se mezcló y se centrifugó (7.000 g, 5 min). Se volvió a rescatar el sobrenadante, repitiendo el paso anterior una vez con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez sólo con cloroformo. Tras esto, al sobrenadante rescatado se le agregó isopropanol (300 µl), se incubó (-80 °C, 10 min) y se centrifugó (12.000 g, 5 min). El sedimentado fue lavado con 500 µl de etanol 70% y se volvió a centrifugar. Se removió el etanol, se secó el sedimentado y se resuspendió en 50 µl de Buffer TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM) con 2 µl de RNAsa A (10 mg/mL, 37 °C, 20 min). Se utilizaron 2 µl de los vectores purificados en reacciones de PCR (sección 3.6.3).

3.8 Análisis funcional de pMDC44-VvSDH1 y pGWB2-VvSDH1

3.8.1 Transformación transitoria de hojas de *N. tabacum* con *A. tumefaciens* portando pMDC44-VvSDH1 y/o pGWB2-VvSDH1

Para la transformación transitoria de tabaco, se utilizó la técnica de agro-infiltración. Para ello, *A. tumefaciens* fueron crecidos en LB líquido (sección 3.1.1) hasta una DO600nm de 0,6 - 0,8. Se sedimentaron las bacterias (5000 g, 5 min, 22 °C) y se resuspendieron hasta una DO600nm ~0,8, en medio de infiltración (MMA) [MES 10 mM pH 5,7, MgCl₂ 10 mM y acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona) 150 µM]. Esta suspensión fue utilizada para la agro-infiltración de *N. tabacum* en donde se roció con agua la cara abacial de hojas jóvenes con agua, y se perfundió la

suspensión de *A. tumefaciens* usando una jeringa de 5 mL. Se mantuvo el *N. tabacum* transformado por 4 días en condiciones ambientales controladas (sección 3.1.2).

3.8.2 Extracción de RNA total de hojas de tabacos transformados y análisis de expresión mediante RT-PCR

La extracción de RNA totales se realizó usando RNA-Solv Reagent (Omega Bio-tek). Cuatro días después de la agro-infiltración, se tomó alrededor de 60 mg de cada muestra de hojas de *N. tabacum* en tubos de 1,5 mL. Se congelaron las muestras en nitrógeno líquido (5 min) y luego se pulverizó en un mortero frío previamente esterilizado. Al polvo resultante, se agregó 1 ml RNA-Solv Reagent, se homogenizó, se añadió cloroformo (200 µl), se agitó vigorosamente (15 seg) y se incubó (hielo, 10 min). Transcurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas (12.000 g, 15 min, 4 °C) y la fase superior fue rescatada y transferida a un nuevo tubo. Luego, se agregó isopropanol (500 µl, -20 °C, 20 min) y se centrifugó (12.000 g, 10 min, 4 °C). El precipitado fue lavado con 1 ml de etanol 80% en agua DEPC enfriado a -20 °C, agitado vigorosamente (10 seg), centrifugado (3 min, 21.000g, 4 °C), secado y resuspendido en 30 µL de agua DEPC.

Estas muestras fueron utilizadas en reacciones de RT (sección 3.3.2), tras el cual se realizó una amplificación del cDNA de 18S para verificar la calidad de la reacción de RT realizada. La composición de cada mezcla fue la siguiente: 1X Taq Buffer (Invitrogen), 5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM 18Sdirecto, 0,5 µM 18Sreverso, 2 µl de cDNA total, 1 U Taq polimerasa (Invitrogen) y agua np en un volumen final de 20 µl. El protocolo de reacción consistió en 4 min de denaturación a 94 °C, seguido por 35 ciclos de denaturación (94 °C, 45 seg), apareamiento de los partidores (56 °C, 45 seg) y polimerización (72 °C, 45 seg). Finalmente, se realizó un ciclo de polimerización de 10 min a 72 °C, terminando el proceso a 10 °C. Luego, una vez verificada la calidad del cDNA, se verificó la expresión de *VvSDH1* mediante PCR (sección 3.5.3) utilizando 2 µL de cDNA.

3.8.3 Localización subcelular de GFP-VvSDH1 por microscopia de fluorescencia

Para el análisis de la expresión y el estudio de la localización subcelular, se utilizó pMDC44-*VvSDH1* (sección 3.6.1). Cuatro días después de la agroinfiltración de *N. tabacum* (sección 3.8.1), se hicieron cortes muy finos a las hojas. Estas muestras fueron observadas bajo el microscopio epifluorescencia Axiovert 200M de Zeiss, mediante el software AxioVision 4.8, con la cámara Zeiss AxioCam HRm. Como control positivo se utilizó pCambia 1302 (35S-GFP), el cual expresa el gen GFP comandado por el promotor fuerte y constitutivo 35S. Como control negativo se utilizó el vector pCambia-AtSDLprom el cual contiene un fragmento del promotor de una posible SDH en *Arabidopsis* (estudiado en el laboratorio), vale decir, un vector que no contiene ningún gen cuyo producto proteico sea fluorescente posible de ser observado bajo microscopía fluorescente.

3.9 Estudio *in-silico* de la posible función de *VvSDH1*

3.9.1 Dendograma de SDH conocidas y *VvSDH* candidatas

Los dendogramas fueron realizados utilizando el programa MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Este programa permite realizar 1000 iteraciones del análisis utilizando un algoritmo basado en matrices de distancia (UPGMA). Además realiza una estimación de distancia utilizando el modelo de estimación de distancia, p-distance.

3.9.2 Análisis *in-silico* de la posible función de *VvSDH1*

Para el estudio *in-silico* de la posible función de *VvSDH1* se utilizó la base de datos Plexdb (www.plexdb.org). Esta consiste en una base de datos donde distintos investigadores comparten los resultados obtenidos en variados experimentos de chip de ADN (DNA microarray). Además, dentro de la misma base de datos existe una serie de herramientas útiles para encontrar el gen de interés o los experimentos en las cuales la expresión diferencial de un gen de interés es significativa. De esta manera, el primer paso y la primera herramienta utilizada en esta base de datos es la opción "find your gene" el cual entrega una lista de candidatos "probeset" a partir de una secuencia entregada. Una vez escogido el "probeset" adecuado que representa *VvSDH1*, se prosiguió a encontrar aquellos

experimentos bajo el cual hay un cambio significativo de expresión, mediante la herramienta "Gene Oscilloscope". Los datos entregados por la base de datos se encuentra ya normalizada (RMA normalization) de tal manera que se tomaron los datos para graficarlos mediante el programa GraphPad Prism 5, con la finalidad de facilitar el análisis y el planteamiento de una hipótesis respecto a la posible función fisiológica que pudiese tener VvSDH1 *in vivo*.

4 RESULTADOS

4.1 Identificación y análisis de VvSDH1

4.1.1 Identificación y selección de una posible SDH de uva

Utilizando las secuencias aminoacídicas de MdSDH3 de manzana (AAL37295), LeSDH de tomate (BAE47038) y AtSDL de *Arabidopsis* (NP_200010), se realizó una búsqueda de ortólogos en *Vitis vinifera* en la base de datos de NCBI. Para las tres proteínas, se encontraron las mismas cinco candidatas SDH en vid (Tabla II), dentro de las cuales se encuentra la secuencia de la enzima identificada como L-idonato deshidrogenasa (L-idonato DH, ABA01327.1, DeBolt et al 2006).

En vides, L-idonato DH es la enzima que promueve el paso limitante (ácido L-idónico a ácido 5-keto-D-glucónico) en la biosíntesis de ácido tartárico a partir de ácido ascórbico, mejor conocido como vitamina C (DeBolt et al 2006). Como fue mencionado en este trabajo, esta enzima (366 aa, 40.1 kDa) posee un 77% de similitud en su secuencia aminoacídica con NAD-SDH de una serie de especies vegetales, como manzana y tomate. Sin embargo, al realizar ensayos enzimáticos, L-idonato DH poseía muy baja actividad frente a sorbitol como sustrato (DeBolt et al 2006). Por lo tanto, la secuencia que fue identificada en nuestro análisis como L-idonato DH, si bien no es una posible candidata de SDH en vid, fue útil para evaluar las otras candidatas, eliminando aquellas que presentaban una mayor similitud con L-idonato DH que con otras SDH conocidas.

Tabla II Tabla resumen de la similitud entre cuatro posibles SDH en vid, L-idonatoDH de vid y SDH de manzana, tomate y SDH putativa de *Arabidopsis thaliana*. Se seleccionó la secuencia con número de acceso CAO24583.1 como putativa SDH y se nombró VvSDH1.

Score /E-value	CAO24583.1 VvSDH1	CAO24586.1	CAN73444.1	ABA01327.1 L-idonatoDH	CAN73609.1
MdSDH3	<u>567</u> / 6e-160	<u>563</u> 6e-159	<u>563</u> 1e-158	<u>562</u> 1e-158	<u>555</u> 2e-156
AtSDL	<u>632</u> / 1e-179	<u>622</u> 1e-176	<u>605</u> 2e-171	<u>602</u> 1e-170	<u>595</u> 3e-168
LeSDH	<u>640</u> / 0.0	<u>635</u> 2e-180	<u>602</u> 2e-170	<u>601</u> 3e-170	<u>593</u> 8e-168
Promedio Score	613	606.67	590	588.33	581

Al realizar un alineamiento entre las secuencias aminoacídicas (y nucleotídicas; datos no mostrado) de las candidatas de SDH en vid, se observa un grupo distintivo formado por las secuencias CAN73444.1 y CAO24583.1, las cuales presenta un 100% similitud aminoacídica entre ellas. Al analizar estas dos secuencias con mayor detalle, se observó que CAN73444.1 es la misma secuencia que CAO24583.1, con la diferencia que es una secuencia aproximadamente 60 aminoácidos más corta en el extremo N-terminal. Es por ello que para el resto de los análisis, no se consideró la secuencia CAN73444.1. Por otra parte, cabe destacar que CAO24586.1 y CAN73609.1 presentan un 98-99% de similitud con la L-idonato DH, mientras que entre la L-idonato DH y la CAO24583.1 sólo se observa un 76% de similitud (Tabla III). Dado al alto "score" promedio, bajo "E-value" y los resultados observados en el alineamiento de las candidatas de SDH de vid y L-idonato DH, se consideró que la secuencia CAO24583.1 era la mejor candidata y por ello se la nombró *VvSDH1*.

Para tener mayor certeza sobre la selección de *VvSDH1* como supuesta SDH de vid, se realizó un dendograma de las secuencias aminoacídicas de SDHs conocidas y putativa (*Arabidopsis*), secuencias de ADHs y L-idoitol DH, *VvSDH1* (CAO24583.1), CAO24586.1 y CAN73609.1 de vides (sin considerar la secuencia truncada, CAN73444.1) (Fig 5). Si bien *VvSDH1* presenta sólo una similitud de un 76% con L-idonato DH, la finalidad de este ensayo es comprobar que *VvSDH1* presenta una similitud igual o mayor a un 76% con alguna SDH conocida, para poder considerarla como una buena candidata de SDH de vid. En el dendograma se observó que la candidata escogida, *VvSDH1*, se agrupa junto a otras secuencias de SDH de especies dicotiledoneas no-Rosaceae, vale decir, en un grupo distinto al de las L-idonato DH o de las ADHs. Por lo tanto, a partir del alineamiento obtenido se puede hipotetizar que *VvSDH1* es una SDH y no una isoforma de la L-idonato DH o de la ADH.

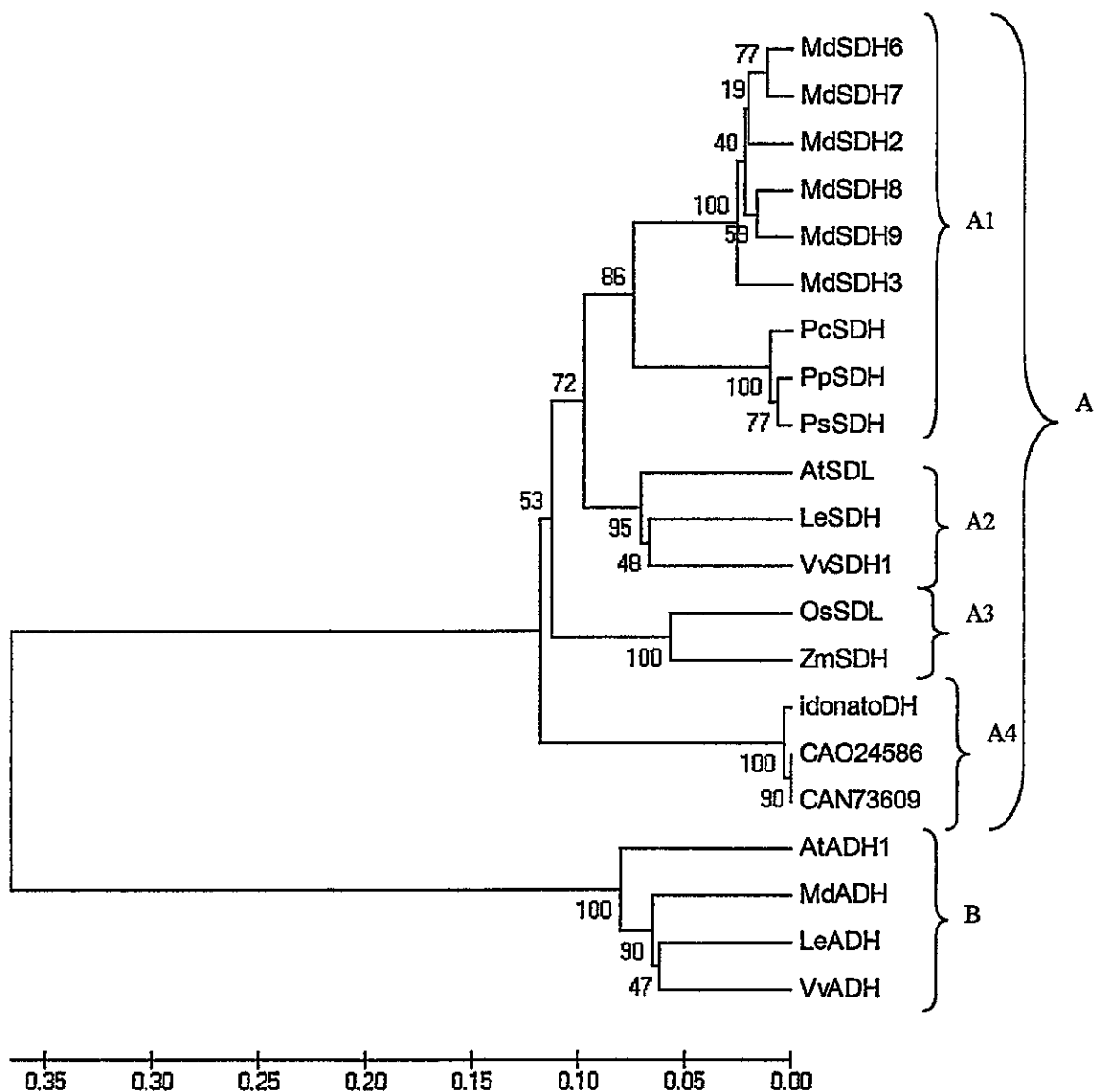


Fig 5 Dendrograma del alineamiento aminoacídico entre sorbitol deshidrogenasas vegetales conocidas (LeSDH, MdSDH2, MdSDH3, MdSDH6, MdSDH7, MdSDH8, MdSDH9, PcSDH, PpSDH, PsSDH y ZmSDH) y putativas (AtSDL, OsSDL), alcoholes deshidrogenasas (AtADH1, MdADH, LeADH y VvADH, NP_177837.1, CAA88271.1, CAA54450.1 y AAB65840.1 respectivamente), y los candidatos de SDH en vides (VvSDH1, CAO24586, CAN73609) incluyendo idonatoDH. Se distinguen dos grupos principalmente: (A) SDH e idonato DH. (B) Alcoholes deshidrogenasas. Dentro del grupo (A) se distingue como un subgrupo de SDH rosacea (A1) dicotiledoneas no rosacea (A2), monocotiledonia no rosáceas (A3) y un subgrupo de L-idonato deshidrogenasa (A4). Se indica en cada nodo el porcentaje de "bootstrap" obtenido con 1000 repeticiones utilizando el algoritmo UPGMA mediante el software MEGA4. Además en el inferior se muestra la distancia, como una medida filogenética en el cual se asigna un 0 a secuencias pertenecientes al mismo organismo y un 1 a secuencias totalmente disímiles. Los numeros de acceso se encuentran en el anexo 2.

Tabla III: Porcentaje de identidad aminoacídica entre sorbitol deshidrogenasas conocidas de no Rosaceae (LeSDH, ZmSDH), Rosaceae (MdSDH3) y putativa (AtSDL), alcohol deshidrogenasa de vid (VvADH), y las SDH candidatas en vides (VvSDH1, CAO24586, CAN73609) incluyendo idonatoDH.

%	AtSDL	LeSDH	ZmSDH	MdSDH3	VvSDH1	CAO 24586.1	idonatoDH	CAN 73609	VvADH
AtSDL	---	84	75	78	84	77	78	77	20
LeSDH		---	77	77	86	78	79	78	21
ZmSDH			---	75	75	69	69	69	22
MdSDH3				---	76	74	74	74	21
VvSDH1					---	76	76	76	21
CAO 24586.1						---	98	99	20
idonatoDH							---	98	20
CAN 73609								---	19
VvADH									---

Considerando todos los antecedentes de análisis de secuencias, se escogió VvSDH1 como posible SDH de vid para estudios posteriores. VvSDH1 es una proteína (CAO24583.1) de 365 aa y su cDNA posee 1098 pb. La secuencia genómica (CU459582.1) posee 5 intrones y 6 exones, y tiene un total de 3.328 pb desde el codón de inicio hasta el codón de término de traducción incluyendo los intrones.

4.2 *Análisis bioinformático de la secuencia proteica de VvSDH1*

Mediante la base de datos de familias y dominios de proteínas, Prosite y comparaciones con los resultados presentados por Ohta et al. (2005) sobre LeSDH, se identificaron los residuos aminoacídicos en VvSDH1 que se encuentran conservados en los SDHs. De esta manera se identificó el sitio catalítico putativo de unión a Zinc, el sitio estructural putativo de unión a Zinc y un sitio conservado común para las ADHs que contienen Zinc, sitios también conservados en SDH de manzana, tomate y una posible SDH de Arabidopsis (Fig 6).

Además mediante un alineamiento de VvSDH1 con SDH de manzana, tomate y una posible SDH de Arabidopsis (Fig 6), se observa que VvSDH1 posee un largo muy similar a las otras SDHs y que los sitios conservados se encuentran en las mismas posiciones, demostrando la homología de VvSDH1 con otras SDHs y confirmando la hipótesis de que VvSDH1 es una posible SDH en vid.

```

AtSDL  MGKGGMSQG---EGSKVEEENMAAWLVGINTLKIQPFLLPSVGPVDVVRMKAVGICGS 56
VvSDH1 MGKGGMSQG---GDGRGEGEENMAAWLLGVNNTLKIQPFILPPLGPHDVRVRMKAVGICGS 57
LeSDH  MGKG-----GS DENMAAWLLGVNNTLKIQPFNLPALGPHDVRVRMKAVGICGS 47
MdSDH3 MGKGGQS CNGMVR DVKPFVE KENMAAWLVVDVNTIKILPFKLP IGPNDVQIRIKAVGICGS 60
***** .*****:.*:* ** *.:*:*:*:*:*:*:*:*

AtSDL  DVHYLKTMRCADFVVKPEPMVIGHECAGIIEEVGEEVKHLVVGDRVALEPGISCWRCCNLCR 116
VvSDH1 DVHYLKLRCADFIVKEPMVIGHECAGIIEEVGEEVKSLVPGDRVALEPGISCWRCQQLCK 117
LeSDH  DVHYLKTMRCADFVVKPEPMVIGHECAGIIEEVGEEVKTLVPGDRVALEPGISCWRCCNLCK 107
MdSDH3 DVHYLKTMRCADFEVKEPMVIGHCAGIVDKVGEVKHLVPGDRVALEPGISCARCQQCK 120
*****.:*:* ** *.:*:* ** *.:*:* ** *.:*:* ** *.:*:*

AtSDL  EGRYNLCPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCKFLPENVSLEEGAMCEPLSVGVHACRR 176
VvSDH1 EGRYNLCPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCKFLPDNVSLEEGAMCEPLSVGVHACRR 177
LeSDH  EGRYNLCPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCKFLPDDISLEEGAMCEPLSVGVHACRR 167
MdSDH3 GGRYNLCPEMKFFATPPVHGALANQIVDPADLCKFLPENVSLEEGAMCEPLSVGVHACRR 180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

AtSDL  AEVGPETNVLVMGAGPIGLVTMLAARAFSVPRIVVDVDENRLAVAKQLGADEIVQVTIN 236
VvSDH1 ADIGPESNVLVMGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVVDVDDYRLSVAKDLGADEIVKVSTN 237
LeSDH  ANVGPETNVLVLAGAGPIGLVTLLAARAFGAPRIVVDVDDYRLSVAKDLGADDIVKVSIN 227
MdSDH3 ANVGPETTVLIVGAGPIGLVSVLAARAFGAPRIVVDVDDYRLSVAKDLGADGTVKVSRK 240
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

AtSDL  LEDVGSEVEQIQKAMGSNI DVT FDCAGFNKTMSTAL AATRCGKVKVCLVGMGHGIMTVPLT 296
VvSDH1 IQDVAAEVVQIHKAMGARVDVS FDCAGFDKTMSTAL SATSTGKVKVCLVGMGHNEMTVPLT 297
LeSDH  IQDVATDIENIQKAMGGGI DAS FDCAGFNKTMSTAL GATRPGKVKVCLVGMGHHEMTVPLT 287
MdSDH3 MEDLDDEVAKIKE TMGAEV DVT FDCVGFNKTMS TGLNATRPGKVKVCLVGMGHSMMTVPLT 300
:*:* :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

AtSDL  PAAAREVDVVGVF RYKNTWPLCLE FLTSGKIDVKPLITHRFGFSQKEVEDAFETSARGSN 356
VvSDH1 PAAAREVDVVGVF RYKNTWPLICIE FLRSVKIDVKPLITHRFGFSQREVEEAFETSARGGT 357
LeSDH  PAAAREVDVIGIFRYKNTWPLCLE FLRSVKIDVKPLITHRFGFSQEEVEEAFETSARGGD 347
MdSDH3 AAAAREVDVVGVF RCKNTWPLCLE FLRSVKIDVKPLITHRFGFTEKEVEEAFATSARGGD 360
.*****:.*:* ** *.:*:* ** *.:*:* ** *.:*:* ** *.:*:*

AtSDL  AIKVMFNL 364
VvSDH1 AIKVMFNL 365
LeSDH  AIKVMFNL 355
MdSDH3 AIKVMFNL 368
*****

```

Fig 6. Alineamiento mostrando sitios conservados en SDHs vegetales. AtSDL - posible SDH en Arabidopsis, VvSDH1 - posible SDH en uva, LeSDH - SDH de tomate y MdSDH3 - isoforma 3 de SDH en manzana. Sitio catalítico putativo de unión a zinc en verde, sitio estructural putativo de unión a zinc en rojo y el sitio común para los alcoholes deshidrogenasa cuya secuencia aminoacídica es: G-H-E-x-{EL}-G-{AP}-x(4)-[GA]-x(2)-[IVSAC], subrayado. Asterisco (*) muestra identidad entre las columnas, Dos puntos ";" una sustitución conservada. Un punto "." una sustitución semiconservada.

4.3 Clonamiento de VvSDH1 en el vector de entrada pCR8

Para comenzar los estudios sobre la función de VvSDH1 en vides, se clonó su cDNA en el vector de entrada, pCR8. Para ello, primero se determinó la integridad de las muestras de RNA mediante gel de agarosa (resultados no mostrados, sección 3.1.3; RNA3, RNA4 y RNA5; baya en el momento de

pinta, hoja joven y baya 4 semanas post pinta, respectivamente). Luego, éstas fueron utilizadas como molde para realizar una reacción de RT-PCR, utilizando el partidador oligo AP para la transcripción reversa (sección 3.3) y los partidores VvSDHSpeF y VvSDHBstR (sección 3.4.1) para la amplificación de *VvSDHI* mediante PCR a partir del cDNA obtenido en el paso anterior. Se utilizaron estos partidores dirigidos contra las regiones UTR, donde la similitud de secuencia con las otras 3 candidatas de SDH de vid era menor. De esta manera habría una mayor posibilidad de amplificar la secuencia de interés.

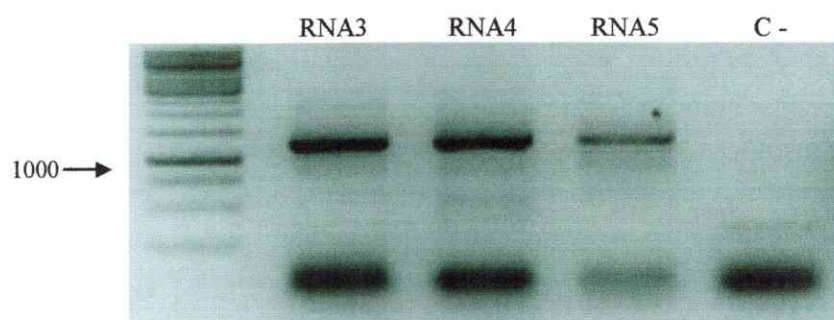


Fig 7. Amplificación de *VvSDHI* a partir de cDNA total. Gel de agarosa 1% corrido por aprox. 30 min a 90 V. Carril 1: 5 μ l de ladder 1 kb. RNA3, RNA4 y RNA5 3 μ l de producto de PCR utilizando partidores VvSDHSpeF y VvSDHBstR y como templado cDNA de baya en el momento de la pinta, de hoja joven y 4 semanas post pinta respectivamente. Carril 5: Control negativo agua.

Se separaron los productos de la reacción en un gel de agarosa (Fig 7), se purificó la banda de interés de ~1200 pb (sección 3.5.1), se ligó con el vector pCR8 (sección 3.5.2) y se transformaron células de *E. coli* mediante electroporación (sección 3.5.3). Las células transformadas fueron crecidas en placas LB, utilizando el antibiótico espectomicina como medio de selección. Se escogió 30 colonias y se realizó PCR de colonia, utilizando los partidores VvSDHSpeF y VvSDHBstR (sección 3.5.4; datos no mostrados). Se observó un fragmento del tamaño esperado ~1.200 pb en 21 de las 30 colonias. Luego se analizaron minipreparaciones de 4 de ellas (3.2(4), 4.2(2), 4.2(3), 5.2(3)) mediante PCR para amplificar *VvSDHI* (datos no mostrados), un ensayo de digestión enzimática diagnóstica (datos no mostrados) y secuenciación (Fig. 8), determinando que todas poseen *VvSDHI* clonado.

```

VvSDH4_2_2    MGKGGMSQDGDGRGEGEENMAAWLLGVNNLKIQPFILPPLGPHDVRVRMKAVGICGSDVH 60
VvSDH5_2_3    MGKGGMSQDGDGRGEGEENMAAWLLGVNNLKIQPFILPPLGPHDVRVRMKAVGICGSDVH 60
VvSDH4_2_3    MGKGGMSQDGDGRGEGEENMAAWLLGVNNLKIQPFILPPLGPHDVRVRMKAVGICGSDVH 60
VvSDH         MGKGGMSQDGDGRGEGEENMAAWLLGVNNLKIQPFILPPLGPHDVRVRMKAVGICGSDVH 60
VvSDH3_2_4    MGKGGMSQDGDGRGEGEENMAAWLLGVNNLKIQPFILPPLGPHDVRVRMKAVGICGSDVH 60
               : ..... : ..... : ..... : ..... : .....

VvSDH4_2_2    YLKKLRCADFIVKEPMVIGHECAGIIDEVGTQVSLVPGDRVALEPGISWRQLLKEGR 120
VvSDH5_2_3    YLKKLRCADFIVKEPMVIGHECAGIIDEVGTQVSLVPGDRVALEPGISWRQLLKEGR 120
VvSDH4_2_3    YLKKLRCADFIVKEPMVIGHECAGIIDEVGTQVSLVPGDRVALEPGISWRQLLKEGR 120
VvSDH         YLKKLRCADFIVKEPMVIGHECAGIIDEVGTQVSLVPGDRVALEPGISWRQLLKEGR 120
VvSDH3_2_4    YLKKLRCADFIVKEPMVIGHECAGIIDEVGTQVSLVPGDRVALEPGISWRQLLKEGR 120
               : ..... : ..... : ..... : ..... : .....

VvSDH4_2_2    YNLPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCFKLPDNVSLIEGAMCEPLSVGVHACRRADI 180
VvSDH5_2_3    YNLPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCFKLPDNVSLIEGAMCEPLSVGVHACRRADI 180
VvSDH4_2_3    YNLPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCFKLPDNVSLIEGAMCEPLSVGVHACRRADI 180
VvSDH         YNLPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCFKLPDNVSLIEGAMCEPLSVGVHACRRADI 180
VvSDH3_2_4    YNLPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCFKLPDNVSLIEGAMCEPLSVGVHACRRADI 180
               : ..... : ..... : ..... : ..... : .....

VvSDH4_2_2    GPESNVLVMGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVIVDVDDYRLSVAKDLGADEIVKVSTNIQD 240
VvSDH5_2_3    GPESNVLVMGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVIVDVDDYRLSVAKDLGADEIVKVSTNIQD 240
VvSDH4_2_3    GPESNVLVMGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVIVDVDDYRLSVAKDLGADEIVKVSTNIQD 240
VvSDH         GPESNVLVMGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVIVDVDDYRLSVAKDLGADEIVKVSTNIQD 240
VvSDH3_2_4    GPESNVLVMGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVIVDVDDYRLSVAKDLGADEIVKVSTNIQD 240
               : ..... : ..... : ..... : ..... : .....

VvSDH4_2_2    VAEVVQIHKAMGARVDVSFDCAGFDKTMSTALSATSIGGKVCVLMGMHNETVPLTPAA 300
VvSDH5_2_3    VAEVVQIHKAMGARVDVSFDCAGFDKTMSTALSATSIGGKVCVLMGMHNETVPLTPAA 300
VvSDH4_2_3    VAEVVQIHKAMGARVDVSFDCAGFDKTMSTALSATSIGGKVCVLMGMHNETVPLTPAA 300
VvSDH         VAEVVQIHKAMGARVDVSFDCAGFDKTMSTALSATSIGGKVCVLMGMHNETVPLTPAA 300
VvSDH3_2_4    VAEVVQIHKAMGARVDVSFDCAGFDKTMSTALSATSIGGKVCVLMGMHNETVPLTPAA 300
               : ..... : ..... : ..... : ..... : .....

VvSDH4_2_2    AREVDVVGVFVRYKNTWPICIEFLRSVKIDVKPLITHRFSGFVSQREVEEAFETSARGGTAIK 360
VvSDH5_2_3    AREVDVVGVFVRYKNTWPICIEFLRSVKIDVKPLITHRFSGFVSQREVEEAFETSARGGTAIK 360
VvSDH4_2_3    AREVDVVGVFVRYKNTWPICIEFLRSVKIDVKPLITHRFSGFVSQREVEEAFETSARGGTAIK 360
VvSDH         AREVDVVGVFVRYKNTWPICIEFLRSVKIDVKPLITHRFSGFVSQREVEEAFETSARGGTAIK 360
VvSDH3_2_4    AREVDVVGVFVRYKNTWPICIEFLRSVKIDVKPLITHRFSGFVSQREVEEAFETSARGGTAIK 360
               : ..... : ..... : ..... : ..... : .....

VvSDH4_2_2    VMFNL 365
VvSDH5_2_3    VMFNL 365
VvSDH4_2_3    VMFNL 365
VvSDH         VMFNL 365
VvSDH3_2_4    VMFNL 365
               * * * *

```

Fig 8. Secuencias de clones pCR8-VvSDH1. Secuencia perteneciente a 4 clones de pCR8-VvSDH1. Se observa 6, 1, 3 y 3 cambios aminoacídicos (destacados en azul) en los clones 3.2.4, 4.2.2, 4.2.3 y 5.2.3, respectivamente. VvSDH: secuencia en bases de datos (variedad Pinot noir). Asterisco (*) muestra identidad entre las columnas, Dos puntos ";" una sustitución conservada. Un punto "." una sustitución semiconservada. Sitio catalítico putativo de unión a zinc destacado en amarillo, sitio estructural putativo de unión a zinc en verde y el sitio común para los alcoholes deshidrogenasa encerrado en una caja. Los colores en las letras muestran el tipo de aminoácido. Rojo; hidrofóbico, aromático. Azul: ácido. Magenta: básico. Verde: hidroxilo, amina, amidas básicas.

Sin embargo, lamentablemente todos los clones poseen cambios en al menos un aminoácido (destacado en azul en Fig 8). A pesar de lo anterior, uno de los clones (VvSDH4.2.2) posee un solo

cambio de Metionina (M, hidrofóbico) a Treonina (T, hidrofílico) en el aminoácido 362. De acuerdo a los antecedentes bibliográficos de la SDH humano (Pauly et al, 2003) y los resultados experimentales en *Arabidopsis* (Mandujano, 2010), algunos aminoácidos cerca del extremo C terminal de esta enzima forman parte del sitio catalítico. Tomando en cuenta lo anterior, se decidió corregir esta mutación mediante partidores diseñados con este fin. De esta manera se diseñaron los partidores VvSDHBst33 y VvSDHSpe52 (Tabla I), los cuales fueron usados para amplificar *VvSDHI* a partir del clon VvSDH4.2.2, utilizando la enzima Pfu (sección 3.4.2), para intentar a corregir el cambio aminoacídico que se había generado. Al igual como se realizó anteriormente, se purificó el fragmento de interés desde el gel, se ligó con pCR8 y se transformaron células *E. coli* mediante electroporación. Se realizaron preparaciones de DNA plasmidial de 4 colonias (6β, 8β, 9β y 10β) y se verificó la presencia de *VvSDHI* mediante PCR (sección 3.4.2; datos no mostrado), como también la orientación del inserto en pCR8 mediante un ensayo de digestión con *Xba*I (sección 3.5.5, Fig 9). En este paso la orientación del inserto resulta ser de vital importancia, debido a que el posterior clonamiento en el vector de expresión es mediante la tecnología Gateway, en la cual se genera la entrada del inserto de interés en el vector de destinación mediante recombinación de los sitios attL1 y attL2 presentes en el vector de entrada pCR8 con los sitios attR1 y attR2 presentes en el vector de destinación. Es por ello que se debe verificar que el inserto en el vector pCR8 se encuentra en sentido respecto a attL1 y attL2, asegurando de esta manera que al insertarse en el vector de expresión también se encontrará en sentido respecto al promotor, permitiendo la adecuada transcripción del gen de interés durante la expresión transitoria (sección 3.6.1).

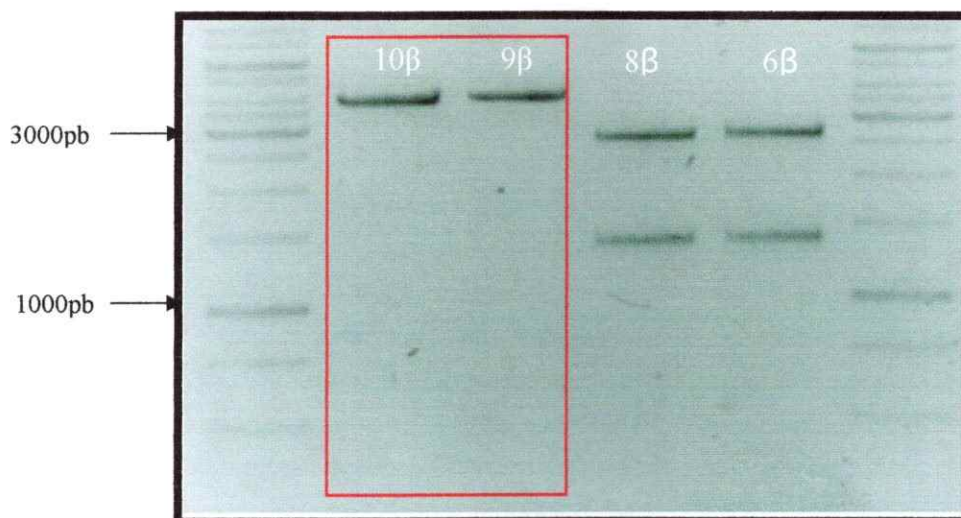


Fig 9. Gel de agarosa mostrando resultado de digestión con XbaI de clones pCR8-*VvSDHI*: segunda clonación. Carril 1 y 6: 5 μ l de marcador 1 kb. clones 10 β , 9 β , 8 β y 6 β (10 μ l en todos los casos), todos tratados con XbaI. Se observa que en los clones 10 β y 9 β se libera una banda de aproximadamente 4000 pb, mientras que en los clones 8 β y 6 β se liberan dos bandas: uno de mayor tamaño de entre 2500-3000 pb y otra de menor tamaño levemente menor que 1500 pb. Se concluye que se clonó exitosamente el cDNA de interés en pCR8 en todos los casos, sin embargo mientras que en los clones 10 β y 9 β se insertó en sentido respecto a las secuencias attL1 y attL2, en los clones 8 β y 6 β se insertó en el sentido contrario.

XbaI digiere dos veces en pCR8-*VvSDHI*, una vez dentro de *VvSDHI* a 1094 pb desde el codón de inicio (justo 5' del codón de término) y una vez fuera de *VvSDHI*, en el vector pCR8 a 229 pb desde el inicio del sitio attL2. De tal manera, si el inserto se encuentra en sentido respecto a los sitios attL1 y 2, al someter el vector a un ensayo de digestión con la enzima XbaI debiera de liberarse dos bandas, una de 3825 pb y otra de 233 pb (Fig 10A). Este resultado fue observado para los clones 10 β y 9 β (Fig 9). Debido al pequeño tamaño de la banda de 233 pb en comparación a la banda de 3825 pb, ésta requeriría de una gran concentración de agarosa para hacer posible su detección, es por ello que se cree y se explica porque no es posible observarla en la Fig 9. Por otra parte, en el caso contrario si el inserto *VvSDHI* se hubiese clonado en sentido contrario respecto a los sitios attL1 y 2, se esperaría ver dos bandas, una de 1323 pb y otra de 2735 pb (Fig 10B), resultado observado para los clones 6 β y 8 β (Fig 9).

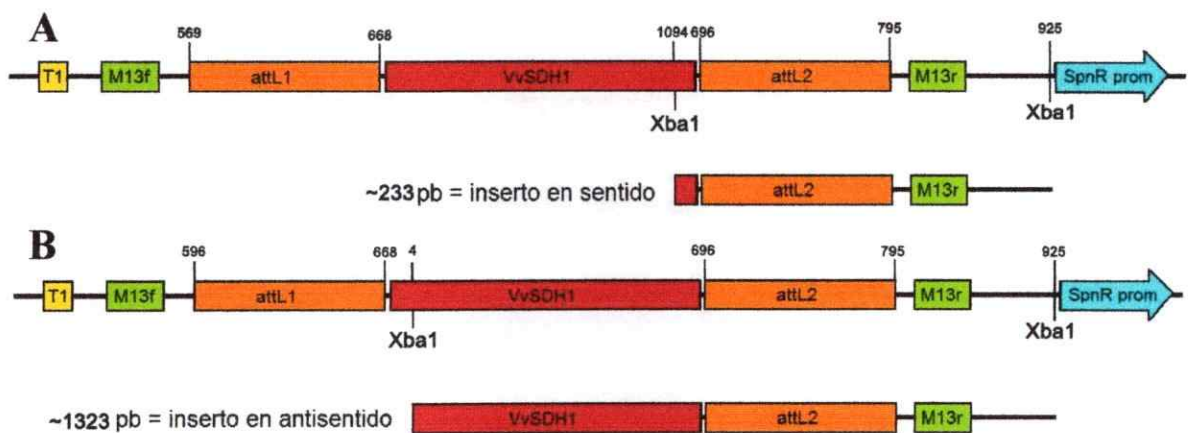


Fig 10. Esquema de los sitios de corte de la enzima de restricción Xba1 en pCR8-VvSDH1. Se esquematiza los sitios de corte de la enzima Xba1 en caso de que el fragmento se haya insertado en sentido (A) y en antisentido (B) respecto a los sitios attL1 y attL2 presentes en el vector pCR8. Si el fragmento se insertó en sentido respecto a los sitios de recombinación al digerir con Xba1, se liberaría una banda de 233 pb, por lo que en el gel de agarosa se esperaría ver dos bandas (la banda correspondiente al fragmento de 233 pb y el resto del vector correspondiente a 3825 pb). En el caso contrario, si el fragmento se insertó en antisentido respecto a los sitios de recombinación, se liberaría dos fragmentos, por lo que en el gel de agarosa se esperaría observar una banda correspondiente a 1323 pb y el resto del vector correspondiente a 2735 pb.

Muestras de los dos clones en sentido fueron secuenciados para verificar si el cambio aminoacídico presente en el clon VvSDH4.2.2 había sido efectivamente corregida (Fig 11). Tras la secuenciación se observó que la mutación había sido corregida de manera exitosa y el clon 9β fue escogido para ser utilizado en los experimentos posteriores.


```

VvSDH4_2_2 MGKGGMSQGDGRGEGEENMAAWLLGVNNLKIQPFILPPLGPHDVRVRMKAVGICGSDVH 60
9B MGKGGMSQGDGRGEGEENMAAWLLGVNNLKIQPFILPPLGPHDVRVRMKAVGICGSDVH 60
VvSDH MGKGGMSQGDGRGEGEENMAAWLLGVNNLKIQPFILPPLGPHDVRVRMKAVGICGSDVH 60
*****.*****

VvSDH4_2_2 YLKKLRCADFTVKEPMVIGHECAGIIDEVGTQVKSLVPGDRVALEPGISCWRCQLCKEGR 120
9B YLKKLRCADFTVKEPMVIGHECAGIIDEVGTQVKSLVPGDRVALEPGISCWRCQLCKEGR 120
VvSDH YLKKLRCADFTVKEPMVIGHECAGIIDEVGTQVKSLVPGDRVALEPGISCWRCQLCKEGR 120
*****.*****

VvSDH4_2_2 YNLCPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCKFLPDNVSLEEGAMCEPLSVGVHACRRADI 180
9B YNLCPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCKFLPDNVSLEEGAMCEPLSVGVHACRRADI 180
VvSDH YNLCPEMKFFATPPVHGSLANQVVHPADLCKFLPDNVSLEEGAMCEPLSVGVHACRRADI 180
*****.*****

VvSDH4_2_2 GPESNVLVMGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVIVDVEDDYRLSVAKDLGADEIVKVSSTNIQD 240
9B GPESNVLVMGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVIVDVEDDYRLSVAKDLGADEIVKVSSTNIQD 240
VvSDH GPESNVLVMGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVIVDVEDDYRLSVAKDLGADEIVKVSSTNIQD 240
*****.*****

VvSDH4_2_2 VAEVVQIHKAMGARVDVSFD CAGFDKTMSTALSATSTGGKVCLVGMGHNEMTVPLTPAA 300
9B VAEVVQIHKAMGARVDVSFD CAGFDKTMSTALSATSTGGKVCLVGMGHNEMTVPLTPAA 300
VvSDH VAEVVQIHKAMGARVDVSFD CAGFDKTMSTALSATSTGGKVCLVGMGHNEMTVPLTPAA 300
*****.*****

VvSDH4_2_2 AREVDVVGFRYKNTWPICTIEFLRSGKIDVKPLITHRFGFSQREVEEAFETSARGGTAIK 360
9B AREVDVVGFRYKNTWPICTIEFLRSGKIDVKPLITHRFGFSQREVEEAFETSARGGTAIK 360
VvSDH AREVDVVGFRYKNTWPICTIEFLRSGKIDVKPLITHRFGFSQREVEEAFETSARGGTAIK 360
*****.*****

VvSDH4_2_2 VTFNL 365
9B VMFNL 365
VvSDH VMFNL 365
* * * *

```

Fig 11. Secuencias de clones pCR8-*VvSDH1*. *VvSDH4.2.2*, clon pCR8-*VvSDH1* con un único cambio de aminoácido en hacia el C-terminal. **9B**, clon pCR8-*VvSDH1* con el cambio de aminoácido presente en *VvSDH4.2.2* corregida. **VvSDH** secuencia en bases de datos (variedad Pinot noir). Asterisco (*) muestra identidad entre las columnas, Un punto "." una sustitución semiconservada. En amarillo se destaca el cambio de aminoácido corregida mediante partidores y en verde las diferencias atribuidas a diferencias de variedad. Las diferencias atribuidas a diferencia de variedad fueron identificadas como aquellos aminoácidos que son distintos entre la secuencia en la base de dato y los clones secuenciados (9B, 3.2.4, 4.2.2, 4.2.3 y 5.2.3), pero que se conservaba entre los clones. Además se destaca el sitio catalítico putativo de unión a zinc en letras verde, sitio estructural putativo de unión a zinc en letras rojas y el sitio común para los alcoholes deshidrogenasa, cuya secuencia aminoacídica estrictamente conservados es **G-H-E-x-{EL}-G-{AP}-x(4)-[GA]-x(2)-[IVSAC]**, subrayado. Se observa que no se ha producido cambios en ninguno de los sitios conservados.

4.4 Clonamiento de *VvSDH1* en el vector de sobreexpresión pGWB2 y transformación de *A. tumefaciens*

Se clonó *VvSDH1* en el vector binario de sobreexpresión pGWB2 mediante recombinación homóloga con pCR8-*VvSDH1* (clon 9β) (sección 3.6.1) y se transformaron células *E. coli*. pGWB2 permite la sobreexpresión del inserto mediante el promotor constitutivo fuerte CaMV35S, sin agregar ningún epítipo (Nakagawa et al 2007; Fig 3). Además, este vector binario otorga resistencia a kanamicina en bacterias y kanamicina e higromicina en plantas.

Se realizaron preparaciones de DNA plasmidial de *E. coli* transformadas con el producto de la recombinación, las cuales fueron sujetas a 3 ensayos:

1. PCR que amplifica sólo el inserto *VvSDH1* (PCR correspondiente a la sección 3.5.4, dato no mostrado), el cual comprueba la presencia del gen de interés en el vector pGWB2.
2. PCR que amplifica desde el el promotor CaMV35S hasta el extremo 3' de *VvSDH1* (sección 3.6.3, Fig 12), el cual también comprueba presencia del gen de interés en pGWB2, pero además la orientación del gen de interés. Si el gen de interés se encuentra en sentido con respecto al promotor CaMV35S se espera una banda de 1543 pb, mientras que si el gen *VvSDH1* se encuentra en sentido contrario se amplificaría una banda de un tamaño mucho menor.
3. Ensayo de digestión enzimática (3.6.4, Fig 14) con XbaI, el cual al igual que el PCR del punto anterior, determina la presencia y la orientación del gen de interés en el vector pGWB2. En este caso se esperaban dos fragmentos: 1158 pb y 15561 pb en caso de que el inserto se encuentra en la misma orientación que el promotor CaMV35S y 59 pb y 16.660 pb en caso contrario (Fig. 13).

Los resultados muestran que los 4 clones presentaban el inserto en sentido respecto al promotor CaMV35S (Fig 12 y 14). Sin embargo, este resultado es más claro para el caso de los clones pG1 y pG4, en donde se puede observar una mayor certeza de los resultados. En cambio en el caso de los clones pG2 y pG3, tanto para el ensayo de PCR como en el ensayo de digestión, se observaron la presencia de bandas inesperadas, y no fue posible explicar la presencia y/o el origen de ellas. Por lo tanto, sólo los vectores pGWB2-*VvSDH1* provenientes de los clones pG1 y pG4 fueron utilizados para transformar *A. tumefaciens* GV3101 (sección 3.7). Luego, se realizó una preparación de DNA plasmidial de colonias de *A. tumefaciens* transformados y se verificó por medio de la amplificación de *VvSDH1* por PCR que la transformación fue exitosa (sección 3.7.1; datos no mostrados).

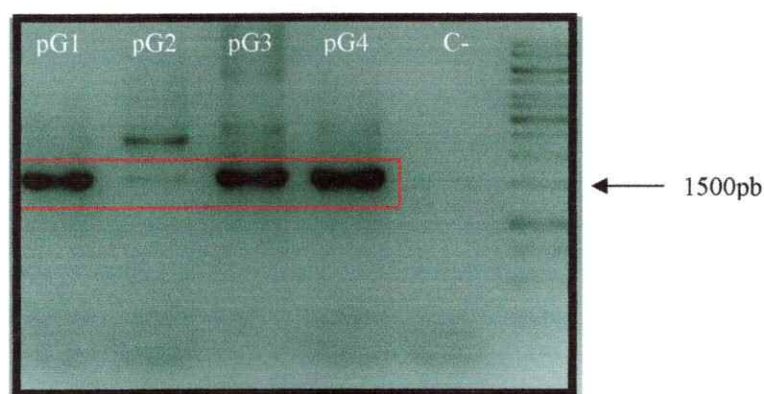


Fig 12. Gel de agarosa mostrando resultado de la amplificación de 35S-*VvSDH1* mediante PCR. Clones pG1, pG2, pG3 y pG4, respectivamente. C-: Control negativo PCR usando agua como templado. Carril 6: 5 μ l de marcador 1 kb. Se observa la banda esperada de aproximadamente 1500 pb para los clones pG1, pG3 y pG4. En el clon pG2 se observa una banda de aprox. 1500 pb muy leve, además se observa una banda inespecífica de aprox 2500 pb. En el clon pG3 también se observan dos bandas inespecíficas de mayor tamaño que la banda esperada. No fue posible determinar el origen de estas bandas inespecíficas, razón por la cual se desecharon los clones pG2 y pG3 y sólo se continuó trabajando con los clones pG1 y pG4.

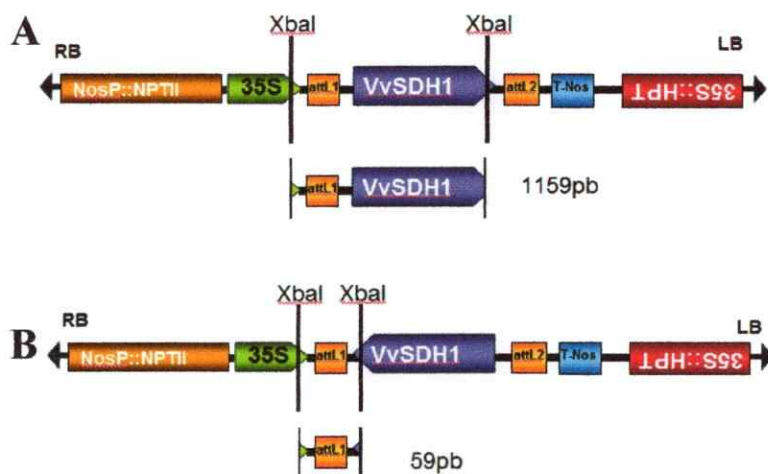


Fig 13. Esquema de los sitios de corte de la enzima de restricción Xba1 en el vector pGWB2-*VvSDH1*. Se esquematiza los sitios de corte de la enzima Xba1 en caso de que el gen *VvSDH1* se haya insertado en sentido (A) y en antisentido (B) con respecto al promotor CaMV35S. Si el gen de interés se insertó en sentido respecto al promotor, al digerir con Xba1 se liberaría un fragmento de 1159 pb, de tal manera que, en el gel de agarosa se esperaría observar dos bandas, uno de 1159 pb y el resto del vector que corresponde a 15.561 pb. En el caso contrario, si el gen de interés se insertó en antisentido respecto al promotor, se liberaría una banda de 59 pb y en el gel de agarosa se observarían dos bandas, una correspondiente a 59 pb y otra al resto del vector de 16.660pb.

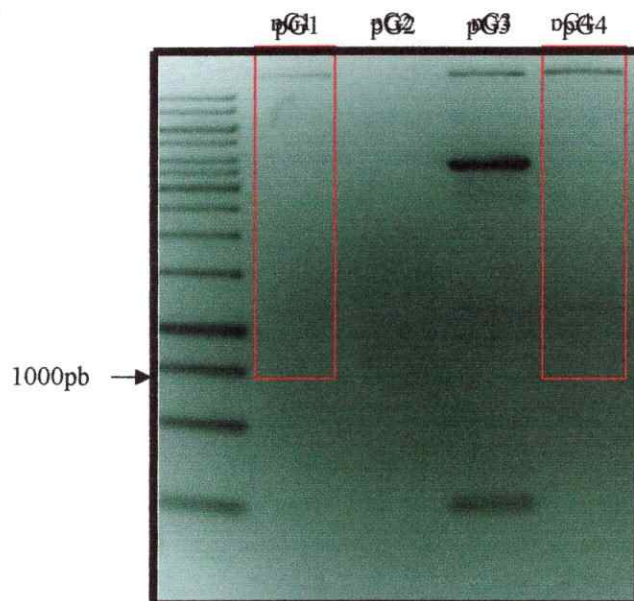


Fig 14. Gel de agarosa mostrando resultado de digestión con Xba1 de clones de pGWB2-*VvSDH1*. Carril 1: 5 μ l de marcador 1 kb. Clones pG1, pG2, pG3 y pG4 (10 μ l en todos los casos), tratados con Xba1. Se observa para los clones pG1 y pG4 una leve banda superior a 1000 pb el cual podría corresponder a la banda de 1159 pb esperada en el caso de que el gen de interés se encuentre en sentido respecto al promotor. Además se observa una banda de gran tamaño en la parte superior del gel, el cual podría representar el fragmento de 15.561 pb esperado. En el caso del clon pG3 también se observan las dos bandas ya mencionadas, sin embargo también es posible observar una banda de aproximadamente 4000 pb. No fue posible explicar el origen y/o presencia de esta banda. En el clon pG2, el ensayo no fue exitoso y no se observa ninguna banda en el gel. Debido a que para los clones pG2 y pG3 los resultados no fueron exitosos, éstos fueron descartados y se continuó trabajando sólo con los clones pG1 y pG4.

4.4.1 Transformación transitoria de hojas de tabaco con el vector pGWB2-*VvSDH1* y análisis de expresión de *VvSDH1*.

En vista de que en el vector pGWB2-*VvSDH1*, el gen de interés, *VvSDH1* comandado por el promotor CaMV35S, se encuentran entre los bordes LB y RB del T-DNA, una agroinfiltración con *A.tumefaciens* cepa GV3101 transformado con pGWB2-*VvSDH1* permite transferir el gen de interés al genoma de las células del tejido infiltrado. Debido a que el *cassette* de T-DNA (con el gen de interés) sólo se inserta en el genoma de las células del tejido infiltrado, las cuales en este caso corresponden a células somáticas (no germinales), esta transformación no es traspasada a la progenie, por lo que se trata de una transformación transitoria. De tal manera que para el análisis de la expresión del mRNA de *VvSDH1*, se realizaron transformaciones transitorias en tabaco con el vector pGWB2-*VvSDH1* (sección 3.8.1). Como control negativo de infiltración se utilizó el *A. tumefaciens* transformadas con el vector pCambia 1302 (CaMV35S-GFP) que posee el gen que codifica para una proteína verde fluorescente (GFP) comandada por el promotor CaMV35S.

Transcurrido los 4 días tras la agroinfiltración, se extrajo RNA total del tejido agroinfiltrado (sección 3.8.2), se determinó su integridad mediante gel de electroforesis (datos no mostrados) y se realizó una reacción de RT (sección 3.3) para la obtención de cDNA. Se comprobó la calidad del cDNA proveniente de esta reacción estudiando la expresión del gen *18S*, de expresión constitutiva, mediante PCR (sección 3.8.2) (Fig 15). Para ello, se diseñaron partidores específicos (Tabla I, sección 3.2) para amplificar el gen *18S* en plantas, los cuales deberían amplificar un fragmento de aproximadamente 200 pb. La ausencia de dicha banda en las muestras sin RT demuestran que las muestras de RNA no poseían trazas de DNA genómico. Además, la presencia de la banda de ~200 pb en las muestras tratadas con RT demuestra que el RNA y consecuentemente los cDNA obtenidos eran de buena calidad (Fig 15).

Una vez que se obtuvieron cDNA de los tejidos infiltrados de buena calidad, se procedió a determinar si el vector pGWB2-*VvSDHI* es funcional transcripcionalmente. Para ello se amplificó mediante PCR un fragmento interno de *VvSDHI* de 758 bp utilizando partidores internos específicos (Vv_int_2 F y Vv_int_2 R; sección 3.4.3) (Fig 16). Se obtuvo la banda esperada para ambas muestras, pG1 y pG4, siendo la presencia de la banda más evidente para pG4. Por otra parte la ausencia de la banda de ~700 pb en el control de infiltración (pCambia 1302 (CaMV35S-GFP)), demuestra que la presencia de la banda en las muestras se debe única y exclusivamente al éxito de la infiltración con el vector pGWB2-*VvSDHI*, el cual es transcripcionalmente funcional.

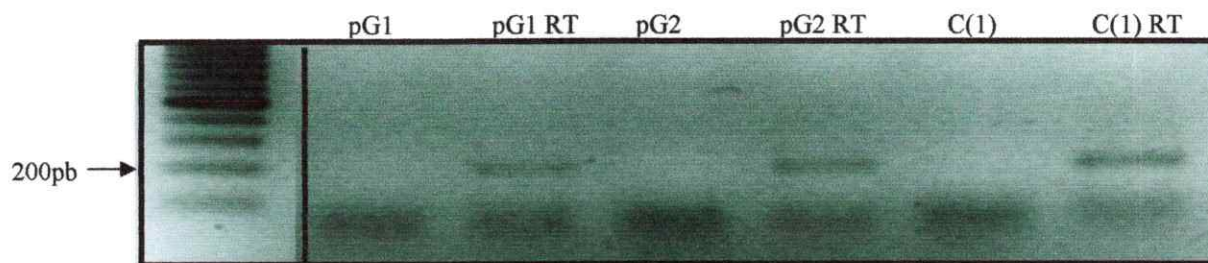


Fig 15. Gel de agarosa mostrando resultado de PCR 18S. Carril 1: 5 μ l de marcador 100 pb. Amplificación de *18S* utilizando como molde cDNA provenientes de RT con (pG1 RT, pG4 y C(1) RT) y sin (RTpG1, pG4 y C(1)) transcriptasa reversa. El cDNA fue obtenido a partir de RT con muestras de RNA de tejido transformado con vector pGWB2-*VvSDHI* (pG1, pG1RT, pG4 y pG4RT) y vector pCambia 1302 (C(1) y C(1)RT), este ultimo correspondiendo al control de infiltración. Se observa una banda de ~200 pb para las muestras tratadas con RT, el cual demuestra la ausencia de DNA genómico y la buena calidad del cDNA obtenido.

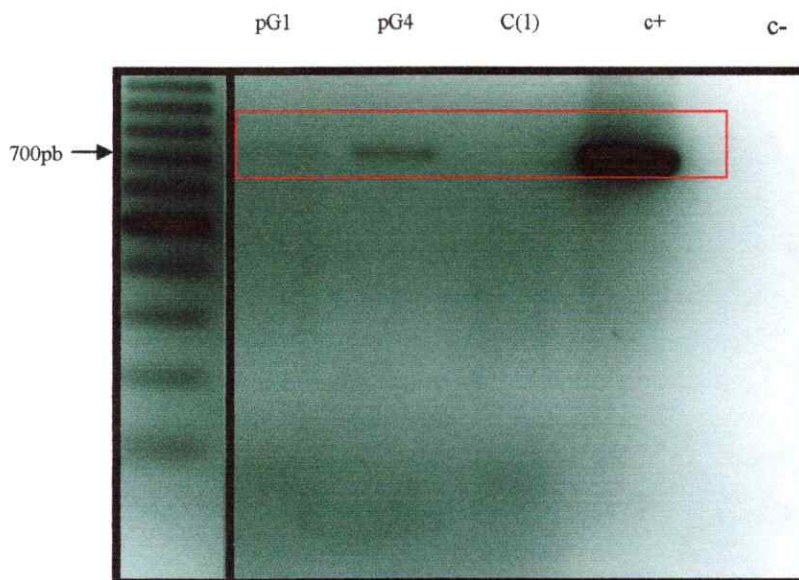


Fig 16. Gel de agarosa mostrando resultado de PCR de un fragmento interno de *VvSDH1*. Carril 1: 5 μ l de marcador 100 pb. En pG1 y pG4, fragmento interno de *VvSDH1* de ~700 pb (15 μ l de producto de PCR en cada caso), C(1) producto de PCR utilizando como templado cDNA de tejido transformado con pCambia1302 (control de infiltración). C+ de PCR utilizando como templado vector pCR8-*VvSDH1*. C- de PCR utilizando como templado agua. La presencia de la banda de ~700 pb en las muestras (pG1 y pG4) y la ausencia de la banda en C(1), demuestra que el vector pGWB2-*VvSDH1* es transcripcionalmente funcional.

4.5 Análisis de la localización subcelular de *VvSDH1*

Se ha determinado que la localización de SDH en manzana es citoplasmática y en cloroplasto (Wang et al 2009). Con el propósito de analizar la localización de *VvSDH1*, se realizaron ensayos *in silico* e *in vivo*.

4.5.1 Estudios bioinformáticos

En primer lugar se realizaron estudios *in silico* utilizando programas capaces de predecir la ubicación subcelular de una proteína a partir de la secuencia aminoacídica, ya sea por alineamiento y cercanía a proteínas conocidas, propiedades fisicoquímicas y/o la presencia de péptidos señal de exportación en la vía secretoria, o péptidos de destinación mitocondrial o cloroplástica (Tabla IV).

Tabla IV. Resumen de la ubicación subcelular de VvSDH1 predicho por diversas herramientas de libre acceso en internet. Diversas herramientas en línea fueron utilizadas para determinar *in-silico* la localización subcelular de VvSDH1. Cada herramienta poseía distintos parametros propios del algoritmo utilizado por el programa dado. En la columna "Resultados" se muestra si la secuencia VvSDH1 posee o no un dominio de transmembrana, péptido señal o la localización subcelular determinado como la más probable, de acuerdo a la comparación con bases de datos de proteínas conocidas.

Herramienta en línea	Descripción del método	Resultados
SVMtm	Predicción de dominios trans-membranas (DTM)	Sin DTM
TMHMM	Predicción de dominios trans-membrana	Sin DTM
PrediSi	Predicción de péptidos-señales en eucariontes	Sin péptido señal
SignalP	Predicción de péptidos-señales en eucariontes.	Sin péptido señal
iPSORT	Localización sub-celular en plantas analizando la secuencia N-terminal	Sin péptido señal
The Protein Prowler	Localización sub-celular en eucariontes analizando la secuencia N-terminal	Citoplasmática
SubLoc	Localización sub-celular en eucariontes	Citoplasmática
CELLO V2.5	Localización sub-celular en eucariontes	Citoplasmática
SLPFA	Basado en composición amino acídica y alineamiento de secuencia	Citoplasmática
ESLpred	Predicción mediante alineamientos y propiedades fisicoquímicas	Citoplasmática
Predotar	Localización sub-celular en plantas analizando la secuencia N-terminal	Citoplasmática
WoLF-PSORT	Predicción basado correlación con secuencias conocidas y presencia de péptido señal.	Citoplasmática
YLoc-HighRes	Localización sub-celular en plantas	Citoplasmática
TargetP	Localización sub-celular en plantas	Citoplasmática
SherLoc2	Localización subcelular basado en resultados de MultiLoc2 y EpiLoc	Citoplasmática

Los programas utilizados arrojaron como resultado más probable la ubicación citoplasmática para la proteína VvSDH1 (Tabla IV). Además el programa YLoc indica que la proteína VvSDH1 posee un patrón típico de proteínas citoplasmáticas, presente en 49% de las proteína citoplasmáticas en la base de datos Prosite y un 56% de las proteínas citoplasmáticas presentes en la base de datos del consorcio GO (Gene Ontology).

4.5.2 Construcción del vector pMDC44-*VvSDH1*

En paralelo, se construyó el vector pMDC44-*VvSDH1* mediante recombinación homóloga de pCR8-*VvSDH1* con el vector pMDC44. Este vector permite fusionar GFP al extremo N terminal del inserto, generando una proteína GFP-*VvSDH1*, cuya expresión se encuentra controlado por el promotor constitutivo fuerte CaMV35S (Curtis et al 2003). Esta proteína de fusión permitió determinar mediante microscopía de fluorescencia la distribución de *VvSDH1*, y validar experimentalmente los resultados bioinformáticos (sección 4.4.1).

Al igual que para la construcción del vector pGWB2-*VvSDH1*, se utilizó el sistema Gateway. En este caso se recombinaron los vectores pCR8-*VvSDH1* con pMDC44, para dar lugar al vector pMDC44 con el gen de interés clonado entre los bordes LB y RB del T-DNA (sección 3.6.1). Una vez obtenido el vector pMDC44-*VvSDH1* se transformaron células *E. coli* (sección 3.6.2) y se hicieron los ensayos de PCR y digestión pertinentes para verificar la presencia y el sentido del gen *VvSDH1* con respecto al promotor. Finalmente, se transformaron células *A. tumefaciens* (sección 3.7) para poder realizar la agroinfiltración y observar mediante microscopía de fluorescencia el tejido infiltrado y analizar la ubicación subcelular de la proteína GFP-*VvSDH1*.

Como ya fue mencionado, se realizaron ensayos de digestión (*Xba*I) y dos PCR utilizando como templado la preparación plasmidial de *E. coli* transformados con pGWB2-*VvSDH1* para comprobar la presencia y orientación de *VvSDH1* en pMDC44. En el caso de los PCR, se realizaron dos amplificaciones: el primero desde GFP hasta el extremo 3' de *VvSDH1* (Fig 17) en donde se esperaba un fragmento de 1823 pb y en el otro, sólo se amplificó *VvSDH1* (datos no mostrados).

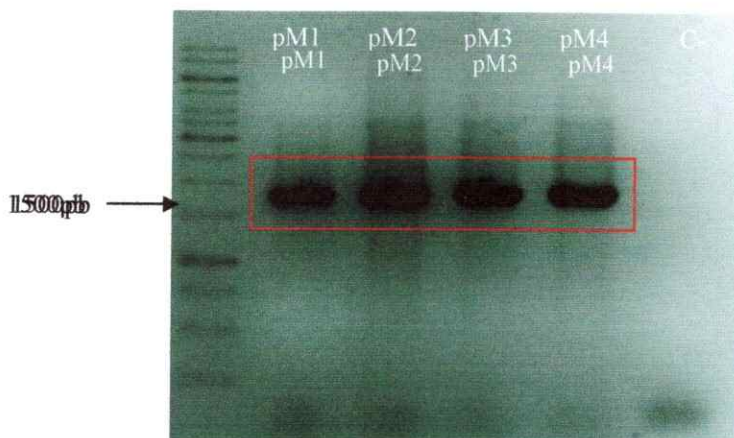


Fig 17. Gel de agarosa mostrando resultado de PCR para amplificar *GFP-VvSDH1* de pMDC44-*VvSDH1*. Carril 1: 5 μ l de marcador 1 kb. Amplificación de *GFP-VvSDH1* a partir de preparación plasmidial de *E.coli* transformadas con pMDC44-*VvSDH1* de clones pM1, pM2, pM3 y pM4. C-, control negativo PCR usando agua. Se observa una banda entre 1500-2000 pb para todas las muestras, menos C-.

Para el ensayo de digestión con *Xba*I, se utilizaron preparaciones plasmidiales de *E. coli* transformados con pGWB2-*VvSDH1* de las mismas 4 colonias utilizadas en el PCR. En este caso, si el gen de interés se encuentra en sentido con el promotor y con *GFP*, se esperaba 3 fragmentos: 9969 pb, 1907 pb y 79 pb, ya que la enzima *Xba*I corta una vez dentro del inserto y 2 veces en el resto del vector. Por el contrario, si el gen de interés se insertó contrario al promotor y *GFP*, entonces los tamaños de los fragmentos esperados son: 9969 pb, 1178 pb y 808 (Fig 18 y 19). Para poder observar con claridad y hacer la diferencia entre las bandas de 1907 pb (con *VvSDH1* en sentido respecto al promotor) y 1178 pb (con *VvSDH1* en sentido contrario al promotor), se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb. Además, para la observación de las bandas más pequeñas, particularmente la banda de 79 pb (con *VvSDH1* en sentido respecto al promotor), se requeriría de una mayor concentración de muestra para poder ser detectada (en comparación a la cantidad de muestra necesaria para observar una banda de aprox 1000 pb-2000 pb).

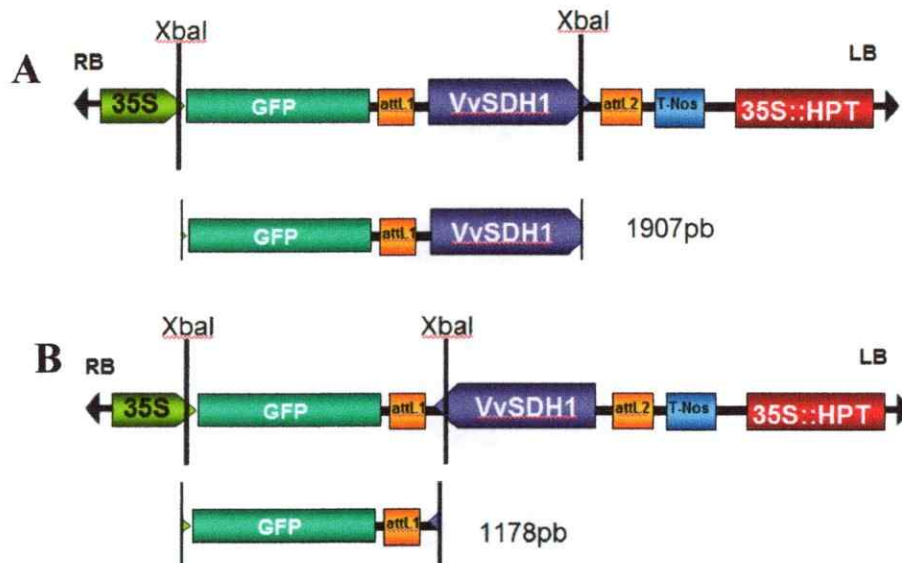


Fig 18. Esquema de los fragmentos esperados en la digestión con XbaI de clones de pMDC44-*VvSDH1*. Se esquematiza los sitios de corte de la enzima XbaI en caso de que el cDNA de *VvSDH1* se haya insertado en sentido (A) y en antisentido (B) respecto al promotor y a GFP. Si el gen de interés se insertó en sentido respecto al promotor y GFP, al digerir con XbaI se generan 3 cortes, uno dentro del gen de interés, otro en el promotor 35S liberando un fragmento 1907 pb y un tercer corte en el vector, dando lugar a dos fragmentos uno de 9969 pb y otro de 79 pb. De forma similar, si el fragmento se insertó en antisentido respecto al promotor y GFP, el corte dentro de gen de interés y el promotor libera un fragmento de 1178 pb, mientras que el tercer corte en el vector genera en este caso dos fragmentos de 9969 pb y 808 pb.

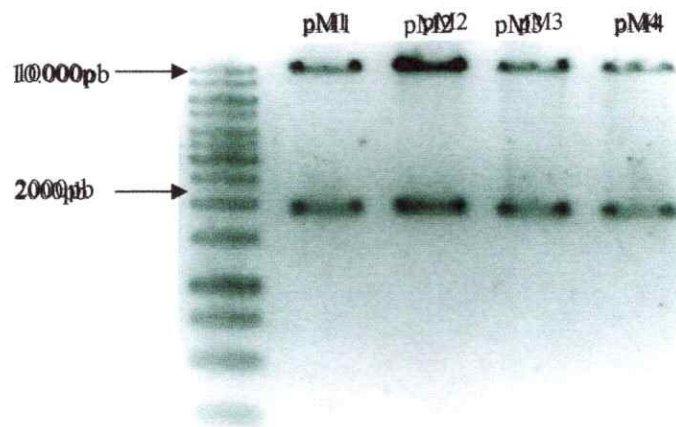


Fig 19. Gel de agarosa mostrando resultado de digestión con XbaI de clones de pMDC44-*VvSDH1*. Carril 1: 5 μ l de marcador 1 kb. Digestión con XbaI de la preparación plasmidial de clones pM1, pM2, pM3 y pM4 (10 μ l en todos los casos). Se observa una banda de aprox. 10.000 pb, el cual correspondería a la banda de 9.969 pb esperada. También se diferencia una segunda banda de aproximadamente 2000 pb, correspondiente al fragmento de 1901 pb esperado en el caso de que el gen de interés se insertó en sentido respecto al promotor. Debido a que el marcador de peso molecular es capaz de diferenciar fragmentos de 1000 pb, 1500 pb de 2000 pb, se concluye que los 4 clones poseen el gen de interés en sentido al promotor, ya que no se observa ninguna banda que podría representar al fragmento de 1178 pb liberado en el caso de que *VvSDH1* se haya insertado en sentido contrario al promotor y al *GFP*.

Los resultados muestran que los 4 clones de pMDC44-*VvSDHI* (pM1-4) analizados presentan el inserto en sentido con relación al promotor CaMV35S. Por lo tanto, los vectores provenientes de estos clones fueron utilizados para transformar *A. tumefaciens* cepa GV3101. Luego, se escogieron 4 colonias de *A. tumefaciens* transformadas con el vector pMDC44-*VvSDHI* y se realizó preparación de vector plasmidial, la cual fue utilizada para repetir el PCR desde el extremo 5' de *GFP* hasta el extremo 3' de *VvSDHI*, comprobando que las colonias de *A. tumefaciens* escogidas efectivamente eran transformantes (datos no mostrados). Una vez comprobado que eran transformantes, se utilizaron para la transformación transitoria de hojas de tabaco.

4.5.3 Transformación transitoria de hojas de tabaco y análisis por microscopia de fluorescencia

La proteína verde fluorescente (GFP) es ampliamente utilizada en plantas para monitorear la localización subcelular de una proteína de interés bajo un microscopio de fluorescencia (Haseloff y Amos, 1995). El constructo pMDC44-*VvSDHI* obtenido fue utilizado para transformar en forma transitoria hojas de tabaco (sección 4.8.1), las cuales fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia 4 días después (sección 4.8.3). Como controles positivos se utilizaron: pCambia 1302 (CaMV35S-GFP) y como control negativo, pCambia-AtSDLprom. Este último es un vector en el cual se ha reemplazado el GFP por la secuencia promotora de una posible SDH de *A. thaliana*. Debido a la ausencia de la proteína fluorescente, se esperaba no observar fluorescencia, permitiendo medir el tiempo de exposición adecuada en la cual la fluorescencia observada corresponde a la fluorescencia emitida por GFP y no la autofluorescencia de los cloroplastos. Estas expectativas concuerdan con lo observado en el experimento (Fig 20). Además, de esta manera se comprueba que las células transformadas con *A. tumefaciens* cepa GV3101 portando un vector binario que no posee un gen capaz de transcribir una proteína fluorescente, no producen fluorescencia.

Por otra parte, en el trabajo realizado por Haseloff y Amos (1995), la proteína GFP fue expresado en plantas transgénicas de *A. thaliana* dirigido por el promotor CaMV35S. En estos experimentos se observó que la proteína GFP sólo (no como proteína de fusión) se localiza en el citosol y el nucleoplasma, y está ausente del nucléolo y los otros organelos. Este resultado es congruente con lo que fue observado en las hojas transformadas con pCambia1302 (Fig 21). El vector pCambia1302, al igual que en los experimentos realizados por Haseloff y Amos (1995), posee la proteína GFP bajo el control del promotor CaMV35S de tal manera que fue utilizada como control positivo, para verificar que el tiempo de exposición medido con el control negativo fue suficiente para excitar la proteína GFP, como también facilita la identificación de los compartimentos subcelulares.

Finalmente, y de acuerdo a los estudios bioinformáticos previos, en las hojas de tabaco transformadas con el vector pMDC44-*VvSDH1*, fue posible observar fluorescencia en el citoplasma (Fig 22), al tiempo de exposición en el cual en el control negativo no se observa fluorescencia y en el control positivo se observa fluorescencia tanto en el citoplasma como en el nucleoplasma. A diferencia del control positivo, la proteína GFP-*VvSDH1* sólo se observa en el citoplasma y no en el nucleoplasma.

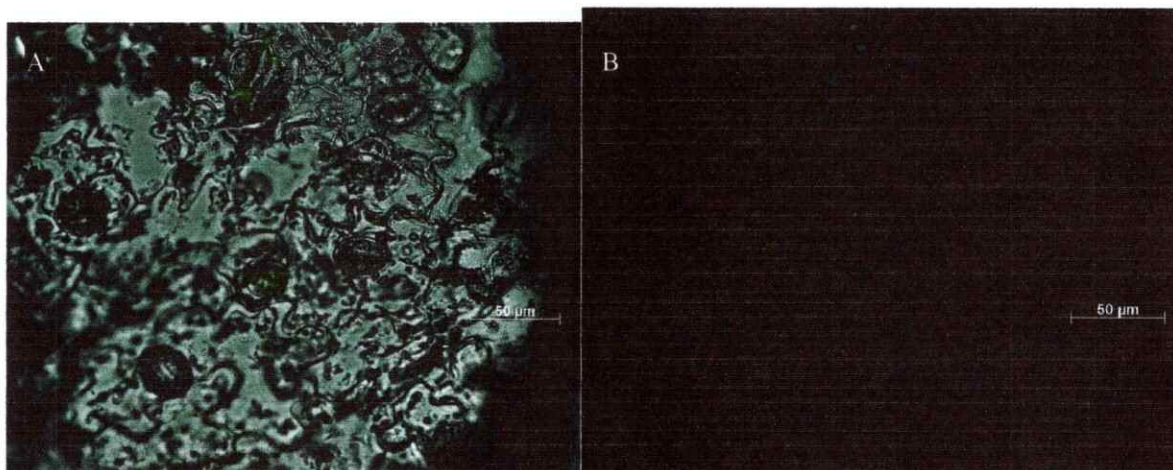


Fig 20. Hoja de tabaco transformada con vector pCambia-AtSDLprom. Imagen bajo microscopio de fluorescencia de hoja de tabaco transformado transitoriamente con vector pCambia-AtSDLprom. (A) Imagen en campo claro. (B) Imagen bajo microscopio con filtro de excitación entre 510- 560 nm, y filtro de emisión de 590 nm. No se observa fluorescencia debido a la ausencia de proteína GFP. La barra en ambas imágenes determina el tamaño correspondiente a 50 µm.

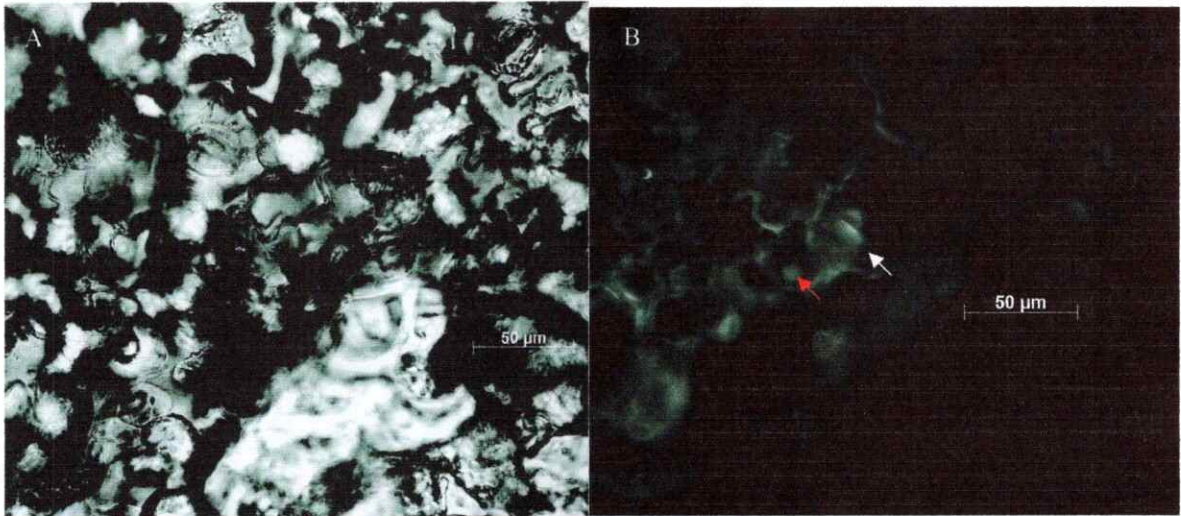


Fig 21. Hoja de tabaco transformada con vector pCambia1302. Imagen bajo microscopio de fluorescencia de hoja de tabaco transformado transitoriamente con vector pCambia1302 (A) Imagen en campo claro. (B) Imagen bajo microscopio con filtro de excitación entre 510- 560 nm, y filtro de emisión de 590 nm. Se observa fluorescencia tanto en citoplasma, flecha blanca, como en núcleo, flecha roja. La barra en ambas imágenes determina el tamaño correspondiente a 50 µm.

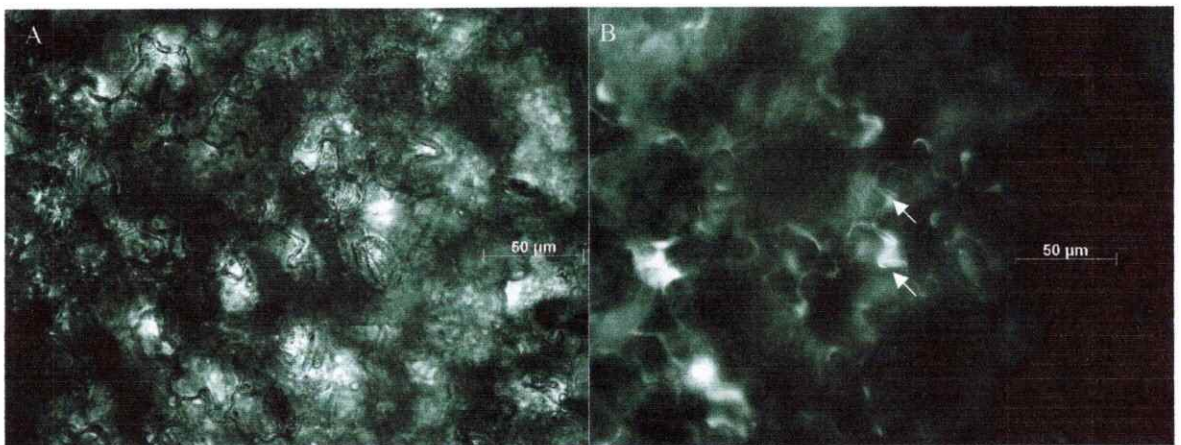


Fig 22. Hoja de tabaco transformada con vector pMDC44-*VvSDH1*. Imagen bajo microscopio de fluorescencia de hoja de tabaco transformado transitoriamente con vector pMDC44-*VvSDH1* (A) Imagen en campo claro. (B) Imagen bajo microscopio con filtro de excitación entre 510- 560 nm, y filtro de emisión de 590 nm. Se observa fluorescencia sólo en citoplasma de la célula, flechas blancas. La barra en ambas imágenes determina el tamaño correspondiente a 50µm.

4.6 Estudio *in silico* de la posible función de *VvSDH1* utilizando datos de microarreglos.

Para iniciar el estudio de la posible función de *VvSDH1 in vivo*, se identificó **1608527_at** (gb:CF515950) como un “probeset ID” de Affymetrix 16K Genechip de *Vitis vinifera*, de confianza para detectar la expresión del gen en estudio, *VvSDH1* (CAO24583.1), bajo distintas condiciones.

Existe una identidad de un 98.8% entre la secuencia utilizada por los creadores del chip para diseñar el "probeset" 1608527_at de 1375 pb y la secuencia en estudio *VvSDHI* de 1098 pb.

Una vez identificado el "probeset" que representa *VvSDHI*, se identificaron aquellos experimentos en la base de datos Plexdb en los cuales la fluctuación del nivel de expresión de 1608527_at, fuese significativa. Se encontraron un total de 15 experimentos en la base de datos Plexdb, cuya variación para el "probeset" 168527_at son significativas (datos no mostrados). Estos 15 experimentos pueden clasificarse en 4 categorías: las que analizan la expresión en distintos estadios de desarrollo, bajo estrés abiótico (hídrico, salino, de frío y de calor), estrés biótico (*Plasmopara viticola*, Bois Noir, oidio y el virus GLRaV-3) y otros (distintos fotoperiodos y presencia de ABA externo). En vista de la función osmoreguladora reportada para sorbitol en especies de Rosaceae, se decidió analizar sólo aquellos experimentos (VV1, VV2, VV3 y VV5) en los cuales se estudió la respuesta de las vides frente a estrés hídrico y salino. Cabe destacar que los experimentos VV1 y VV2 analizan la respuesta temprana y a mediano plazo de tejidos fotosintéticos de las vides (Cabernet Sauvignon) frente a estrés hídrico y salino (periodos de horas y días, respectivamente) y los experimentos VV3 y VV5 analizan la respuesta de las bayas de vides (Cabernet Sauvignon y Chardonnay) bajo estrés hídrico a largo plazo, vale decir, en periodos de estadios de desarrollo fisiológico, que en general son periodos de semanas, aunque éstas dependen del clima y la geografía local.

En el experimento VV1 (sin publicación asociada), se sometieron plantas de *V. vinifera* (Cabernet Sauvignon) en cultivo hidropónico a estrés salino (120 mM de NaCl:CaCl₂ en una relación 10:1), a estrés hídrico mediante polietilén glicol, a estrés de frío (5 °C) y sin estresar. Luego, triplicados de tallos con hojas fueron colectados a distintas horas de tratamiento (0, 1, 4, 8 y 24 h) y utilizados para análisis mediante microarreglo. Como se observa en la Figura 23 (A), tanto bajo estrés salino como hídrico, la expresión de *VvSDHI* aumenta a partir de cuatro horas, siendo el nivel de transcrito 2,5 y 3,3 veces mayor en condiciones de estrés salino e hídrico, respectivamente en comparación al nivel de transcrito del gen en condición control. El promedio de la expresión de los triplicados de las

muestras bajo condiciones de estrés salino, hídrico y control a las 24 hrs fue respectivamente: 1338, 1818 y 544).

En el experimento VV2 (Cramer, 2007), plantas de la cepa Cabernet Sauvignon en cultivo en tierra en invernadero sin estresar, y sometidas a estrés hídrico y salino fueron comparadas. En este caso el estrés hídrico consistió en cese de riego a partir del día 0. Las plantas control y bajo estrés salino fueron regadas con 4 L de agua o solución salina respectivamente de forma diaria. La concentración de sales en la solución salina fue aumentada en forma paulatina comenzando con 10 mM NaCl y 1 mM CaCl₂ el día 1 hasta 250 mM NaCl y 25 mM CaCl₂ el día 15 y 16. Se colectaron muestras de ápices en triplicado cada 4 días (0, 4, 8, 12 y 16 días) de los distintos tratamientos para experimentos de microarreglo. Como se observa en la Figura 23 (B), en las muestras del día 12 (estrés salino corresponde a 75 mM NaCl y 7.5 mM CaCl₂) se observa un leve aumento de expresión de *VvSDHI*. Luego en el día 16 se observa un aumento de expresión de ~5.6 y ~5.1 veces la expresión bajo condición control para el estrés hídrico y salino respectivamente. El promedio de la expresión de los triplicados de las muestras bajo condiciones de estrés hídrico, salino y control el día 16 fue respectivamente: 1950, 1770 y 350.

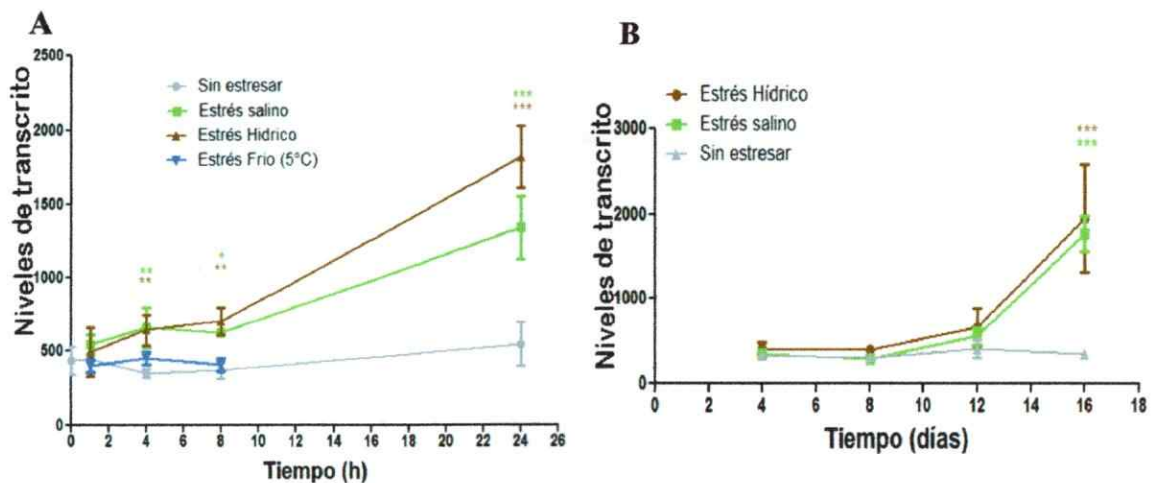


Fig 23. Niveles de transcrito de *VvSDHI* en VV1 y VV2. (A) Experimento VV1. Respuesta temprana de la

expresión de *VvSDHI* bajo estrés hídrico, salino y frío. Se observa un aumento significativo (de acuerdo al test de ANOVA) de la expresión de *VvSDHI* a partir de las 4 hrs en condiciones de estrés salino e hídrico, no así en condiciones de estrés de frío. **(B)** Experimento VV2. Respuesta a mediano plazo, en término de días, de la expresión de *VvSDHI* bajo estrés hídrico y salino. En ambos tipos de estrés se observa un aumento significativo (de acuerdo al test de ANOVA) a los 16 días.

Por otra parte, en los experimentos con bayas sometidas a estrés hídrico, VV3 y VV5, se observó una leve disminución de expresión de *VvSDHI* en el primer caso (Fig 24) y una expresión irregular en el segundo caso en la cual no se observa diferencia significativa frente a estrés (Fig 25). En el experimento VV3 (Grimplet Jerome, 2007), se hicieron experimentos de microarreglo con distintos tejidos del fruto; pulpa, exocarpo y semilla, sometidas a estrés hídrico (las plantas no fueron regadas). En este experimento se usó como control plantas bien regadas a partir del estadio 27 (Coombe, 1995) y todas las muestras fueron colectadas en triplicado en el estadio 38 (Coombe, 1995), vale decir, las muestras fueron colectadas aproximadamente 112 días más tarde. Se observó una leve disminución de la expresión de *VvSDHI* en los tres tejidos de aproximadamente 1.3-1.4 veces (Fig 24 (A)). Por otra parte, se puede apreciar que no hay diferencia de expresión entre los 3 tejidos, ya sea en estrés o plantas sin estresar (Fig 24 (B)).

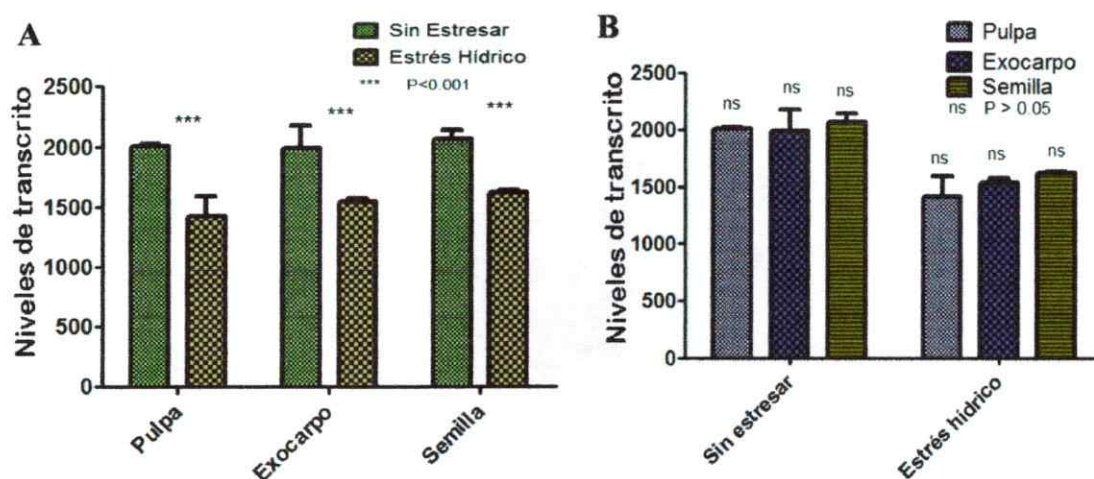


Fig 24. Niveles de transcrito de *VvSDHI* en VV3; Respuesta a largo plazo, en término de estadios de desarrollo, de la expresión de *VvSDHI* bajo estrés hídrico. A. Expresión de *VvSDHI* en bayas estresadas en comparación a bayas sin estresar. Se observa una disminución significativa de la expresión de *VvSDHI* al someter la planta a estrés desde el estadio 27 al 38. B. Comparación de expresión de *VvSDHI* en distintos tejidos de la baya. No se observan diferencias significativas entre la expresión de los tres tejidos; pulpa,

exocarpo y semilla. La expresión de éstos son equivalentes entre sí ya sea en estrés hídrico o sin estresar.

El experimento VV5 (Deluc, 2007) de forma similar, consistió en el estudio de la expresión génica en vid sometida a estrés hídrico por largos periodos de tiempo. A diferencia del experimento VV3 (Grimplet Jerome, 2007), este experimento consistió en el monitoreo de la expresión génica de frutos de Cabernet Sauvignon sometido a riego deficiente (-0.75 a -1.1 MPa) y riego normal (-0.5 a -0.7MPa), a lo largo de 8 estadios de desarrollo (estadio 31-38, a partir de la 3^{ra} semana hasta la 16^{ava} semana post floración). Si bien no se aprecian diferencias significativas de expresión entre plantas estresadas y sin estresar (Fig 25 (A)), si se observa un aumento de expresión a medida que el fruto se desarrolla (Fig 25 (B)). Las discrepancias entre los experimentos VV1 y VV2 comparados con los experimentos VV3 y VV5 serán discutidos en la siguiente sección.

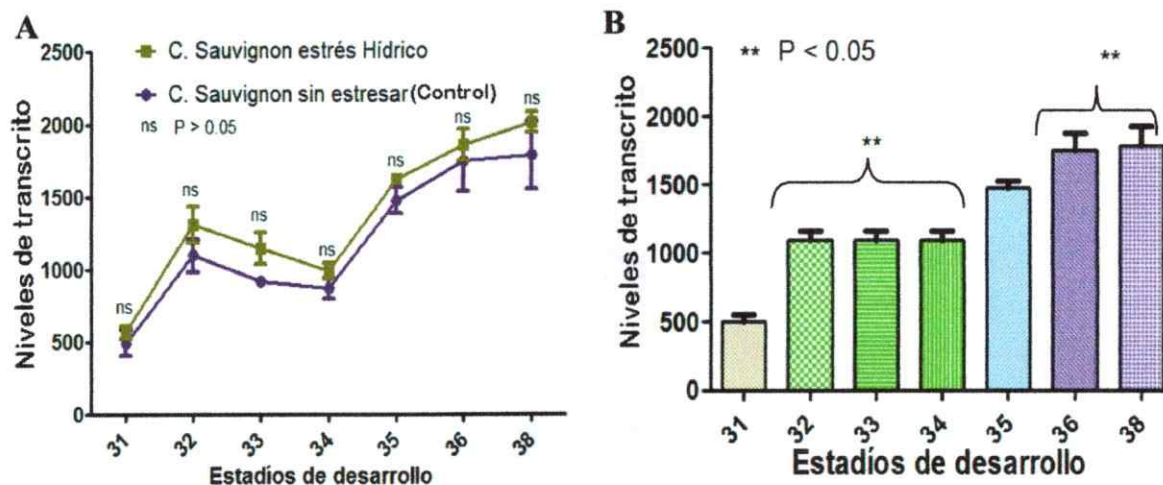


Fig 25. Niveles de transcritos de *VvSDHI* en VV5; Respuesta a largo plazo, en términos de estadios de desarrollo, de la expresión de *VvSDHI* en frutos de la variedad C. Sauvignon bajo estrés hídrico. A. Expresión de *VvSDHI* en bayas estresadas en comparación a bayas sin estresar. No se observan diferencias significativas entre la expresión en las muestras estresadas en comparación a las sin estresar. **B.** Comparación de expresión de *VvSDHI* en distintos tejidos de la baya. Se observa una diferencia significativa de la expresión de *VvSDHI* al pasar del estadio 31 al 32. Luego se observa una fase de adaptación o lag desde el estadio 32 al 34. El aumento de expresión en el estadio 35 no es significativo comparado al estadio 34 ni 36. Sin embargo el aumento de expresión en el estadio 36 y 38 es significativo comparado con los estadio 32 al 34.

5 DISCUSIÓN

Se ha evidenciado la presencia de enzimas SDH en especies no Rosaceas, tales como *Solanum lycopersicum* (Ohta et al 2005), *Glycine max* (Kuo et al 1990) y *Zea mays* (Doehlert 1987). En este trabajo se presentan los primeros estudios dedicados a estudiar una posible SDH en *Vitis vinifera* (Cabernet Sauvignon), una especie de gran importancia comercial en nuestro país.

Se encontraron 5 secuencias candidatas de SDH en *Vitis vinifera*, con un porcentaje de identidad aminoacídica de entre un 74-86% con SDHs caracterizadas de especies como manzana y tomate (Tabla II). De estas 5 secuencias candidatas sólo se seleccionó y se trabajó con una, por las siguientes razones:

- La secuencia ABA01327.1 fue identificada como L-idonato DH (DeBolt et al 2006), una enzima que participa en la síntesis de la vitamina C. Por ello fue descartado como posible SDH de vid.
- Mediante análisis de agrupamiento (Fig 5), se determinó que las secuencias CAO24586.1 y CAN73609.1 se encuentran más cercanas filogenéticamente a la enzima L-idonato DH. Dado que L-idonato DH posee muy baja actividad frente a sorbitol (DeBolt et al 2006) es que se consideró que estas dos secuencias no eran las mejores candidatas para SDHs de vid.
- Se determinó que las secuencias CAN73444.1 y CAO24583.1, son idénticas entre sí, siendo CAN73444.1 una versión truncada de CAO24583.1, de aproximadamente 60 aminoácidos más corto en el extremo N-terminal.

Por las razones enumeradas anteriormente, en este trabajo se decidió estudiar la secuencia CAO24583.1, la cual fue nombrada *VvSDHI*. Esta secuencia, además, se encuentra más cercana filogenéticamente a SDHs de especies no-Rosaceae como SDH de tomate y una posible SDH de *Arabidopsis* (Fig 5).

La presencia de cuatro secuencias ortólogas, con 76-99% identidad aminoacídica entre ellas (Tabla 3)

podría deberse a unas duplicaciones génicas. En plantas, las familias génicas están muy conservadas a través de la evolución y se cree que la diversificación de las plantas se produce en gran parte gracias a la duplicación génica y la "adaptación" de un gen pre-existente (Flagel y Wendel 2009). De esta manera, se cree que una secuencia ancestral pudo haber diversificada hacia dos funciones distintas, por ejemplo la oxidación de sorbitol (SDH) o de ácido L-idónico (L-idonato DH).

La similitud entre las 3 secuencias candidatas de SDH de uva (sin contar la secuencia truncada), y L-idonato DH, fue un obstáculo en la clonación de la secuencia candidata *VvSDHI*. Para asegurar la especificidad de amplificación contra la secuencia en estudio, *VvSDHI*, fue necesario diseñar partidores en la región 5' y 3' UTR, estrategia que resultó ser exitosa (Fig 8).

Por otra parte, debido a que no existían estudios de expresión (microarreglos) que indiquen en que tejido y/o estadios existe una mayor abundancia de *VvSDHI* en el momento de iniciar el estudio, se utilizaron RNAs proveniente de distintos órganos de uva, así como también de distintos estadios para tratar de asegurar el clonamiento de *VvSDHI*. De tal manera, se utilizaron RNA provenientes tanto de hoja joven, y baya en dos estadios distintos (momento de pinta y 4 semanas post-pinta). En vista de que fue posible amplificar *VvSDHI* a partir de las 3 muestras de RNA (Fig 7), queda demostrado que *VvSDHI* se expresa en estos tejidos, los cuales son todos tejidos sumideros.

La secuencia de cDNA de *VvSDHI* obtenida fue clonada en pCR8 y secuenciada. Las diferencias aminoacídicas entre la secuencia clonada (Fig 8) y la secuencia depositada en la base de datos (CAO24583.1), se explica de dos formas. En primer lugar las diferencias podrían deberse a la diferencia de variedad. Mientras la secuencia clonada proviene de la variedad Carbernet Sauvignon, la secuencia depositada en la base de datos proviene de Pinot Noir. En este caso, se observaría las diferencias en todos los 4 clones secuenciados. Es decir, mientras los 4 clones secuenciados presentan un mismo nucleótido, la secuencia proveniente de la base de datos presenta otra. En segundo lugar, aquellas diferencias que sólo se encuentra presente en uno de los clones y ausente en

los 3 restantes, podrían corresponder a errores introducidas por la enzima Taq polimerasa. Cabe destacar que no todas las diferencias nucleotídicas introducidas por la Taq polimerasa generaron diferencias aminoacídicas, debido al código genético degenerado. Además, un cambio aminoacídico puede afectar en mayor medida que otra, dependiendo si se ubica en la cercanía de sitios conservados y/o en el dominio catalítico o sitio de unión de NAD⁺. Afortunadamente, de los 4 clones secuenciados, un clon, VvSDH4.2.2, presentaba un solo cambio aminoacídico introducido por la enzima Taq polimerasa, ubicado hacia el C-terminal de la proteína, específicamente en el aminoácido 362, posición en la cual en lugar de una metionina como el resto de los clones y la base de datos, posee una treonina. Antecedentes bibliográficos indican que el monómero de SDH se caracteriza por poseer dos dominios distintivos: un **dominio catalítico** (residuos 1-157, 299-356 en SDH de humano) y un **dominio de unión a NAD⁺** (residuos 158-298 en hSDH; Pauly et al 2003). A diferencia de las ADH de mamíferos, el dominio catalítico de la SDH posee sólo un átomo de zinc. Cada átomo de zinc es coordinado mediante la interacción con cuatro ligandos (Cys44, His69, Glu70 y una molécula de agua en hSDH) (Pauly et al 2003). Por otra parte, el dominio de unión a NAD⁺ posee un plegado tipo Rossmann (Rossmann et al 1974) que une, de forma reversible e idéntica en las 4 subunidades, el cofactor requerido para la reacción (Pauly et al 2003). Además, en el trabajo de modelamiento molecular de AtSDL (364 aa) realizado por Patricio Mandujano en su trabajo de magister, se identificaron 5 **aminoácidos que participan en la unión de D-sorbitol**, dentro de los cuales se encuentra aminoácido 310 (arginina) y 16 aminoácidos involucrados en la **unión de NAD⁺**, dentro de los cuales se encuentra el aminoácido 353 (arginina). Teniendo en cuenta que el dominio catalítico y el de unión a NAD⁺, comprenden residuos en el C-terminal de la proteína, se consideró que era de importancia corregir la mutación (Met362Tre) generada en el primer intento de clonamiento. Es por ello que se diseñaron partidores destinados a corregir esta mutación y se utilizó la enzima Pfu en lugar de la Taq polimerasa para el segundo intento de clonación de la *VvSDHI*. Mediante esta estrategia complementaria, se logró clonar con éxito el gen

de interés *VvSDHI* sin ningún cambio en la secuencia primaria de la proteína codificada por este gen que pudiese afectar su actividad enzimática (Fig 11).

Se clonó el fragmento de interés en el vector de expresión pGWB2, el cual permite la sobreexpresión del gen clonado. El análisis de expresión se realizó mediante la transformación transitoria en tabaco, la posterior extracción de RNA del tejido transformado y análisis por RT-PCR. Fue necesario utilizar partidores internos, ya que según estudios *in-silico*, los partidores *VvSDHSpe52* y *VvSDHBst33* amplifican un fragmento de 967 pb correspondiente al mRNA de una proteína "heat shock" endógena de tabaco, *NtHSF1*, tamaño muy similar (1098 pb) al esperado para *VvSDHI* con estos partidores. Debido a la dificultad de distinguir entre la banda de 967 pb y 1098 pb en un gel de agarosa, es que se diseñaron partidores internos específicos para *VvSDHI*, los cuales no amplificaron ninguna banda al utilizar como molde el cDNA de tabaco silvestre (Fig 16). De tal manera, mediante la amplificación por PCR e identificación en gel de electroforesis de la banda de 967 pb, se comprobó la funcionalidad transcripcional del gen *VvSDHI* en el vector pGWB2, útil para posteriores estudios de su actividad enzimática (ver Proyecciones y Conclusiones).

Una vez clonado en pCR8, se buscó un vector que permitiera generar una proteína fusión GFP con *VvSDHI* utilizando el sistema Gateway, con la finalidad de estudiar la ubicación subcelular de *VvSDHI*. Debido a que la secuencia *VvSDHI* clonada en pCR8 posee el codón de término, la proteína de fusión generada debía poseer la fusión hacia el N-terminal de *VvSDHI*. Una potencial complicación generada mediante esta estrategia, es que la presencia de la proteína GFP en el amino terminal de la proteína en estudio podría interferir con la función de algún péptido señal en la proteína en estudio. Si este fuese el caso, entonces es posible que una proteína no citoplasmática se localice en el citoplasma en este experimento debido a la interferencia generado por la proteína GFP sobre el péptido señal de la proteína de estudio. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se realizó un estudio *in silico* previo (Tabla IV). No fue posible identificar la presencia de algún

péptido señal de destinación a organelos en la proteína VvSDH1 mediante los programas utilizado. Por ello, es que se consideró adecuada la generación de una proteína fusión GFP-VvSDH1 para ser utilizada como una primera estrategia para determinar la localización subcelular de VvSDH1. Como resultado de este experimento, al expresar transitoriamente GFP-VvSDH1 en hojas de tabaco, se observó una localización citoplasmática de la proteína de fusión (Fig 22). Estos resultados concuerdan con estudios previos de la localización subcelular de una posible SDH de Arabidopsis (AtSDL) realizadas por Patricio Mandujano (Mandujano, 2010) en nuestro laboratorio, así como también otros estudios de SDH en otras especies vegetales (Fayek y Wayne, 1979; Wang et al., 2009). La localización subcelular de una proteína está estrechamente vinculada con la función que posee ésta. Una localización citoplasmática de las SDH facilitaría la conversión del sorbitol, introducido al citoplasma de las células de los tejidos sumideros mediante transportadores específicos de sorbitol (Gao et al 2003; Watari et al 2004; Fan et al 2009), a fructosa, la cual es almacenada en la vacuola. Es importante recordar que en el trabajo de Deluc y colaboradores (2007), se identificó un posible transportador de sorbitol en uva, cuyo nivel de transcrito en etapas tempranas del desarrollo es abundante en comparación con el nivel de transcrito de, por ejemplo, un transportador de sacarosa. Sin embargo, para confirmar la localización subcelular de VvSDH1, y descartar en forma definitiva que los resultados observados en este experimento se deban a una interferencia por parte de la proteína GFP fusionada en el N-terminal, sería necesario realizar estudios adicionales (ver Proyecciones y Conclusiones).

Los datos obtenidos desde la base de datos Plexdb demuestran que existe un aumento de expresión de *VvSDH1* frente a estrés hídrico y salino (Fig 23), no así frente a estrés de frío, al menos en las primeras 8 horas de experimentación. Sin embargo, sólo se observa un aumento de expresión en los tejidos fotosintéticos. En los experimentos VV1 y VV2, el aumento de expresión de *VvSDH1* en los tejidos fotosintéticos (tallos y hojas en el caso de VV1 y ápices en el caso de VV2) frente al estrés

hídrico y/o salinos sucede en un corto plazo (4 hrs) cuando el estrés es intenso (120 mM de NaCl:CaCl₂ en 10:1, en el caso de estrés salino). Cabe destacar que en el experimento VV2, el aumento de expresión se hace significativo al día 15-16, cuando la intensidad de estrés salino es la misma que en el experimento VV1. Estos son resultados inesperados, ya que la función osmoprotectora de los polioles es ampliamente reportado en la literatura. Se ha demostrado que la acumulación de sorbitol facilita la regulación osmótica en especies Rosaceae bajo estrés hídrico (*Malus hupehensis*; Meng et al. 2008), así como también bajo estrés salino en especies Plantaginaceae (*Plantago maritima*; Ahmad et al, 1979) y Rosaceae (*Malus domestica*; Šircelj et al. 2007). Es más, se ha demostrado que bajo estrés salino plantas que transportan sacarosa como principal fuente de carbono, como es el tomate (Tari et al 2010), de particular importancia en este estudio ya que la secuencia de VvSDH1 tiene un alto porcentaje de similitud con la SDH de tomate (Tabla III), acumulan sorbitol. Es por lo anteriormente expuesto que se esperaba una disminución de expresión de *VvSDH* en tejidos fotosintéticos de vid frente a estrés hídrico y/o salino, ya que la menor tasa de oxidación de sorbitol a fructosa implicaría una mayor acumulación de sorbitol.

¿Cómo se podría explicar estos resultados inesperados? Se ha demostrado mediante ingeniería genética que la acumulación de grandes cantidades de sorbitol (más de 3 µmol/gramo de peso fresco (gPF) de tejido) en plantas que no sintetizan sorbitol y que transportan sacarosa, como es el tabaco, genera pérdida de clorofila y lesiones necroticas (Sheveleva et al 1998). En el trabajo realizado por Sheveleva et al, los investigadores transformaron tabaco con el cDNA de *sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa* (*S6PDH*) de manzana, enzima clave en la biosíntesis de sorbitol. Observaron que aquellas plantas transgénicas con bajo niveles de sorbitol (2-3 µmol/gPF) se desarrollaron en forma normal, sin embargo aquellos con mayor acumulación de sorbitol (entre 3-5 µmol/gPF), sufrieron pérdida de clorofila y lesiones necróticas. Más aún, aquellas plantas transgénicas que acumularon sorbitol en una concentración mayor a 15-20 µmol/gPF mostraron infertilidad, y concentraciones aún más altas impidieron la formación de raíces. Sin embargo, este fenotipo abnormal no fue

observado en tabaco transformado con el cDNA de *SDH* y *S6PDH* de manzana (Deguchi et al 2006), lo cual genera un ciclo de sorbitol. Al igual que Sheveleva et al, Deguchi et al observaron una inhibición de crecimiento en tabaco transformado con solo *S6PDH*, pero tabaco transformado con ambos cDNA (*SDH* y *S6PDH*), presentaron un fenotipo normal y se desarrollaron en forma normal pese a la acumulación de sorbitol en concentraciones de 3-4,5 $\mu\text{mol/gPF}$. Los tabacos transformados con *SDH* y *S6PDH*, además de acumular sorbitol en las raíces (órganos sumidero), presentaron una mayor concentración de sacarosa, mientras que las concentraciones de glucosa y fructosa no presentaron diferencias significativas comparadas con el control (Deguchi et al 2006). Este aumento de concentración de sacarosa en las raíces no fue observado para tabaco transformado con *S6PDH* únicamente, vale decir, el aumento de sacarosa en el órgano sumidero probablemente requiera de la actividad de la enzima *SDH*, y consecuentemente de la formación de fructosa. Sin embargo, como ya fue mencionado, la concentración de fructosa se mantuvo inalterada, mientras que la concentración de sacarosa aumentó, indicando que existe una regulación homeostática de la concentración de fructosa. Probablemente esto se debe a que la fructosa es un factor regulatorio en el metabolismo de azúcares en órganos sumideros (Deguchi et al 2006), ya que concentraciones relativamente altas de fructosa inhiben la actividad de la sacarosa sintasa (enzima que cataboliza sacarosa a UDP-glucosa y fructosa) y la fructokinasa (enzima que sintetiza fructosa-6-fosfato a partir de fructosa) (Schaffer et al 1997; Matic et al 2004). Es más, Deguchi et al observaron una disminución de la actividad de la sacarosa sintasa en tabaco transformado con *SDH* y *S6PDH*.

Tomando en consideración todos estos antecedentes, se hipotetiza una situación parecida para la uva, en donde el aumento de niveles de transcritos observados de *VvSDHI* en tejidos fotosintéticos no descarta una acumulación de sorbitol por parte de la planta. Más bien se trata de una regulación del sorbitol producido y acumulado, ya que concentraciones superiores de 3 $\mu\text{mol/gPF}$ de sorbitol produciría efectos nocivos para la planta (Sheveleva et al 1998), mientras que concentraciones menores a 3 $\mu\text{mol/gPF}$ podrían ser suficiente para aumentar la tolerancia a estrés hídrico y/o salino.

Muchos trabajos previos han demostrado que concentraciones marginales de polioles y otros osmolitos son capaces de incrementar la tolerancia de estrés en plantas (Shen et al 1997, Abebe et al 2003), de manera tal que a medida que se intensifica el estrés hídrico y/o salino se produce más sorbitol, pero es mantenido en concentraciones marginales, no dañinas para la planta, función que podría ser cumplida por la *VvSDHI*. La *VvSDHI* en el tejido fotosintético oxidaría el exceso de sorbitol a fructosa, preveniendo la inhibición de la actividad de sacarosa sintasa, y aumentando consecuentemente la concentración de la sacarosa. La mayor concentración de sacarosa es luego distribuida a través de la planta bajo estrés, particularmente hacia los órganos sumideros donde la tasa de fotosíntesis es menor (hojas inmaduras) o ausente (raíces).

Por otra parte, no se observa un aumento significativo en la expresión de *VvSDHI* en los experimentos en que se monitorean los niveles de transcritos en las bayas frente a estrés hídrico (VV3 y VV5), pese al largo periodo (en términos de estadios de desarrollo) a la cual la planta se encuentra sometida al estrés. No es posible atribuir ésto a la falta de intensidad del estrés, ya que tanto el experimento VV3 como VV2 consistió en un cese de riego de las plantas. Y mientras que en los tejidos fotosintéticos (VV2), es posible observar un aumento significativo de expresión de *VvSDHI* ya en el día 16, no se observa lo mismo para VV3 en las bayas, pese al largo periodo al cual la planta es sometida a estrés. Por lo tanto se hipotetiza que a diferencia de lo que sucede en los tejidos fotosintéticos, en los órganos sumideros el ciclo de sorbitol no es activado en condiciones de estrés. Vale decir, el no aumento de transcrito de *VvSDHI* en uva se debe a que no hay acumulación de sorbitol en la baya bajo condición de estrés. El trabajo realizado por Tari et al (2010) avala esta hipótesis, puesto a que estos investigadores midieron las concentraciones de sorbitol en tomate en condiciones de estrés. Como resultado de la investigación, observaron un aumento de sorbitol en hojas de tomate bajo estrés en comparación al control sin estresar, mientras que en las raíces (órganos sumideros al igual que los frutos) no se observó un aumento de sorbitol en condición de estrés comparado con el control sin estresar. Por lo tanto, no se acumula sorbitol y en consecuencia

no hay un aumento de los niveles de fructosa ni inhibición de las enzimas sacarosa sintasa y/o fructokinasa. De tal manera, la sacarosa translocada desde los tejidos fotosintéticos es degradada por la acción de la enzima sacarosa sintasa a UDP-glucosa y fructosa. La UDP-glucosa es transformada a glucosa-1P mediante la acción de la UDP-glucosa pirofosforilasa, y luego a glucosa 6-P por la enzima fosfoglucomutasa. Por otra parte la fructosa es fosforilada por la enzima fructokinasa a fructosa 6-P, la cual luego es transformada en glucosa-6P por la acción de la fosfoglucoisomerasa. La glucosa 6-P obtenida por ambas vías podría ser utilizada en la vía de las pentosas fosfato (como vía alternativa de la glicólisis) o bien también puede ser sustrato para la formación de myo-inositol, el cual junto a la UDP-glucosa son precursores para la formación de la pared celular. Otra alternativa sería la acumulación de almidón, sintetizado a partir de glucosa 1P.

Si bien el nivel de transcrito de *VvSDHI* en baya frente a estrés hídrico y/o salino no experimenta un cambio significativo, pese a estar bajo estrés por periodos prolongados, si se observa un aumento a través del desarrollo de la baya. Además, el aumento de expresión tiene un comportamiento muy similar a la curva de aumento de diametro de la baya a través del desarrollo, siendo la similitud aún mayor a la curva de grados Brix (medida aproximada de razón solutos disueltos, principalmente sacarosa) a partir del estadio 34 (cuando empieza la pinta) (Conde et al. 2007). Las bayas de las uvas tienen un patrón de crecimiento sigmoideo doble (Conde et al. 2007). Existe una primera fase de crecimiento la cual ocurre gracias a la división celular, luego sigue una fase de adaptación (fase lag) donde no hay aumento de volumen por parte de la baya y finalmente una segunda fase de crecimiento en donde el aumento de volumen es el resultado principalmente de la expansión celular como efecto de la acumulación de azúcares y agua en la vacuola (Conde et al. 2007). En esta segunda fase de crecimiento, la cual coincide con el comienzo de pinta de la baya, el factor más importante consiste en un aumento masivo de compuestos, siendo los principales glucosa y fructosa (Conde et al. 2007). Lo descrito anteriormente, permite hipotetizar que el aumento de *VvSDHI* en

baya durante el desarrollo permite una mayor acumulación de fructosa, contribuyendo en el crecimiento de la baya. Sin embargo, para que lo anterior sea válido, se esperaría que el aumento de fructosa no sea lo suficiente como para inhibir la actividad de la enzima sacarosa sintasa y/o la fructokinasa, permitiendo que exista un aumento del contenido de glucosa-6P. Así como también sería necesario un aumento de transcritos de las enzimas que conducen a la formación de myo-inositol, mayor que el aumento de las enzimas del ciclo de sorbitol, puesto a que ambas vías competirían por el mismo sustrato, glucosa-6P, permitiendo la formación de pared y por ende crecimiento adecuado de la baya. Vale decir, debe existir una regulación muy fina del contenido de fructosa intracelular durante el desarrollo de la baya.

6 PROYECCIONES Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se presentan los primeros estudios realizados sobre una posible SDH en uva, una fruta de exportación de gran importancia para nuestro país. Se cumplieron exitosamente los objetivos planteados en este seminario de título, de los cuales se puede concluir que:

1. Los resultados demuestran que VvSDH1 es la mejor candidata SDH de vid encontrada, en comparación con las otras candidatas identificadas en este trabajo. Sin embargo para tener certeza de que VvSDH1 es efectivamente una SDH en vid, es necesario realizar estudios bioquímicos para verificar la actividad de la enzima. Para ello queda en disposición el vector pGWB2-VvSDH1, un vector que sobreexpresa VvSDH1, cuya funcionalidad a nivel molecular ya fue probada en este seminario de título.
2. Además, los resultados obtenidos tanto con la proteína fusión GFP-VvSDH1, como el estudio *in-silico* de localización subcelular, sugiere una localización citoplasmática para VvSDH1. Esta localización concuerda con la ubicación subcelular de SDH conocidas, puesto a que es en el citoplasma donde estas enzimas ejercen su función.
3. Finalmente, los análisis *in-silico* preliminares para dilucidar la posible función fisiológica de VvSDH1 sugiere que ésta cumple un rol regulando los niveles de sorbitol en los tejidos fotosintéticos cuando la planta se encuentra bajo condiciones de estrés hídrico y salino. Sin embargo, en el fruto cumpliría una importante función en la maduración de la baya de uva, en particular en la segunda fase de crecimiento, aumentando los niveles de fructosa.

Para continuar con los estudios de esta posible SDH de uva, se propone:

1. Verificar mediante pruebas bioquímicas la actividad de VvSDH1, para comprobar y cuantificar su actividad como SDH. Esto se puede realizar, en primera instancia, mediante la sobreexpresión de VvSDH1 en forma transitoria en tejidos no fotosintéticos (debido a que la

clorofila enmascara la detección de NADH en el espectrofotometro a 340nm) y una extracción de proteínas totales para realizar ensayos de actividad utilizando sorbitol como sustrato y NAD⁺ como cofactor; de esta manera la actividad de la enzima VvSDH1 podrá ser registrado en un espectrofotometro a 340nm mediante la reducción de NAD⁺ a NADH. Se podría utilizar el vector pGWB2-*VvSDH1*, construido en este seminario, para estos fines.

2. Complementar los estudios de ubicación subcelular mediante fusión ya sea de GFP o His en el extremo C-terminal de VvSDH1.
3. Realizar estudios para sustentar las ideas formuladas a partir de los datos obtenidos de Plexdb.

Para ello:

- a) Corroborar en forma experimental los datos de expresión de *VvSDH1* en tejidos fotosintéticos bajo estrés mediante el estudio de su. Con esta finalidad se debe realizar un estudio *in-silico* para detectar elementos reguladores dentro del promotor. Luego de clonar el promotor y mediante un vector que permita expresar la proteína GUS bajo el promotor de *VvSDH1*, se puede estudiar el patrón de expresión de *VvSDH1* bajo estrés transformando en forma estable el vector "promotor VvSDH1-GUS" en, por ejemplo, Arabidopsis.
- b) Verificar en forma experimental la expresión de *VvSDH1* a través del desarrollo de la baya mediante PCR en tiempo real.
- c) Estudiar *in-silico* el nivel de transcrito de enzimas como la fructokinasa, y la sacarosa sintasa a través del desarrollo mediante datos en Plexdb.

Este trabajo ha sido presentado en poster en los siguientes congresos:

María Francisca Aguayo, **Yu Wen Tang**, María Sofía Zamudio, Michael Handford (2009). Sorbitol Metabolisms in Plant. Cuarta Reunión Anual de la Sociedad de Biología Vegetal, La Serena, Chile. (poster session)

María Francisca Aguayo, **Yu Wen Tang**, Patricio Mandujano, Michael Handford (2010). Evaluación molecular y bioquímica de vectores para sobre-expresar sorbitol deshidrogenasa específicamente en frutos. XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Hotel Termas de Chillan, Chillan, Chile. Desde el 28 de Septiembre al 01 de Octubre. (Poster Session).

María Francisca Aguayo, Sofía Zamudio, **Yu Wen Tang**, Yessica Arcos, Patricio Arce, Michael Handford (2010). Desarrollo de plántulas de una variedad Premium de manzanas con mayor dulzor mediante el uso de herramientas biotecnológicas. 61° Congreso Agronómico de Chile, 56th ISTH Annual Meeting – SIHT Reunión Anual, 11° Congreso Sociedad Chilena de Fruticultura. Santiago, Chile. Desde el 26 al 29 de Septiembre. (Oral Session).

Yu-wen Tang, Jorge Araya and Michael Handford (2010). Identification and expression analysis of VvSDH1, a putative sorbitol dehydrogenase of grapevine (*Vitis vinifera*). Quinta Reunión Anual de la Sociedad de Biología Vegetal, Olmué, Chile. (Poster session)

Sofía Zamudio, Jorge Araya, **Yu-wen Tang**, Michael Handford (2011). The metabolism of sorbitol in non-Rosaceae species. Society for Experimental Biology Annual Main Meeting, Glasgow, Escocia (Poster session)

Jorge Araya, **Yu-wen Tang** and Michael Handford (2011) VvSDH1, a grapevine (*Vitis vinifera*) protein with homology to a sorbitol dehydrogenase from apple (*Malus domestica*), oxidises sorbitol in vitro. XXXIV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Valdivia (Poster session)

7 ANEXO

```

VvSDH1      MGKGGMSQGG---DGRGEGEENMAAWLLGVNNTLKIQQFFILPPLGPHDVRVRMKAVGICGS 57
Solanum_lycopersicum  MGKGGG-----DENMAAWLLGVNNTLKIQQFNLPLGPHDVRVRMKAVGICGS 47
Malus_domestica      MGKGGQQSCNGMVRDVKPEKENMAAWLVDVNTIKILPFLPTIGPNDVQIRIKAVGICGS 60
Prunus_salicina      MGRGGMSSQGGVLDLAH-VEQEDMAAWLVGNNTLRQFFKLPVGPNDVVRVKIKAVGICGS 59
Medicago_truncatula MGKGGMSVD-----DDVEQQNMAAWLVGLNTLKIQQFNLPLGPHDVRVRMKAVGICGS 54
Arabidopsis_thaliana -----
Zea_mays          MGKGAQGS---AAAAGGEVEENMAAWLVAKNTLKIMPFKLPVGPYDVRVRMKAVGICGS 58

VvSDH1      DVHYLTKLRCADFVVKPEPMVIGHECAGIIDEVGPQVKSLVPGDRVALEPGISWCRCQLCK 117
Solanum_lycopersicum  DVHYLTKMRCADFVVKPEPMVIGHECAGIIEEVGGEVKTLVPGDRVALEPGISWCRCNLCK 107
Malus_domestica      DVHYLTKMKADFVVKPEPMVIGHQCAGIVDKVSEVKHLVPGDRVALEPGISCAHCQQCK 120
Prunus_salicina      DVHYLTKMKADFVVQEPVIGHECAGIVDEVGSVMKNLVPGDRVALEPGISWCRCQCK 119
Medicago_truncatula DVHYLTKLRCADFVVKPEPMVIGHECAGIIEGAGSQVKTLPVGPDRVALEPGISWCRCDCCK 114
Arabidopsis_thaliana -----
Zea_mays          DVHYLREMRIAHFVVKPEPMVIGHECAGVVEEVGAGVMHLSVGDVALEPGVSWCRCHCK 118

VvSDH1      EGRYNLCPEMKFFATPPVHGSLANQVHPADLCFKLPDNDVLEEAMCEPLSVGVHACRR 177
Solanum_lycopersicum  EGRYNLCPEMKFFATPPVHGSLANQVHPADLCFKLPDDISLEEGAMCEPLSVGVHACRR 167
Malus_domestica      GGRYNLCPEMKFFATPPVHGSLANQIVHPADLCFKLPENVSLEEGAMCEPLSVGVHACRR 180
Prunus_salicina      GGRYNLCPEMKFFATPPVHGSLANQIVHPADLCFKLPENVSLEEGAMCEPLSVGVHACRR 179
Medicago_truncatula LGRYNLCPEMKFFATPPVHGSLANQIVHPADLCFKLPENVSLEEGAMCEPLSVGVHACRR 174
Arabidopsis_thaliana -----VGVHACRR 8
Zea_mays          GGRYNLCPEMKFFATPPVHGSLANQVHPADLCFKLPDGVLEEAMCEPLSMGVHACRR 178
                                           :*****

VvSDH1      ADIGPESNVLMGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVVDVDDYRLSVAKDLGADEIVKVSIN 237
Solanum_lycopersicum  ANVGPETNLLVGLGAGPIGLVTMLAARAFGAPRIVVDVDDYRLSVAKKLGADDIVKVSIN 227
Malus_domestica      ANVGPETTIVLIVGAGPIGLVSVLAARAFGAPRIVVDVDDSKRLAVAKSLGADGTIVKVSIN 240
Prunus_salicina      ANIGPETNVLIVGAGPIGLVSVLSARAFGAARIVVDVDDERLSIAKSLGADDVIVKVSIN 239
Medicago_truncatula ANIGPETNVLIVGAGPIGLVTLMLAARAFGAPRIVVDVDDHRLSVAKSLGADDIVKVSIN 234
Arabidopsis_thaliana AEVGPETNVLIVGAGPIGLVTMLAARAFVPRIVVDVDDENRLAVAKQLGADEIVQVTTN 68
Zea_mays          AGVGPETGLVVGAGPIGLVSVLAARAFGAPRVLVDVDDHRLAVARSLGADAIVRSR 238
* : : * : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :
: * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :

VvSDH1      IQDVAEEVQIHKAMGARVDVSFDCAGFDKTMSTALSATSSTGGKVLVGMGHNEMTVPLT 297
Solanum_lycopersicum  IQDVAVDIENIQKAMGGGIDASFDCAFKNKTMSTALGATRPGGKVCVGMGHHEMIVPLT 287
Malus_domestica      MEDLDDEVAIKETMGAEDVTFDCVGNKTMSTGLNATRPGGKVCVGMGHSMMTIVPLT 300
Prunus_salicina      PQDLEAEVSKIHKAMGGVDVSFDCVGNKTMSTALSATRPGGKVCVGMGHGVMTIVPLT 299
Medicago_truncatula IQDVAEEVQIHNVLGAGVDVTFDCAGFNKTMSTALTATQPGGKVCVGMGHEMIVPLT 294
Arabidopsis_thaliana LEDVGSSEVQIHKAMGSDIDVTFDCAGFNKTMSTALAAATRCGGKVCVGMGHGIMTVPLT 128
Zea_mays          VEDLADEVERIRAAMGSDIDVSLDCAGFSKTMSTALESTRPGGKVCVGMGHNEMTVPLT 298
: * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :
: * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :

VvSDH1      PAAAREVDVVGVFRYKNTWPLCIEFLRSVKIDVKPLITHRFGFSQREVEEAFETSARGGT 357
Solanum_lycopersicum  PAAAREVDVIGIFRYKNTWPLCLEFLRSVKIDVKPLITHRFGFSQEEVEEAFETSARGGD 347
Malus_domestica      AAAAREVDVVGVFRCKNTWPLCLEFLRSVKIDVKPLITHRFGFTEKEVEEAFETSARGGD 360
Prunus_salicina      PAAAREVDVVGIFRYKNTWPLCLEFLRTGKIDVKPLITHRFGFSQKEIEEAFETSARGGN 359
Medicago_truncatula PAAAREVDVVGIFRYKNTWPLCLEFLRSVKIDVKPLITHRFGFSQKEVEEAFETSARGGN 354
Arabidopsis_thaliana PAAAREVDVVGVFRYKNTWPLCLEFLTSVKIDVKPLITHRFGFSQKEVEDAFETSARGSN 188
Zea_mays          AAAAREVDVVGVFRYKNTWPLCIDFLRSKIDVKPLITHRFGFSQDRVEEAFETSARGRD 358
: * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :
: * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :

VvSDH1      AIKVMFNL 365
Solanum_lycopersicum  AIKVMFNL 355
Malus_domestica      AIKVMFNL 368
Prunus_salicina      AIKVMFNL 367
Medicago_truncatula AIKVMFNL 362
Arabidopsis_thaliana AIKVMFNL 196
Zea_mays          AIKVMFNL 366
*****

```

Anexo 1 Alineamiento aminoacídico múltiple de la putativa sorbitol deshidrogenasa de uva, VvSDH1 (CAO24583.1), con SDH de otras especies. *Solanum lycopersicum* (BAE47038), *Malus domestica* (AAL37295), *Prunus salicina* (ACL18054), *Medicago truncatula* (ACJ84424), *Arabidopsis thaliana* (NP_200010), *Zea mays* (ABA70761).

Anexo 2: Secuencias en el dendograma

AtSDL

gi|15242240|ref|NP_200010.1| sorbitol dehydrogenase, putative / L-iditol 2-dehydrogenase, putative [Arabidopsis thaliana]

LeSDH

gi|78183416|dbj|BAE47038.1| sorbitol related enzyme [Solanum lycopersicum]

MdSDH2

gi|37932831|gb|AAP69750.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 2 [Malus x domestica]

MdSDH3

gi|37935727|gb|AAP69752.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 3 [Malus x domestica]

MdSDH6

gi|37954287|gb|AAP69757.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 6 [Malus x domestica]

MdSDH7

gi|37954285|gb|AAP69756.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 7 [Malus x domestica]

MdSDH8

gi|37953330|gb|AAP69755.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 8 [Malus x domestica]

MdSDH9

gi|37936009|gb|AAP69753.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 9 [Malus x domestica]

PcSDH

gi|14700000|gb|AAK71492.1| sorbitol dehydrogenase [Prunus cerasus]

PpSDH

gi|7416846|dbj|BAA94084.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase [Prunus persica]

PsSDH

gi|219536271|gb|ACL18054.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase [Prunus salicina var. cordata]

OsSDL

gi|115477633|ref|NP_001062412.1| Os08g0545200 [Oryza sativa Japonica Group]

ZmSDH

gi|77378040|gb|ABA70761.1| sorbitol dehydrogenase [Zea mays]

VvSDH1

gi|157329156|emb|CAO24583.1| unnamed protein product [Vitis vinifera]

CAO24586

gi|157329159|emb|CAO24586.1| unnamed protein product [Vitis vinifera]

idonatoDH

gi|74273318|gb|ABA01327.1| L-idonate dehydrogenase [Vitis vinifera]

CAN73609

gi|147767778|emb|CAN73609.1| hypothetical protein VITISV_028585 [Vitis vinifera]

AtADH1

gi|15223838|ref|NP_177837.1| ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1); alcohol dehydrogenase [Arabidopsis thaliana]

MdADH

gi|886885|emb|CAA88271.1| alcohol dehydrogenase [Malus x domestica]

LeADH

gi|623249|emb|CAA54450.1| alcohol dehydrogenase [Solanum lycopersicum]

VvADH

gi|1840425|gb|AAB65840.1| alcohol dehydrogenase [Vitis vinifera]

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe T., Guenzi A.C., Martin B. & Cushman J.C. (2003)** Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 131; 1748–1755.
- Ahmad I., Larher F. and Stewart G.R. (1979)** Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. *New Phytol* 82; 671-678.
- Brown P.H., Hu H. (1996)** Phloem mobility of boron is species dependent: Evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species, *Ann. Bot.* 77, 497–505.
- Brown P.H., Shelp B.J. (1997)** Boron mobility in plants, *Plant Soil* 193; 85–101.
- Brown P.H., Bellaloui N., Hu H., Dandekar A. (1999)** Trans- genically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency, *Plant Physiol.* 119; 17–20.
- Carpenter, J.F, Prestrelski S.J. and Arakawa T. (1993)** Separation of freezing and drying – induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch Biochem Biophys.* 303; 465-472.
- Conde C., Silva P., Fonte N., Dias A., Tavares R., Sousa M., Agasse A., Delrot S. and Gerós H. (2007)** Biochemical changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Food.* 1; 1-22.
- Coombe BG (1995).** Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Austr J Grape Wine Res* 1995, 1;104-110
- Cramer G.R., Ergül A., Grimplet J., Tillett R.L., Tatrersall E.A.R., Bohlman M.C., Vicent D., Sonderegger J., Evans J., Osborne C., Quilici D., Schlauch K.A., Schooley D.A., and Cushman J. C. (2007).** Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profile. *Funct Integr Genomics* 7:111–134
- Curtis, Mark D and Grossniklaus, Ueli (2003).** A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Gene in Plants. *Plant Physiol.* 133; 462-469.
- DeBolt, S., Cook, D.R. and Ford, C.M. (2006).** L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *PNS.* 103; 5608-5613.
- Deluc Laurent G et al (2007).** Transcriptomic and metabolomic analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics.* 8;429
- Doehlert, D.C.,(1987).** Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* 84; 830–834.
- Escobar-Gutiérrez A.J., Zipperlin B., Carbonne F., Moing A., Gaudillère J.P., (1998)** Photosynthesis, carbon partitioning and metabolite content during drought stress in peach seedlings, *Aust. J. Plant Physiol.* 25; 197–205.

- Estonius M., Danielsson O., Karlsson C., Persson H., Jörnvall H., Höög J.-O. (1993)** Distribution of alcohol and sorbitol dehydrogenases: assessment of mRNAs in rat tissues. *Eur. J. Biochem.* 215; 497–503.
- Fan. R., Peng. C., Xu. Y., Wang. X., Li. Y., Shang. Y., Du. S., Zhao. R., Zhang. X., Zhang. L. and Zhang. D. (2009)** Apple Sucrose Transporter SUT1 and Sorbitol Transporter SOT6 Interact with Cytochrome b5 to Regulate Their Affinity for Substrate Sugars. *Plant Physiol.* 150;1880-901
- Fayek B N And Wayne H L (1979).** Detection and Characterization of Sorbitol Dehydrogenase from Apple Callus Tissue. *Plant Physiol.* 64: 69-73.
- The French–Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization (2007).** The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature.* 449: 463–468.
- Gabbay K.H. (1973).** The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *New Engl. J. Med.* 288; 831–836.
- Gao Zhifang, Maurousset Laurence, Lemoine Remi, Yoo Sang-Dong, van Nocker Steven, and Loescher Wayne (2003).** Cloning, Expression, and Characterization of Sorbitol Transporters from Developing Sour Cherry Fruit and Leaf Sink Tissues. *Plant Physiol.* 131; 1566–1575
- Gibeaut, Hulett, Cramer, Seeman. 1997.** Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiol.* 115: 317-319
- Grimplet J., Deluc L.G., Tillett R.L., Wheatley .D., Schlauch K., ramer G.R. and Cushman J.C. (2007);** Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues ; *BMC Genomics* 8:187
- Hansen, P. (1970).** 14C-studies on apple trees. V. Translocation of labelled compounds from leaves to fruit and their conversion within the fruit. *Physiol. Plant* 23; 564–573.
- Haseloff, J., Amos, B. (1995).** GFP in plants. *Trends in genetics* 11:328-329
- Johansson K., El-Ahmad M., Kaiser C., Jörnvall H., Eklund H., Höög J., Ramaswamy S., (2001)** Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chemico-biological interactions.* 130–132; 351–358
- Kalliopi A. Roubelakis-Angelakis and W. Mark Kliewer (1979)** The Composition of Bleeding Sap from Thompson Seedless Grapevines as Affected by Nitrogen Fertilization *Am. J. Enol. Vitic.* 30; 14-18
- Kuo, T.M., Doehlert, D.C., Crawford, C.G., (1990).** Sugar metabolism in germinating soybean seeds. Evidence for the sorbitol pathway in soybean axes. *Plant Physiol.* 93; 1514–1520.
- Landy, A. (1989)** Dynamic, Structural and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58; 913-949.

- Lewis D.H., (1984).** Physiology and metabolism of alditols, in: Lewis D.H. (Ed.), *Storage Carbohydrates in Vascular Plants*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 157–179.
- Lo Bianco R., Rieger M., Sung S.J.S., (2000)** Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach, *Physiol. Plant.* 108; 71–78.
- Matic S., Akerlund H., Everitt E. & Widell S. (2004)** Sucrose synthase isoforms in cultured tobacco cells. *Plant Physiol Biochem.* 42; 299–306.
- Meng, Y., Xu, X., Khanizadeh, S., Zhang, M., Wang, Q., Han, Z (2008)** The contribution of abscisic acid to sorbitol accumulation in drought-stressed *Malus hupehensis*. - *J. Food Agr. Environ.* 6; 319-326.
- Moing A., Carbonne F., Zipperlin B., Svanella L., Gaudillère J.P., (1997)** Phloem loading in peach: symplastic or apoplastic?, *Physiol. Plant.* 101; 489–496.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Takan, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T. (2007)** Development of Series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation. *J Biosci Bioeng.* 104;34-41.
- Newcomb Richard D., Crowhurst Ross N., P. Gleave Andrew, Rikkerink Erik H.A., Allan Andrew C., Beuning Lesley L., Bowen Judith H., Gera Emma, Jamieson Kim R., Janssen Bart J., Laing William A., McCartney Steve, Nain Bhawana, Ross Gavin S., Snowden Kimberley C., Souleyre Edwige J.F., Walton Eric F., and Yauk Yar-Khing (2006)**Analyses of Expressed Sequence Tags from Apple. *Plant Physiology.*141; 147–166,
- Noiraud, N., Maurousset, L., Lemoine, R. (2001).** Review Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 717–728
- Nosarszewski M, Clements A M, Downie A B y Archbold D D (2004).** Sorbitol dehydrogenase expression and activity during apple fruit set and early development. *Physiol Plant.* 121; 391–398.
- Ohta Kazuhiro, Moriguchi Ryo, Kanahama Koki, Yamaki Shohei, Kanayama Yoshinori (2005)** Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochemistry.* 66; 2822–2828
- Pauly T., Ekstrom J., Beebe D., Chrnyk B., Cunningham D., Griffor M., Kamath A., Lee S., Madura R., McGuire D. (2003)** X-Ray Crystallographic and Kinetic Studies of Human Sorbitol Dehydrogenase. *Structure.* 11; 1071–1085.
- Popp M., Smirnoff N. (1995).** Polyol accumulation and metabolism during water stress, in: Smirnoff M. (Ed.), *Environment and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimation*, Bioscientific Publishers Ltd, Oxford, , pp. 199–215.
- Pommerrenig, B. Papini-terzi, F.S.and Sauer, N.(2007)** Differential Regulation of Sorbitol and Sucrose Loading into the Phloem of *Plantago major* in Response to Salt Stress. *Plant Physiol.* 144; 1029-1038.

- Rossmann, M.G, Moras, D., Olsen, K.W.(1974).** Chemical and biological evolution of a nucleotide binding domain. *Nature*. 250; 194-199.
- Sakai A., (1961)** Effect of polyhydric alcohols to frost hardiness in plants, *Nature*. 1189; 416-417.
- Shen B., Jensen R.G. & Bohnert H.J. (1997)** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol*. 113; 1177-1183
- Shen, B., Hohmann, S., Jensen, R.G and Bohnert, H.J(1999).** Roles of Sugar Alcohols in Osmotic Stress Adaptation. Replacement of Glycerol by Mannitol and Sorbitol in Yeast. *Plant Physiology*, 121; 45-52
- Šircelj, H., Tausz, M., Grill, D., Batič, F (2007)** Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Sci. Hort*. 113; 362-369.
- Schaffer A.A. & Petreikov M. (1997)** Inhibition of fructokinase and sucrose synthase by cytosolic levels of fructose in young tomato fruit undergoing transient starch synthesis. *Physiol Plant*. 101, 800-806.
- Sheveleva E.L., Marquez S., Chmara W., Zegeer A., Jensen R.G. & Bohnert H.J. (1998)** Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. High amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. *Plant Physiol*. 117; 831-839.
- Staněk J., Černý M., Kocourek J., Pacák J.,(1963)** The monosaccharides. Publishing house of the czechoslovak academy of science Prague
- Tari I., Kiss G., Deér A.K., Csiszár J., Erdei L., Gallé Á., Gémes K., Horváth F., Poór P., Szepesi Á. and Simon L.M. (2010)** Salicylic acid increased aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress. *Biologia Plantarum*. 54; 677-683.
- Taravati A. Shokrzadeh, M. Ebadi A.G., Valipour P. Hassa. T.M. and Farrokhi, F.(2007)** Various Effects of Sugar and Polyols on the Protein structure and Function: Role of Osmolyte on Protein Stability. *World Applied Science Journal*. 2; 353-362.
- Yancey, P.H, Clark, M.E., Hand S.C., Bowlus R.D. and Somero G.N. (1982)** Living with water stress: evolution of osmolyte system. *Science*. 217; 1214-1222
- Wang, X., Xu, Y., Peng, C., Fan, R. and Gao, X. (2009)** Ubiquitous distribution and different subcellular localization of sorbitol dehydrogenase in fruit and leaf of apple. *J Exp Bot*. 60; 1025-1034.
- Watari, J., Kobae, Y., Yamaki, S., Yamada, K., Toyofuku, K., Tabuchi, T and Shiratake, K. (2003)** Identification of Sorbitol Transporters Expressed in the Phloem of Apple Source Leaves . *Plant Cell Physiol*. 45; 1032-1041.
- Webb, K.L., Burley, J.W.A., (1962).** Sorbitol translocation in apple. *Science* 137; 766.

Williams M.W., Raese J.T., (1974) Sorbitol in tracheal sap of apple as related to temperature, *Physiol. Plant.* 30; 49-52.

Zhou R., Sicher R.C., Quebedeaux B.(2002) Apple leaf sucrose-phosphate synthase is inhibited by sorbitol-6-phosphate *Funct. Plant Biol.* 29;569-574

Nombre del Sitio	Dirección Web
Chilean fresh fruit	http://www.chileanfreshfruit.com/newchileanfreshfruit/especie.asp?id_especie=121&ID_IDIOMA=2
NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov
ClustalW2	www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
Plexdb	www.plexdb.org