



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



“Obtención y análisis de tomates transformados estable y transitoriamente con el gen que codifica para Sorbitol deshidrogenasa (SDH) obtenido de *Malus x domestica*, y clonación de dos SDH en el vector PCP”

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

Francisca Victoria Díaz Tapia

Director del Seminario de Título: **Michael Handford, PhD**

Co-director(a): **Dra. Claudia Stange**

Agosto de 2013

Santiago, Chile.



“Obtención y análisis de tomates transformados estable y transitoriamente con el gen que codifica para Sorbitol deshidrogenasa (SDH) obtenido de *Malus x domestica*, y clonación de dos SDH en el vector PCP”

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

FRANCISCA VICTORIA DIAZ TAPIA

Dr. Michael Handford
Director Seminario de título

Firma manuscrita de Michael Handford en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dra. Claudia Stange
Co-directora

Firma manuscrita de Claudia Stange en tinta azul sobre una línea horizontal.



Comisión de evaluación Seminario de título

Dra. Victoria Guixé
Presidenta comisión

Firma manuscrita de Victoria Guixé en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dra. Lorena Norambuena
Correctora

Firma manuscrita de Lorena Norambuena en tinta azul sobre una línea horizontal.



A mis padres por apoyarme siempre

BIOGRAFIA

Nací un primaveral 24 de Octubre de 1988, en la ciudad de San Felipe (V región). Bajo el fuerte temperamento de un escorpión, desde pequeña hice notar mi impulsividad, gustos y fuerte temperamento. Rodeada siempre de una familia numerosa y cariñosa, tuve una infancia muy feliz junto a mis hermanos y mis primos, con los cuales compartimos juegos, risas y numerosas tardes en San Felipe, en la casa de mis abuelos. Criada por una madre muy cariñosa y un padre muy exigente, pienso que he logrado alcanzar un equilibrio entre estas dos virtudes, lo que caracteriza mi personalidad alegre y perseverante.



Estudí mi educación básica en el colegio de monjitas: Nuestra Señora del Carmen, en el cual descubrí mi gran interés y habilidades en la ciencia. Luego, me cambié al colegio Pedro de Valdivia, en donde termine mi enseñanza media. En este colegio hice amistades que hasta el día de hoy perduran y son muy importantes en mi vida. Además, tuve a grandes profesores que me inspiraron y motivaron a ser cada vez mejor. De este colegio me llevo unos bellos recuerdos, al igual que numerosos premios que destacan mi rendimiento y disciplina.

Durante mis años en el colegio pertencí a los scouts del grupo Antupaihue, un grupo que desarrolló en mí un nivel más alto de independencia y un creciente interés por la naturaleza y los viajes. Durante este periodo lo pasé increíble, conocí distintas ciudades y lugares de Chile. Lo favorable, es que muchas de mis amigas de colegio también participaban, por lo tanto, tenemos numerosas anécdotas juntas.

En la universidad, además de las infinitas tardes de estudio junto a mis buenos amigos, participé en el equipo de tenis de la Facultad de Ciencias (más como aficionada que profesional) disfrutando de los duros entrenamientos y agradables tardes con mis compañeros de equipo. Además, en el último año me incorporé al grupo de sustentabilidad del campus (JGM sustentable). Llegué al laboratorio de Biología molecular vegetal luego de algunos ramos del área que despertaron mi interés por el mundo de las plantas. En este laboratorio aprendí de excelentes profesores y algunos compañeros que me ayudaron durante este proceso. Aunque muchas veces ha sido agotador y extenuante, no me arrepiento de la decisión que tomé años atrás, cuando elegí la carrera que quería estudiar.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres por todo el apoyo, esfuerzo y confianza que han depositado siempre en mí. Les agradezco todo su sacrificio para asegurarse que no nos faltara nada. Gracias por darme una vida muy feliz. A mi madre, por todo su apoyo y buenas energías, en especial por entender mi mal genio en los momentos de mayor estrés. A mi padre, por ser muy exigente y cuidarme mucho.

A mis hermanos, que son fundamentales en mi vida, por alegrarme y compartir los buenos y malos momentos. A mi hermano mayor, por ser un pilar en mi vida, con su ayuda y generosidad en todo ámbito de cosas. A mi hermana pequeña, por hacerme reír siempre y por su compañía siempre que la necesito.

A la Deli, mi amiga y nana, que ha estado con nosotros por más de 16 años. Cuidándonos desde chicos, y haciendo los platos más deliciosos que existen.

A mi tutor, profe Mike, por aceptarme en su grupo y enseñarme durante todo este proceso. Aprecio profundamente su paciencia y sabiduría, y además sus consejos de vida. Para mí, es el mejor profesor que podría haber tenido. Agradezco todas las oportunidades y ayudas que siempre me ha facilitado. Mis logros, son en una gran parte gracias a él.

A los otros profesores del lab: Profe Lili y Profe Lore, y en especial a la Profe Clau, por ser una persona muy cercana, con buenos consejos y disposición para ayudar.

A mi team (MH) y amigos de laboratorio, que sin su ayuda, esto hubiese sido mucho más difícil, en especial a Fran, Sofi, Diego, Joel, Jaque, Juanca y Pauli. Además de los otros miembros del Lab, que hicieron de este proceso algo más divertido y acogedor: Ariel, Talo, Aliosha, Romi, Dani, Caro, Hita, Dani, Tito.

Agradezco al Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, en general, por la ayuda y comentarios para poder mejorar. A la Ange y al Seba, por mantener en orden el laboratorio.

A mis amigos y grupo de estudio, por todas las noches que pasamos de largo aprendiendo y ayudándonos entre nosotros: Romi, Marlene y Aliosha.

A mis amigas de colegio, que aunque a veces las tengo un poco botadas, siempre las recuerdo: Coni, Feña, Tami, Nachis, Fania, Giani, Caro, Chio. Gracias por estar en todos los momentos importantes durante estos años, y ayudarme a salir del estrés de vez en cuando.

Y en especial a Marco, que ha sido una persona muy importante en mi vida durante los últimos 4 años. Agradezco toda la ayuda, paciencia y amor que me has entregado en este tiempo. Gracias por entenderme y estar siempre conmigo.

INDICE

BIOGRAFIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE	v
LISTADO DE FIGURAS.....	x
LISTADO DE TABLAS	xiii
ABREVIATURAS Y DEFINICIONES	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos generales del mercado.....	1
1.1.1 Producción de manzanas en el mundo y en Chile	1
1.1.2 Generación de nuevas variedades vegetales.....	2
1.2. Metabolismo de azúcares en manzanas	3
1.2.1 Dulzor en el fruto.....	3
1.2.2 Acumulación de azúcares y su importancia fisiológica.....	4
1.2.3 Metabolismo del sorbitol en plantas de la familia Rosácea	5
1.2.4 Sorbitol deshidrogenasa (SDH)	7

1.2.5 Nuevas variedades vegetales en Chile.....	9
1.3 Vectores pCambia.....	10
1.3.1 Sobre-expresión fruto específica utilizando vectores pCambia.....	11
1.4 Transformación estable y transitoria de sistemas vegetales	12
1.4.1 Tomate como planta modelo.....	13
1.5 Vector PCP y resistencia al herbicida BASTA.....	14
1.6 Estrategia desarrollada	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo General	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 REACTIVOS	17
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO	17
3.2.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> utilizadas.....	17
3.2.2 Obtención de frutos de tomate para ensayos de expresión.	17
3.2.3 Obtención de semillas para la transformación estable de tomate	18
3.3 TRABAJO CON BACTERIAS	18
3.3.1 Obtención de células <i>E. coli</i> quimiocompetentes	19

3.3.2 Transformación de <i>E. coli</i> por golpe térmico	19
3.3.3 Obtención de células quimiocompetentes de <i>A. tumefaciens</i>	19
3.3.4 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> por golpe térmico	20
3.4 EXTRACCIONES DE ADN	20
3.4.1 Purificación de ADN plasmidial desde <i>E. coli</i>	20
3.4.2 Purificación de ADN plasmidial de <i>A. tumefaciens</i>	20
3.4.3 Purificación de ADN genómico desde plantas de tomate	21
3.5 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	22
3.5.1 Cuantificación y análisis de la calidad del ADN total	22
3.5.2 Diseño de partidores específicos para la clonación en vector PCP	23
3.5.3 Reacciones de PCR	23
3.5.4 Reacción de PCR de colonia	24
3.5.5 Purificación de ADN desde geles de agarosa	27
3.5.6 Secuenciación	27
3.5.7 Clonamiento de fragmentos de interés por el sistema pCR [®] 8	27
3.5.8 Digestiones enzimáticas	28
3.5.9 Clonamiento de fragmentos de interés en el vector PCP	29
3.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN	29

3.6.1 Transformación transitoria de frutos de tomate	29
3.6.2 Extracción de proteínas desde frutos de tomate	30
3.6.3 Cuantificación de proteínas totales.....	30
3.6.4 Medición de actividad en los extractos de proteínas	31
3.7 CULTIVO IN VITRO Y TRANSFORMACIÓN DE TOMATES.....	31
3.7.1 Esterilización y sembrado de semillas de tomate.....	31
3.7.2 Obtención de explantes de tomate	32
3.7.3 Transformación de explantes mediante <i>A. tumefaciens</i>	32
3.7.4 Regeneración de explantes de tomate mediante organogénesis somática.	33
3.7.5. Medios para el desarrollo <i>in-vitro</i> de plántulas de tomate	33
3.7.6 Análisis mediante PCR para confirmar plantas de tomate transgénicas.....	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Generación de tomates transformados establemente.....	36
4.1.1. Primer intento de generación de plantas transgénicas de tomate.....	36
4.1.2. Análisis molecular de tomates transgénicos: Aílsa Craig	38
4.1.3 Segundo intento de generación de plantas transgénicas de tomate.....	39
4.1.4. Análisis molecular de tomates transgénicos: Micro Tom.....	43
4.2 Análisis bioquímicos de actividad de SDH.....	45

4.2.1 Análisis de actividad con extractos de proteínas obtenidos de la transformación transitoria de frutos de tomate	45
4.2.2 Análisis de actividad con extractos de proteínas obtenidos de la transformación estable de frutos de tomate Micro-Tom	49
4.3 Clonación de los fragmentos obtenidos del vector pCambia en el vector PCP	52
5. DISCUSIÓN	61
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	69
7. CONGRESOS	72
8. REFERENCIAS	73

LISTADO DE FIGURAS



Figura 1: Metabolismo del sorbitol en manzanos

Figura 2: Reacción catalizada por la Sorbitol deshidrogenasa

Figura 3: Transformación transitoria de tomates variedad Micro-Tom.

Figura 4: Organogénesis somática de explantes de tomate Ailsa Craig transformados con el vector PG-GFP mediante *A. tumefaciens*

Figura 5: Amplificación de los genes 18S, GFP y hptII a partir de ADN genómico de plantas de tomate transformadas establemente con el vector PG-GFP, y obtenidas del proceso de organogénesis somática

Figura 6. Organogénesis somática de explantes de tomate, variedad Micro-Tom, transformados con los vectores 35S-MdSDH y 35S-GFP mediante *A. tumefaciens*.

Figura 7: Amplificación de los genes 18S, MdSDH y GFP a partir de ADN genómico de plantas de tomate transformadas establemente con el vector 35S-MdSDH, y obtenidas del proceso de organogénesis somática.

Figura 8: Amplificación de los genes 18S, GFP y MdSDH a partir de ADN genómico de plantas de tomate transformadas establemente con el vector 35S-GFP, y obtenidas del proceso de organogénesis somática.

Figura 9: Procedimiento de infiltración de frutos de tomate.

Figura 10: Actividad SDH en los frutos de tomates comerciales transformados transitoriamente con los vectores pCambia 35S-MdSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH y PG-GFP.

Figura 11: Actividad promedio de SDH en los frutos de tomates comerciales transformados transitoriamente con los vectores pCambia 35S-MdSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH y PG-GFP.

Figura 12: Análisis de actividad de SDH en los tomates Micro-Tom transformadas establemente con 35S-MdSDH y 35S-GFP.

Figura 13: Análisis del promedio de actividad de SDH en los tomates Micro-Tom transformadas establemente con 35S-MdSDH y 35S-GFP.

Figura 14: Amplificación de los fragmentos promotor-gen-terminador a partir de los vectores pCambia.

Figura 15: PCR de colonia para verificar la presencia de pCR8-35S-MdSDH-NOS, pCR8-35S-LeSDH-NOS y pCR8-PG-MdSDH-NOS en *E. coli*.

Figura 16: Digestión enzimática del vector pCR8-35S-MdSDH-NOS.

Figura 17: Digestión enzimática del vector pCR8-35S-LeSDH-NOS.

Figura 18: Digestión enzimática del vector pCR8-PG-MdSDH-NOS.

Figura 19: Diagrama de hibridación de los partidores que se utilizaron para la secuenciación.

Figura 20: Digestión enzimática secuencial del vector pCR8-35S-LeSDH-NOS y del vector de llegada PCP.

Figura 21: PCR de colonia de *E. coli* para corroborar la transformación con vector PCP-35S-LeSDH-NOS, PCP-35S-MdSDH-NOS y PCP-PG-MdSDH-NOS.

Figura 22: PCR y análisis de restricción de ADN plasmidial obtenido de *E. coli* transformadas con el vector PCP-35S-LeSDH-NOS, PCP-35S-MdSDH-NOS y PCP-PG-MdSDH-NOS.

Figura 23: PCR de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con PCP-35S-MdSDH-NOS, PCP-35S-LeSDH-NOS y PCP-PG-MdSDH-NOS.

LISTADO DE TABLAS

Tabla I. Programas de PCR utilizados para el desarrollo de este Seminario de Título

Tabla II. Partidores utilizados en este Seminario de Título.

Tabla III. Composición de medios para las variedades Ailsa Craig y Red Cherry

Tabla IV. Composición de medios para la variedad enana Micro-Tom.

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES



Agua NP	Agua nanopura (libre de nucleasas)
CTAB	Cetil trimetil amonio bromuro
D.O.₆₀₀	Medición de densidad óptica a 600 nm.
ddf	días después del florecimiento completo (<i>after full bloom</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxiribonucleótido Tri-fosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Proteína fluorescente verde)
gpf	Gramos peso fresco
hptII	gen de la higromicina fosfotransferasa (Gen de resistencia a higromicina)
LB	Medio Luria Bertani
LeSDH	Sorbitol deshidrogenasa de tomate
MdSDH	Sorbitol deshidrogenasa de manzano
MS	Medio Murashigue & Skoog
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NP	Nanopura
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PG	Poligalacturonasa
PM	Peso molecular
PVPP	Polivinil polipirrolidona
rpm	revoluciones por minuto
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAE	Tris-acetato EDTA
T-Nos	Terminador de nopalina sintasa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad enzimática

RESUMEN

La sorbitol deshidrogenasa (SDH) es la principal enzima involucrada en el metabolismo del sorbitol en especies de la familia de las rosáceas, tales como manzanos o duraznos. Durante la maduración de los frutos, SDH cataliza la oxidación de sorbitol a fructosa, azúcar que posee una mayor sensación de dulzor que el sorbitol. Por lo tanto, SDH juega un papel importante en el aumento de la dulzura natural de la fruta durante el desarrollo. Esto hace a la SDH una candidata excelente para modular la composición de azúcares en el fruto, dado que el aumento de su expresión específica en este órgano provocaría la oxidación del sorbitol remanente, que no ha sido metabolizado durante el proceso de maduración. Con el fin de generar una nueva variedad de manzanas con frutos más dulces, se utilizaron vectores binarios en los que una SDH de manzana (*MdSDH*) se encuentra bajo el control de dos promotores diferentes, uno constitutivo (35S) y el otro fruto-específico (PG). En primer lugar, para comprobar su funcionalidad, se utilizaron plantas de tomate como sistema modelo, las cuales se transformaron establemente con *Agrobacterium tumefaciens*, que portaba los vectores nombrados anteriormente. Se eligió esta especie como sistema modelo ya que es de crecimiento rápido y genera frutos tempranamente, en comparación con el manzano. De esta manera se pudo evaluar la funcionalidad de los vectores en el corto plazo, al contraste de haberlo realizado inmediatamente en el manzano, el cual se demora entre 4-5 años en dar frutos. Luego de que las plantas de tomate se transformaran, se seleccionaron en medios suplementados con higromicina. De las plantas resistentes se hicieron extracciones de ADN genómico y posteriormente análisis de PCR. Estos determinaron que las plantas seleccionadas efectivamente poseían *MdSDH* insertado en el genoma. En segundo lugar, ensayos de actividad enzimática SDH mostraron que los frutos de plantas transformadas establemente (transgénicas) con el vector 35S-*MdSDH*, presentan una mayor actividad SDH en comparación con su control 35S-GFP. Lo mismo ocurre con los frutos transformados transitoriamente con 35-

MdSDH o PG-MdSDH, los cuales poseen mayor actividad SDH que los frutos transformados con los vectores controles (35S-GFP o PG-GFP, respectivamente).

Por último, se clonaron las SDH de manzana (*MdSDH*) y de tomate (*LeSDH*), bajo los promotores 35S y PG en otro vector binario llamado PCP, el cual presenta resistencia al herbicida BASTA y no a un antibiótico de selección bacteriano (kanamicina). Los vectores generados, PCP-35S-MdSDH-NOS, PCP-35S-LeSDH-NOS y PCP-PG-MdSDH-NOS, que otorgan resistencia a la herbicida BASTA, pueden ser utilizados en trabajos futuros.

ABSTRACT

Sorbitol dehydrogenase (SDH) is the main enzyme involved in the metabolism of sorbitol in Rosaceae fruit species, such as apples and peaches. This enzyme catalyses the oxidation of sorbitol to fructose, a sugar which is sweeter than sorbitol. Thus, SDH plays an important role in naturally increasing fruit sweetness during development. This makes SDH an excellent candidate for modulating the composition of sugars in the fruit, given that its specific over-expression in this organ would lead to the oxidation of the sorbitol which is not metabolized during the ripening process. With the aim of developing a new variety of apples with sweeter fruits, previously-generated binary vectors in which apple SDH (MdSDH) has been cloned under the control of two different promoters, one constitutive (35S) and the other fruit-specific (PG) were used. Firstly, to test their functionality, tomato plants were used as a model system; they were stably transformed using *Agrobacterium tumefaciens* harbouring these vectors. This species was chosen as a model system because it is fast growing and produces fruits in months, compared to years with the apple, making it possible to evaluate the functionality of the vectors in the short term. After the stable transformation of tomato plants, the potential transformants were selected on media containing hygromycin. Genomic DNA was extracted from the hygromycin-resistant plants and PCR analysis determined that they effectively possess MdSDH inserted in the tomato genome. Secondly, enzyme activity assays showed that fruits of the tomatoes stably-transformed tomatoes with the 35S-MdSDH vector had a higher activity than their control 35S-GFP. Additionally, a similar increase was observed in tomato fruits transiently transformed with 35S-MdSDH and PG-MdSDH, which had greater SDH activity than their controls (35S-GFP and PG-GFP, respectively).

Furthermore, SDHs from apple (MdSDH) and tomato (LeSDH) were cloned under the 35S and PG promoters in another binary vector called PCP, which harbours resistance to the herbicide BASTA instead of resistance to the antibiotic kanamycin. The resulting PCP-35S-

MdSDH-NOS, PCP-35S-LeSDH-NOS and PCP-PG-MdSDH-NOS vectors, which harbor resistance to the herbicide BASTA, can be used in future research.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales del mercado

1.1.1 Producción de manzanas en el mundo y en Chile

La producción de manzanas (*Malus x domestica*) en el mundo y sus exportaciones están lideradas por unos pocos países, entre los que destaca la participación de Chile. Específicamente, dos tercios de las exportaciones mundiales de manzanas son controlados por seis países: China, Chile, Italia, Estados Unidos, Polonia y Francia (ODEPA, 2011). En el año 2012, China lideraba el rubro con una participación de 14,2%, seguida de Chile con un 11,4%.

En Chile, los manzanos ocupan la segunda posición de las especies frutícolas más plantadas en el país, cubriendo cerca del 13% de la superficie frutícola nacional. Las Regiones del Maule y de O'Higgins concentran el 60% y 28,8%, respectivamente de la superficie plantada con esta especie (ODEPA, 2011). Los manzanos rojos, por su parte, representan cerca del 80% de las plantaciones de manzanos totales del país y, según las últimas mediciones (ODEPA, 2011), se registra a la variedad Fuji como uno de los principales exponentes.

La variedad Fuji fue creada mediante el cruce entre las variedades Ralls Janet y Delicious en 1939, por la National Fruit Research Station en Japón. En Chile, se cosecha la variedad Fuji entre Marzo y Diciembre, y tiene la ventaja (frente a otras variedades vegetales) de que puede ser conservada en frío por 6-8 meses bajo condiciones controladas sin sufrir cambios considerables en sus cualidades organolépticas (Moggia y Yuri, 2003).

El año 2011 las exportaciones de manzana fresca alcanzaron las 800 mil toneladas, las cuales recaudaron 667 millones de dólares. Entre las variedades exportadas, la Fuji correspondía a 63.218 toneladas que equivalía a 67 millones de dólares, aproximadamente el 10% de la producción total de manzanas de exportación del país (ODEPA, 2011).

Para el subsector de la agricultura, se espera que en el año 2013 se produzca un aumento entre el 9-10% con respecto al año 2012 y que siga un incremento constante para los próximos años (ODEPA, 2012). Estas cifras generan un gran desafío para la industria frutícola chilena, ya que debe mantener e incrementar su liderazgo hemisférico y mundial en la exportación de estos frutos (ODEPA, 2009).

Con este fin surge la necesidad de generar nuevas y mejores variedades de frutas. A la fecha, han sido creados varios consorcios con el objetivo de aumentar la rentabilidad y competitividad de la industria frutícola de exportación, a través de la implementación de un programa nacional de investigación orientado a obtener nuevas variedades o mejorar las actuales (www.chilepotenciaalimentaria.cl).

1.1.2 Generación de nuevas variedades vegetales

Durante los últimos años, Chile ha estado interesado en la generación de nuevas variedades vegetales que le aseguren mayor estabilidad y un mejor posicionamiento en el mercado mundial. Se ha estado tramitando la adhesión de Chile a UPOV91 (International union for the protection of new varieties of plants), el cual es un paso necesario para proteger debidamente los derechos de los creadores de las nuevas variedades vegetales, según determinó el Ministro de Economía el año 2011. El 95% de las variedades registradas en Chile corresponden a variedades extranjeras y su utilización conlleva a pagos de Royalty. Es por este motivo que el estado chileno ha priorizado la generación de nuevas variedades vegetales mediante el financiamiento de proyectos nacionales. El interés se encuentra en generar variedades de buena productividad, larga vida en poscosecha para su exportación, un bajo requerimiento de mano de obra y la obtención de frutos en distintas temporadas para lograr ser competitivos con los demás productos internacionales, además de generar variedades con ventajas en sus cualidades organolépticas o nutricionales (Ministerio de Agricultura, 2011).

Hay dos maneras de obtener nuevas variedades vegetales. Por una parte, el fitomejoramiento clásico se basa en el entrecruzamiento de variedades vegetales distintas con características de interés para que la progenie de estos parentales tenga las características deseadas. Este procedimiento está sujeto a la compatibilidad sexual de las variedades y tiene como ventajas que es un proceso con buenos resultados a largo plazo, y aceptado por la población en general, al ser un mejoramiento de tipo natural. Por otra parte, los adelantos en el campo científico han permitido que se desarrollen otros métodos para lograr los mismos objetivos. Últimamente se ha estado utilizando el fitomejoramiento por ingeniería genética, en el cual se introduce un gen de interés de un organismo en una variedad vegetal específica, con la finalidad de que se exprese la característica deseada. Este método, además de ser efectivo y tener resultados en el corto plazo, permite una evaluación temprana, lo que no se logra con el fitomejoramiento clásico, teniendo una ventaja considerable sobre este método. En Chile se han estado implementando los dos tipos de mejoramiento genético para obtener nuevas variedades vegetales, aunque el mejoramiento por ingeniería genética se ve limitado en términos comerciales por la actual legislación, ya que se permite solamente la internación de semillas transgénicas para su multiplicación y posterior exportación (SAG, Resolución exenta 1523, 2011).

1.2. Metabolismo de azúcares en manzanas

1.2.1 Dulzor en el fruto

La calidad de un fruto es evaluada organolépticamente y depende de numerosos factores tales como el aroma (compuestos aromáticos), el dulzor y la acidez. El dulzor es una de las cualidades organolépticas más apreciadas por los consumidores, y su incremento se produce en el proceso de maduración del fruto (Visser y cols, 1968). En esta etapa, aumenta el contenido de hidratos de carbono sencillos y, al mismo tiempo disminuyen los ácidos. En el fruto

hay dos tipos de carbohidratos, los azúcares y los alcoholes de azúcar o polioles, los cuales son la forma reducida de los azúcares (Mingjun y cols, 2012). Entre los azúcares se encuentran la fructosa y la glucosa (simples); y la sacarosa (disacárido). Entre los polioles en manzana destacan el sorbitol y manitol; y existen otros como xilitol y ribitol (Reidel y cols, 2009).

El dulzor está determinado por el contenido total de azúcares que presenta el fruto, así como por el tipo de azúcar y su concentración. Se ha reportado que el rango de dulzor de los azúcares de manzanas va desde el sorbitol, el cual es un compuesto de menor dulzor, hasta la fructosa, la cual es un azúcar de mayor dulzor. En otras palabras, el orden de los carbohidratos en términos de dulzor es el siguiente: sorbitol < glucosa < sacarosa < fructosa (Génard y Souty, 1996), donde sorbitol es un 10% menos dulce que la glucosa, 40% menos que la sacarosa y 60% menos que la fructosa (Burt, 2006). Por lo tanto, lo dulce que pueda llegar a ser el fruto, depende tanto de la cantidad de azúcares que posee, como de la composición de éstos.

Dentro de la célula, el 90% de cada azúcar (glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol) se encuentra en la vacuola, más aún, la concentración de azúcares totales en el interior de la célula es de 326 mM en la fruta de manzana inmadura y de 937 mM en la fruta madura. A su vez, se ha estudiado que la permeabilidad a los azúcares a través de la membrana plasmática y el tonoplasto también se incrementa con la maduración de la manzana (Yamaki y Ino, 1992). En conclusión, el incremento del dulzor, que conlleva el proceso de acumulación de azúcares es un proceso muy regulado y que involucra variados factores.

1.2.2 Acumulación de azúcares y su importancia fisiológica

Los azúcares son responsables de mantener la turgencia celular que provoca el crecimiento de los frutos y también son los responsables del incremento del dulzor en el fruto durante la maduración y poscosecha. Varios procesos y factores afectan la acumulación de azúcares en el fruto, entre ellos se encuentran: la fotosíntesis, biosíntesis de azúcares

translocables, transporte de azúcares por el floema, la translocación de azúcares desde hojas hasta frutos (órgano sumidero) y conversión de azúcares translocables en otros azúcares que se acumulan en las células del fruto (Kanayama y cols, 2008). Se ha reportado que la acumulación de fotosintatos en las hojas disminuye la expresión de genes relacionados a la fotosíntesis (Rolland y cols, 2002), por lo tanto la acumulación eficiente de azúcares en el fruto contribuye a mantener una alta tasa fotosintética en las hojas, ya que los fotosintatos se mueven desde las hojas hacia otros tejidos como los frutos.

Los azúcares presentes en los frutos provienen de dos fuentes: la primera es la degradación del almidón en el proceso de maduración del fruto y la segunda es la incorporación de azúcares translocados vía floema. En el primer caso, el almidón se acumula desde el proceso de floración, desde 1 mg/gpf hasta 25 mg/gpf transcurridos 130 días después del proceso de floración (ddf). A contar del día 150 ddf comienza el proceso de maduración del fruto y el almidón es degradado mediante amilasas que hidrolizan el almidón desde el centro del fruto hacia la periferia (Moggia y Pereira, 2006). Esto provoca el incremento del contenido de azúcar (concentración de solutos solubles), provocando un aumento en el dulzor del fruto (Thammawong y Arawaka, 2007). En el segundo caso, los azúcares provienen de una fuente exógena a través del floema. Este es el caso de carbohidratos tales como el sorbitol o la sacarosa, los cuales son productos de la fotosíntesis, que se traslocan hasta llegar a los órganos sumideros (Reidel y cols, 2009).

1.2.3 Metabolismo del sorbitol en plantas de la familia Rosácea

La familia de las Rosáceas comprende especies vegetales de fruto carnoso tales como el manzano, el durazno, los nectarines, las ciruelas, entre otros. La característica principal de esta familia es que produce sorbitol como el principal fotosintato en hojas y representa el 90% de los compuestos translocados por el floema (Teo y cols, 2006). El sorbitol, también llamado

glucitol, es un alcohol de azúcar (poliol). Al ser un azúcar reducido con alta solubilidad, es apropiado para la translocación de carbono.

El sorbitol es sintetizado por la reducción de la glucosa-6- fosfato a sorbitol-6-fosfato, debido a la acción de la enzima aldosa-6-fosfato reductasa dependiente de NADPH (A6PR), reacción llevada a cabo en el citoplasma de hojas maduras, las cuales son fotosintéticamente activas. Luego el sorbitol-6 fosfato es transformado a sorbitol por la enzima sorbitol-6-fosfato fosfatasa (S6PP) y una vez que ha sido sintetizado, es transportado por el floema, hacia los órganos sumideros tales como frutos, raíces y hojas jóvenes (Teo y cols, 2006). La ruta de egreso de sorbitol desde el floema hasta las células de la pulpa en frutos de manzanas, es a través de la vía apoplástica mediante transportadores específicos (Gao y cols, 2005; Zhang y cols, 2004). El sorbitol es transportado hacia el interior de las células de órganos sumideros donde es metabolizado rápidamente a fructosa por la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) (Figura 1). Esta transformación mantiene el gradiente de concentración que facilita la translocación del sorbitol desde hojas hasta el fruto (órgano sumidero) (Jackson, 2003). Una vez en las células del fruto, la fructosa es almacenada en la vacuola. Como se mencionó, el sorbitol comprende aproximadamente el 90% del total de carbohidratos solubles en el floema, y la mayoría es oxidada a fructosa dentro del fruto mediante la alta actividad que presenta la enzima SDH (Kanayama y cols, 2008). Sin embargo, la fracción de sorbitol que no es metabolizada y comprende entre un 4 a 13 mg de sorbitol/gpf (3-8%; Yamada y cols, 2006; Ohkawa y cols, 2008) tiene la potencialidad de ser metabolizado a azúcares con más poder edulcorante, como la fructosa y así otorgarle mayor dulzor al fruto.

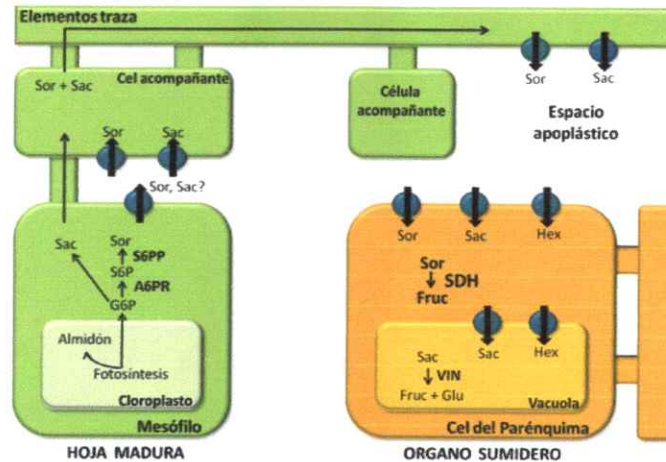


Figura 1: Metabolismo del sorbitol en manzanos: El sorbitol (Sor) y la sacarosa (Sac) son sintetizados en hojas maduras desde G6P (glucosa-6-fosfato). El sorbitol es sintetizado mediante la enzima aldosa-6-fosfato reductasa (A6PR) y sorbitol-6-fosfato fosfatasa (S6PP). Luego es translocado hacia el floema y es egresado hacia la vía apoplástica de órganos sumideros mediante transportadores específicos. En el fruto, sorbitol es convertido a fructosa (Fruc) por la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) y almacenada en la vacuola mediante transportadores de hexosas (Hex). La sacarosa es convertida a fructosa y glucosa (Glu) por invertasas (VIN). Modificado y traducido de Teo y cols, 2006.

1.2.4 Sorbitol deshidrogenasa (SDH)

La SDH es la principal enzima en el metabolismo del sorbitol en frutos de especies Rosáceas, aunque también ha sido identificada en especies no Rosáceas, tales como el tomate (*Solanum lycopersicum*) y *Arabidopsis thaliana* (Ohta y cols, 2005; Nosarzewski y cols, 2012; Aguayo y cols, 2013). Más aún, SDH ha sido detectada en mamíferos (humanos, Maret y Auld, 1988) (ovino, Rune y cols, 1992) y microorganismos (*Bacillus subtilis*, Ng y cols, 1992). Debido a su amplia distribución en especies y a su importante función, SDH ha sido caracterizada a nivel molecular, y se han identificado regiones conservadas en su secuencia, incluyendo un dominio de unión a zinc, sitio de unión a la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y los residuos involucrados en el sitio catalítico de unión preferente a sorbitol (Ohta y cols, 2005; Pauly y cols, 2003).

SDH cataliza la reacción reversible de oxidación del sorbitol a fructosa utilizando NAD^+ como cofactor (Figura 2). Se ha establecido que la K_m para la oxidación del sorbitol por la

enzima SDH de manzana es de 83 mM, y de 390 mM para la reducción de la fructosa (Park y cols, 2002). Las tasas máximas de oxidación del sorbitol y de reducción de la fructosa fueron observadas a pH 9,6 y 6 respectivamente. Además, se ha reportado que SDH tiene la capacidad de oxidar a otros polioles, como xilitol, L-arabitol, ribitol en la presencia de NAD^+ , y que polioles como el galactitol, mio-inositol, D-arabitol y glicerol, no son sustratos para la enzima purificada de manzana. La especificidad de sustrato está regida por la configuración estructural que presentan las moléculas, específicamente en la configuración quiral del C2 y C4 en los sustratos (Oura y cols, 2000). Los alcoholes de azúcar que son reconocidos como sustrato por SDH, comparten la estereoquímica quiral de C-2 (S) y C-4(R); sin embargo, aquellos que no son reconocidos presentan una quiralidad distinta como el manitol (C-2(R), C-4(R)) y galactitol (C-2(S), C-4(S)). Además, la actividad de SDH es inhibida completamente por metales pesados, aunque ZnSO_4 (0,25 mM) puede revertir esta inhibición (Negm y Loescher, 1979).

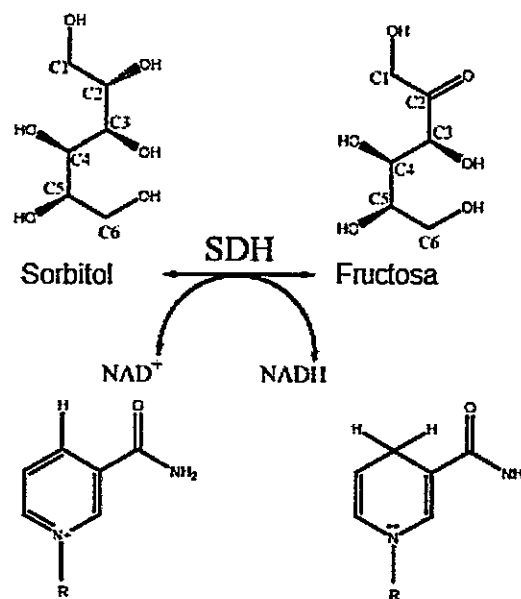


Figura 2: Reacción catalizada por la Sorbitol deshidrogenasa. El sorbitol es la forma reducida de la glucosa, y la fructosa es la forma oxidada del sorbitol. La enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) cataliza la oxidación de sorbitol a fructosa y simultáneamente ocurre la reducción de NAD^+ a NADH .

1.2.5 Nuevas variedades vegetales en Chile

Tal como se menciona en la sección 1.1.2, existen dos estrategias para generar nuevas variedades vegetales. Ambos han sido implementados en Chile. Por ejemplo, mediante mejoramiento clásico la papa Pukara-INIA fue creada en 1993 mediante el cruce de las variedades Cleopatra y Yagana para hacerla resistente a enfermedades, como al virus del enrollamiento de las hojas de papas y al virus X de papa. Mientras que mediante ingeniería genética, se están desarrollando plantas de cítricos tolerantes a salinidad INNOVA-CORFO (204-4037, PUC). Dentro de estas iniciativas, se encuentra el proyecto Innova-CORFO titulado *"Desarrollo de plántulas de una variedad premium de manzanas con mayor dulzor mediante el uso de herramientas biotecnológicas"* en el cual se enmarca el presente Seminario de Título. El producto de este proyecto está dirigido a los mercados asiáticos, los cuales han estado incrementando los volúmenes importados de manzanas en los últimos años, especialmente de la variedad Fuji. Entre los países asiáticos que muestran un mayor dinamismo en las importaciones de manzanas a nivel general, se encuentran India, Vietnam, Tailandia e Indonesia (ODEPA, 2011). Estudios de mercado indican que consumidores asiáticos prefieren frutos de mayor dulzor (Janick y cols, 1996), por lo cual desarrollar una variedad de manzana más dulce es un mercado atractivo y con un gran potencial para estos países. Para lograr el incremento en dulzor, se propone sobre-expresar SDH específicamente en frutos para convertir el sorbitol restante en las manzanas a fructosa, un azúcar con mayor poder endulcorante (sección 1.2.1).

Para lograr este objetivo global, la estrategia es la siguiente: **1.** Establecer el sistema de regeneración y transformación de manzanos, variedad Fuji, procedimiento realizado en la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC) **2.** Aislar y clonar los ADNc de SDHs caracterizadas de tomate y manzano, bajo el control de un promotor fruto-específico y un promotor constitutivo. Los vectores pCambia generados en los seminarios de título de Patricio

Mandujano (2008) y Francisca Aguayo (2010), tienen clonada la SDH de tomate (LeSDH; Ohta y cols 2005) y manzana (MdSDH2; Park y cols, 2002), respectivamente. 3. Implementación de un sistema de transformación estable y regeneración in-vitro de plantas modelo de tomate, variedad Micro-Tom. Esto con la finalidad de corroborar la funcionalidad de los promotores y de analizar la actividad de SDH en el fruto. 4. Transformar y regenerar plántulas de manzano con el/los vectores pCambia-PG-SDH y su evaluación molecular. Aunque este seminario de título está enfocado en punto 3, en la siguiente sección se profundizará acerca de los vectores pCambia (punto 2) utilizados en este trabajo.

1.3 Vectores pCambia

Los vectores utilizados en este seminario de título corresponden a los vectores pCambia obtenidos de los seminarios de título de Francisca Aguayo (2010) y Patricio Mandujano (2008). Estos vectores han sido muy utilizados en la transformación de sistemas vegetales utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (Binka y cols, 2012) y son derivados de los vectores pPZP (Hajdukiewicz y cols, 1994). Tienen varias características, entre las que se encuentran: elevado número de copias en *E. coli* para altos rendimientos de ADN, presencia del replicón pVS1 para una alta estabilidad en *Agrobacterium*, tamaño pequeño (7-12 kb), y selección para plantas con los antibióticos higromicina o kanamicina. Los distintos vectores pCambia obtenidos anteriormente en el laboratorio corresponden específicamente a los derivados del vector pCambia 1302, el que según su nomenclatura posee selección de plantas por resistencia a higromicina, selección en bacterias por el antibiótico kanamicina, sitio de múltiple clonamiento de pUC 18 y el gen reportero GFP bajo el control del promotor constitutivo, 35S del virus del mosaico de la coliflor (www.cambia.org).

1.3.1 Sobre-expresión fruto específica utilizando vectores pCambia

Se ha reportado que la distribución del sorbitol juega un papel fundamental en el metabolismo del carbono en la fruta y afecta sus atributos de calidad, tales como el balance ácido-dulce y la acumulación de almidón (Teo y cols, 2006). Si SDH se encuentra clonada bajo el promotor constitutivo 35S, se expresaría la enzima en todos los órganos, reduciendo los niveles de sorbitol en toda la planta. Se ha visto que al disminuir los niveles de sorbitol en todos los tejidos de una planta, éstas son de menor tamaño y generan frutos de menor calidad (Teo y cols, 2006). Una solución a este problema es guiar la expresión de SDH bajo un promotor fruto-específico, que controle la expresión del gen sólo en este órgano y a un tiempo determinado. El promotor de la poligalacturonasa del tomate (PG; Montgomery y cols. 1993) es un buen candidato para remediar esta situación. Esta enzima juega un papel importante en la maduración del tomate, ya que hidroliza las pectinas de la pared celular, lo que produce el ablandamiento del fruto. Estudios previos han mostrado que 1,4 kb río arriba de la secuencia de esta enzima son suficientes para conferirle la fruto-especificidad (Bird y cols, 1988). Este promotor controla la expresión de la enzima sólo en el pericarpo del fruto; sin embargo, estudios posteriores que generaron deleciones en el promotor demostraron que sólo era necesario un fragmento truncado de 806 pb para que la expresión de un gen reportero se llevara a cabo uniformemente en todo el fruto (Montgomery y cols, 1993).

Anteriormente en nuestro laboratorio se reemplazó la secuencia del promotor constitutivo 35S por la del promotor PG de 806 pb, y se obtuvo el vector pCambia-PG (Mandujano, 2008), el cual es un vector de expresión fruto-específica, que expresará el gen homogéneamente en todo el órgano. Luego con los vectores pCambia-35S y pCambia-PG se clonaron las SDH de tomate (LeSDH) y de manzana (MdSDH), que finalmente son las utilizadas en este trabajo para las transformaciones transitorias de frutos de tomate y para las transformaciones estables de plántulas de tomate.

1.4 Transformación estable y transitoria de sistemas vegetales

La transformación estable de sistemas vegetales, se refiere al evento de introducir e integrar ADN foráneo en células vegetales y regenerar plantas transgénicas. Hay diversas técnicas de transformación y regeneración, las cuales utilizan tejidos vegetales como plántulas, cotiledones y hojas. La transformación estable y la regeneración de estas plantas es un proceso laborioso y meticuloso que requiere de meses o hasta de un año para obtener una línea transgénica. Como el gran limitante es el factor tiempo, de manera paralela se han desarrollado otros métodos que permiten la evaluación de expresión de transgenes sin pasar por todo el proceso de la transformación estable. Este proceso es conocido como transformación transitoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Los tejidos vegetales son infiltrados con una suspensión de *Agrobacterium* que porta una construcción génica de interés. La ventaja de este método es que no es necesario contar con un equipamiento excesivamente costoso como en la biobalística (Tuerck y Fromm, 1994) o elaborar protocolos complicados como los protoplastos (Solano y cols, 1995). Este método es simple, eficiente y efectivo (Yang y cols, 2000), y los genes que son codificados por el plasmidio se transcriben directamente, sin tener que integrarse en el genoma de la planta (Levy y cols, 2005). El procedimiento de la agroinfiltración ha sido ampliamente utilizado en especies como *A. thaliana*, sin embargo, en el último periodo se ha estado utilizando éste en frutos de tomate (Orzáez y cols, 2006), durazno, manzana, pera (Spolare y cols, 2001) y hortalizas, como la lechuga, con los cuales se han obtenido altos porcentajes de eficiencia (Wroblewski y cols, 2006). En estudios de infiltración de frutos de tomate con un vector que codifica para el gen reportero GUS (*uidA*- β -glucuronidasa) dirigidos por el promotor 35S, se encontró que altos niveles de actividad glucuronidasa fueron detectados en los frutos luego de sólo 4 días transcurrida la agroinfiltración (Orzáez y cols, 2006) (Figura 3). En este trabajo, se implementó el sistema de transformación transitoria en el pericarpo de frutos

de tomate, para medir la actividad de SDH, correspondiente a uno de los objetivos de este seminario de título.



Figura 3: Transformación transitoria de tomates variedad Micro-Tom. En la figura se muestran los tejidos que fueron agroinfiltrados con los genes que codifican para GUS. Se logra apreciar actividad de la glucuronidasa en la parte que bordea la placenta y en el pericarpio del fruto, zona en la cual se deposita la suspensión de *Agrobacterium tumefaciens*. Extraído de Orzáez y cols, 2006.

El objetivo principal del proyecto Innova-CORFO es generar una nueva variedad de manzanos con mayor dulzor, sin embargo, la transformación de esta especie es un proceso largo que involucra aproximadamente 4 años. Por este motivo es que se ha elegido el tomate, como planta modelo ya que posee un ciclo de vida más corto y genera frutos de tomates rápidamente. De esa manera, se determinará tempranamente lo que ocurrirá teóricamente con el manzano.

1.4.1 Tomate como planta modelo

El tomate es una especie vegetal que ha sido utilizada para transformaciones estables con *Agrobacterium* desde hace varios años debido a las múltiples ventajas que presenta: fácil manipulación, ciclo de vida corto, producción de frutos rápidamente, entre otras. Entre las variedades utilizadas se encuentran Ailsa Craig, Pusa Ruby, Arka vikas, Sioux y Micro-Tom (Sharma y cols, 2009; Sun y cols, 2006). Cada variedad de tomate tiene un protocolo diferente de transformación, ya que aunque pertenecen a la misma especie, presentan diferencias en sus concentraciones endógenas de hormonas, que las hace actuar distinto frente a los medios de cultivo con hormonas. En tomate, se ha reportado una eficiencia relativamente alta de

transformación que bordea el 10%, utilizando explantes preparados según el método flamingo (Pozueta y cols, 2001; Saker y cols, 2008). En este trabajo se utilizaron tres variedades distintas; Ailsa Craig, Red Cherry y el tomate enano Micro-Tom.

1.5 Vector PCP y resistencia al herbicida BASTA

Pese a la utilidad que se ha desarrollado con los vectores pCambia, en este trabajo se clonaron las secuencias de interés: Promotor--SDH--Terminador desde los vectores pCambia (resistencia a kanamicina) en el vector PCP, el cual presenta resistencia al herbicida BASTA. Se realizó esta modificación en los vectores debido a la creciente preocupación por parte de la población a la selección de plantas transgénicas, mediante selección con antibióticos bacterianos. Esto, debido a la posibilidad percibida de transferencia horizontal de los genes de resistencia a otras cepas bacterianas, tales como las del intestino, una vez que se consumen los frutos transgénicos. Para remediar este posible problema es que se clonaron las secuencias de interés en un vector con resistencia a herbicida (BASTA).

Se utilizó el vector PCP para los clonar genes de interés correspondientes a la SDH de manzana (MdSDH) y tomate (LeSDH). El vector PCP fue creado a partir del vector binario pB7FWG2,0 (Clio Peirano, 2013), el cual se digirió con endonucleasas con la finalidad de escindir un fragmento de 3599 pb, el que contenía el gen DXR (de la ruta carotenogénica), y de añadir un sitio de múltiple clonamiento, donde se encuentran los sitios de corte de las enzimas de restricción XmaI y XbaI, que corresponden a las endonucleasas utilizadas en este trabajo. El vector PCP utilizado en este seminario de título posee selección en bacterias mediante espectinomicina y selección en plantas por resistencia al herbicida BASTA, codificado por el gen *Bar* (Áy y cols, 2012).

1.6 Estrategia desarrollada

Para lograr los objetivos de este seminario de título, en primer lugar, se utilizaron los vectores de expresión pCambia generados en los seminarios de título de Francisca Aguayo (2010) y Patricio Mandujano (2008) para la transformación estable de plantas de tomate. Se implementó un sistema de transformación estable mediante organogénesis somática, con la finalidad de evaluar la inserción del transgén en el genoma de las plantas seleccionadas y mediante ensayos de actividad SDH se evaluó la funcionalidad de la SDH bajo los distintos promotores. En segundo lugar, los vectores pCambia fueron utilizados para la transformación transitoria de frutos de tomate, mediante el proceso de agroinfiltración para llevar a cabo análisis de actividad de SDH y compararlo con sus respectivos controles, que fueron transformados con pCambia-GFP o que correspondían a plantas no-transformadas. Por último, se clonaron las secuencias de interés de los vectores pCambia, correspondiente a los constructos promotor-gen-terminador, en el vector PCP, el cual tiene resistencia al herbicida BASTA, y posteriormente se transformó *Agrobacterium tumefaciens*, con la finalidad de utilizar estos vectores en experimentos posteriores.

Dados los antecedentes expuestos, a continuación se presentan los objetivos de este Seminario de Título.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Obtención y análisis de tomates transformados estable y transitoriamente con el gen que codifica para sorbitol deshidrogenasa (SDH) obtenido de *Malus x domestica*, y clonación de dos SDH en el vector PCP

2.2. Objetivos Específicos

1. Obtener múltiples líneas de tomates transformados establemente con vectores que contienen el gen de sorbitol deshidrogenasa ó GFP (control).
2. Analizar si las plantas seleccionadas del proceso de organogénesis contienen el gen de la SDH en su genoma.
3. Realizar ensayos se actividad SDH de las plantas transformadas establemente.
4. Transformar transitoriamente frutos de tomate con vectores que contienen el gen de la Sorbitol deshidrogenasa ó GFP (control) y realizar ensayos se actividad SDH de estos frutos.
5. Clonar el gen de la Sorbitol deshidrogenasa en el vector PCP, que presenta resistencia al herbicida BASTA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados presentan una calidad apropiada para las técnicas empleadas y fueron adquiridos en Fermentas, Promega, Invitrogen, Axygen, Merck y Phyto Technology Laboratories.

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1 Cepas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas

Las cepas utilizadas de *E. coli* y *A. tumefaciens* fueron obtenidas en los seminarios de título de Francisca Aguayo (2010) y Patricio Mandujano (2008), ambos realizados en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal (Universidad de Chile). Las cepas de *E. coli* DH5 α presentaban genotipo: *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*. Por otro lado, las cepas de *A. tumefaciens* GV3101 presentaban genotipo: C58, plásmido Ti curado, Gen^R, Rif^R. Fruto de los seminarios de título anteriores, se contaba con *E. coli* y *A. tumefaciens* transformados con el vector pCambia 1302 que incorporaba independientemente uno de los siguientes constructos: 35S-MdSDH, 35S-LeSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH, PG-LeSDH ó PG-GFP. Las cepas utilizadas para la clonación en el vector PCP en este seminario de título son las nombradas anteriormente.

3.2.2 Obtención de frutos de tomate para ensayos de actividad SDH..

Para llevar a cabo ensayos de actividad mediante agro-infiltración, se utilizaron tomates (*Solanum lycopersicum*) adquiridos comercialmente y seleccionados por presentar un nivel bajo de maduración indicado por su exocarpo con coloración verdosa y con fuerte resistencia a la presión.

3.2.3 Obtención de semillas para la transformación estable de tomate

Se utilizaron semillas de tomate de 3 variedades distintas; Ailsa Craig, Red Cherry y la variedad enana Micro-Tom, para realizar las transformaciones estables con vectores de sobre-expresión constitutiva y fruto-específica para la SDH de tomate, y sus respectivos controles GFP. Las variedades Ailsa Craig y Red Cherry se obtuvieron comercialmente (Thompson y Morgan, RU) mientras que la variedad enana Micro-Tom se obtuvo del laboratorio de Dr. Nilo Mejía, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA).

3.3 TRABAJO CON BACTERIAS

Bacterias *E. coli* y *A. tumefaciens* fueron cultivadas durante 12 y 24 hr a 37 °C y 28 °C respectivamente, en medio LB líquido (1% triptona, 1% extracto de levadura, 0,8 % NaCl, pH 7.0 a 25 °C) y sólido (mezcla anterior suplementada con 1,5% de agar) a una agitación de 220 rpm para el caso del cultivo en medio líquido. Los antibióticos de selección utilizados para *E. coli* fueron espectinomicina (100 mg/L) para las cepas transformadas con pCR8 o PCP. Para la selección de *A. tumefaciens* transformada con los vectores pCambia, se utilizaron los antibióticos gentamicina (100 mg/L; resistencia otorgada por plásmido Ti), rifampicina (12,5 mg/L; selección cromosómica de la cepa) y kanamicina (100 mg/L; resistencia otorgada por los vectores pCambia). Para la selección de *A. tumefaciens* que fue transformada con PCP, se utilizaron los dos primeros antibióticos, pero se reemplazó la kanamicina por espectinomicina (100 mg/L).

3.3.1 Obtención de células *E. coli* quimiocompetentes

Para la generación de *E. coli* quimiocompetentes se utilizó el método de CaCl₂. Para esto, se realizó un pre-inóculo de cultivo (100 µL de células) en 3 ml de LB líquido suplementado con ácido nalidíxico (100 mg/L). Luego, se diluyó el pre-inóculo en 100 ml de LB-ácido nalidíxico y se cultivó a 37 °C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,5. Posteriormente, las células fueron centrifugadas (10 min, 1600 x g, 4 °C), y el sedimento obtenido se resuspendió en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M. La mezcla fue centrifugada durante 5 min en las mismas condiciones mencionadas. Luego, se procedió a resuspender las células en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M e incubarlas en hielo por 30 min. Finalmente se centrifugaron las muestras (5 min, 1600 x g, 4 °C), resuspendiendo el sedimento formado en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M y 600 µl de glicerol estéril. Alícuotas de células (200 µl) fueron almacenadas a -80 °C.

3.3.2 Transformación de *E. coli* por golpe térmico

A una alícuota de *E. coli* quimiocompetente descongelada en hielo, se le agregó 120 ng de la construcción de ADN deseada, incubando la mezcla en hielo durante 15 min. Luego, se incubaron las muestras a 42 °C durante 30 seg para volver a ponerlas en hielo. Posteriormente, las células fueron incubadas en 1 ml LB (1 hr, 37 °C, 200-250 rpm) y sembradas en LB-agar suplementado con espectinomicina (100 mg/L).

3.3.3 Obtención de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens*

Para la generación de células de *A. tumefaciens* quimiocompetentes, se dejó creciendo 5 ml de un cultivo suplementado con gentamicina (100 mg/L) y rifampicina (12,5 mg/L) en agitación durante 18 hr a 28 °C. Luego el inóculo fue vertido en 100 mL de LB líquido manteniendo las condiciones y las concentraciones de antibióticos mencionadas hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,5. Posteriormente, las células fueron mantenidas durante 10 min en hielo y

centrifugadas (3000 x g, 20 min, 4 °C). Se resuspendió el sedimento en 1 ml de CaCl₂ 20 mM estéril y frío. Alícuotas de células (100 µl) fueron almacenadas a -80 °C.

3.3.4 Transformación de *A. tumefaciens* por golpe térmico

A una alícuota de *A. tumefaciens* quimiocompetente descongelada en hielo, se le adicionó 150 ng de la construcción de ADN de interés y luego se incubó por 5 min en nitrógeno líquido. Posteriormente, se descongeló la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min para luego ser incubada en medio LB a 28 °C durante toda la noche con agitación. Finalmente, para la selección de los clones transformados con PCP, se sembraron las células en LB-agar suplementado con espectinomicina (100 mg/L), gentamicina (100 mg/ml) y rifampicina (12,5 mg/mL).

3.4 EXTRACCIONES DE ADN

3.4.1 Purificación de ADN plasmidial desde *E. coli*.

Para extraer ADN plasmidial desde *E. coli*, se dejó crecer en agitación durante 12 hr un cultivo de 5 mL LB suplementado con los antibióticos apropiados (sección 3.3). Posteriormente, se extrajo el ADN plasmidial utilizando el kit AxyPrepTM plasmid miniprep (Axygen Biosciences) según las especificaciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

3.4.2 Purificación de ADN plasmidial de *A. tumefaciens*

Para extraer ADN plasmidial desde *A. tumefaciens*, se dejó crecer en agitación durante 12 hr un cultivo de 5 mL suplementado con los antibióticos apropiados (sección 3.3). Se tomaron 2 mL del cultivo y se centrifugó (7000 x g, 1 min). Luego el sedimento se agitó vigorosamente y se añadió 100 µL de solución I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM TrisHCl pH 8), se agitó y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 20

μL de una solución de lisozima (20 mg/mL), se agitó y se incubó durante 15 min a 37 °C. Inmediatamente se adicionó 200 μL de solución II (0,2 N NaOH, 1% SDS), se mezcló suavemente invirtiendo el tubo 4 veces y se incubó en hielo durante 5 min. Se añadió 150 μL de solución III (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial 12%v/v), se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo durante 5 min. Luego se centrifugó (12.000 x g, 5 min), el sobrenadante se traspasó a tubos limpios y se le añadió 400 μL de una solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y posteriormente se centrifugó (12.000 x g, 5 min), y el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo. Se repitió el último paso dos veces, pero la segunda vez solamente con cloroformo. Posteriormente se añadió 300 μL de isopropanol y se incubó en hielo por 10 min. Se centrifugó (12.000 x g, 5 min) y se lavó el sedimento con 500 μL de etanol 70%. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se dejó secar el sedimento y se resuspendió en 50 μL de TE (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA) suplementado con ARNasa A (2 mg/mL).

3.4.3 Purificación de ADN genómico desde plantas de tomate

Para extraer ADN genómico de tomates, se siguió el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987). Se molieron 100 mg de tejido previamente congelado en nitrógeno líquido en un tubo de 1,5 mL en presencia de 700 μL de tampón CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM y Tris-HCl 100 mM pH 8). La mezcla fue calentada a 60 °C durante 30 min. Luego, se centrifugó (15.000x g, 5 min) y se traspasó el sobrenadante a un tubo limpio. Posteriormente, se agregó 700 μL de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión durante 5 min. Una vez resuspendida la muestra, se centrifugó (5.700 x g, 5 min) y se transfirió la fase superior a un nuevo tubo de microcentrífuga. Luego, a la fase acuosa recuperada se le agregó 650 μL de isopropanol para precipitar el ADN. Esta mezcla se incubó a -20 °C durante 30 min y se centrifugó (15.000 x g, 10 min) para luego descartar el sobrenadante. Al precipitado

se le agregó 700 μL de etanol 70% frío, se centrifugó (15.000 x g, 5 min.) y se eliminó el sobrenadante. El ADN se secó a temperatura ambiente, durante 20 min y se resuspendió en 20 μL de agua NP.

3.5 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.5.1 Cuantificación y análisis de la calidad del ADN total

3.5.1.1 Visualización y cuantificación mediante geles de agarosa

Las muestras de ADN fueron visualizadas y analizadas en geles de agarosa de concentración variable (0,7% a 1,5%) dependiendo del tamaño del producto esperado. Como marcador de peso molecular se usó Gene Ruler™ (Fermentas®). Todos los geles fueron preparados con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y bromuro de etidio 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xilene cianol 0.25% y glicerol 80%) en proporción 6:1 previo a ser cargadas en el gel. La electroforesis fue realizada a una diferencia de potencial entre 80 y 110 V durante 40 min. Los geles fueron visualizados con un trans-iluminador UV y las imágenes captadas (GeneGenius Classic de SynGene®) fueron evaluadas mediante Image J.

3.5.1.2 Cuantificación y análisis de calidad mediante espectrofotómetro.

Todas las extracciones de ADN genómico de tomates fueron cuantificadas (A_{260}) y analizadas para constatar su pureza (razones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}) usando un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). El valor de la relación A_{260}/A_{280} aceptada para extracciones puras de ADN debe estar cercano a 1.8 y 2.0, respectivamente, mientras que para la relación A_{260}/A_{230} los valores para muestras puras de ADN se encuentran en el rango de 1.8 y 2.2. Valores que se alejan a lo mencionado en ambos parámetros revelan la presencia de compuestos orgánicos o proteínas.

3.5.2 Diseño de partidores específicos para la clonación en vector PCP

Para el diseño de partidores se usaron las secuencias de los clones obtenidos de los seminarios de título de Francisca Aguayo (2010) y Patricio Mandujano (2008), correspondientes a los vectores pCambia 1302 que llevaban los fragmentos 35S-MdSDH, 35S-LeSDH, PG-MdSDH o PG-LeSDH. Se diseñaron 4 pares de partidores, para cada uno de los 4 vectores mencionados. Los partidores presentan una longitud variable entre 25 y 31 nucleótidos, incluyendo los sitios de restricción incorporados. Todos los partidores en sentido hibridan con el extremo 5' del promotor correspondiente (35S o PG) y a estos se les añadió el sitio de corte para la enzima XmaI en el extremo 5'. A su vez, todos los partidores en antisentido hibridan con el extremo 3' del terminador NOS y tienen añadida en el extremo 5' el sitio de corte para XbaI. Se comprobó que los sitios de corte que se utilizaron en los extremos de los partidores no se encontraran en el fragmento a amplificar, el cual se compone del promotor constitutivo 35S ó del promotor fruto-específico PG, el gen de la sorbitol deshidrogenasa de manzana (MdSDH) o de tomate (LeSDH) y finalmente el terminador NOS. Se escogieron estos sitios ya que se encuentran en el sitio de múltiple clonamiento del vector PCP, el cual es el vector de destino. Tanto XmaI como XbaI son sitios de corte único dentro del sitio de múltiple clonamiento, aunque el sitio de corte de XbaI se encuentra también en otra zona del vector que no interfiere en el proceso de clonación. Las secuencias de los partidores utilizados se encuentran en Tabla II.

3.5.3 Reacciones de PCR

Para los procesos de clonación, se utilizó la enzima Pfu polimerasa, la cual exhibe actividad exonucleasa en sentido 3'→5' impidiendo la incorporación de nucleótidos erróneos durante la polimerización, que la permite ser una enzima de alta fidelidad. La mezcla contenía 1 X tampón de reacción suplementado con MgSO₄, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μM de los partidores

sentido y antisentido, 1 µl de ADN, 1 U de Pfu polimerasa recombinante (Fermentas) y agua NP suficiente para completar un volumen final de reacción de 20 µL.

El protocolo general para las otras reacciones de PCR realizadas, utilizaron la enzima Taq ADN polimerasa de Invitrogen debido a su mejor rendimiento. La mezcla general se dispuso de la siguiente manera: 1X tampón de reacción Taq polimerasa, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM de los partidores sentido y antisentido, 1 U de Taq polimerasa, ADN como molde (1 µg) y agua NP suficiente para completar un volumen final de reacción de 20 µL.

3.5.4 Reacción de PCR de colonia

El PCR de colonia es una variante del PCR tradicional en que se usa como molde el cultivo de bacterias directamente (1 µl de cultivo D.O 0,8). Se analizaron las colonias de *E. coli* transformadas con las construcciones pCR8-35S-MdSDH, pCR8-35S-LeSDH, pCR8-PG-MdSDH, PCP-35S-MdSDH, PCP-35S-LeSDH y PCP-PG-MdSDH mediante este método. En el caso de las colonias de *A. tumefaciens*, se confirmaron que portaran las construcciones PCP. La reacción de PCR se realizó mediante el protocolo general detallado en la sección 3.5.3. Como controles negativos se utilizaron agua NP y cultivo bacteriano sin transformar. Como control positivo se usó ADN plasmidial de la construcción correspondiente.

Tabla I. Programas de PCR utilizados para el desarrollo de este Seminario de Título

18S / Higo: Programa de PCR utilizado para comprobar la integridad del ADN mediante la amplificación de una parte del gen de la subunidad ribosomal 18S usando partidores 18S5' y 18S3', y para confirmar la transformación estable de tomate a través de la amplificación de un fragmento del gen *hptII* usando partidores HigoF e HigoR.

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	95	5 min	1
2	1	95	40 seg	37
	2	50	1 min	
	3	72	30 seg	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

35SMd/ 35SLe clonación: Programa de PCR usado para la amplificación de los fragmentos 35S-MdSDH o 35S-LeSDH mediante Pfu polimerasa, usando el partidor en sentido 35SMDF ó 35SLeF y el antisentido 35SMDR ó 35SLeR. Los fragmentos fueron amplificados a partir de los vectores pCambia 1302.

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	95	2 min	1
2	1	95	1 min	32
	2	53	40 seg	
	3	72	4 min 15 seg	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

PGMd clonación: Programa de PCR usado para la amplificación del fragmento PGMdSDH mediante Pfu polimerasa usando el partidor sentido PGMDF y el partidor antisentido PGMDR. El fragmento fue amplificado a partir del vector pCambia 1302.

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	95	5 min	1
2	1	95	1 min	32
	2	56	40 seg	
	3	72	4 min 45 seg	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

PCR colonia: Programa de PCR utilizado para comprobar que las colonias de *E. coli* transformadas contienen el inserto de interés que previamente se ligó en el vector de clonación pCR8. Mediante este programa es posible visualizar los fragmentos amplificados para 35S-MdSDH, 35S-LeSDH y PG-MdSDH. Para estos PCR se utilizó la enzima Taq polimerasa.

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	95	5 min	1
2	1	95	1 min	32
	2	53	1 min	
	3	72	2 min 30 seg	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

Tabla II. Partidores utilizados en este Seminario de Título.

Partidor	Secuencia Partidor (5' → 3')	Descripción
35SMDF 35SMDR	<u>CCCGGG</u> CGCCTTCAGTTTAGCTTCAT TCTAGAAGTTTAATTCCCGATCTAGTAACAT	Diseñados para amplificar el fragmento de ADN 35S-MdSDH-NOS. Poseen respectivamente el sitio de corte para <i>Xma</i> I (partidor en sentido) y <i>Xba</i> I (partidor antisentido) subrayados. Juntos amplifican un fragmento de 1995 pb.
PGMDF PGMDR	<u>CCCGGG</u> TAAGTACCATCACATAATTGAGACG TCTAGACACTGATAGTTTAATTCCCGATCTA	Partidores diseñados para amplificar de manera específica el fragmento de ADN PG-MdSDH-NOS. Poseen respectivamente el sitio de corte para <i>Xma</i> I (partidor en sentido) y <i>Xba</i> I (partidor antisentido) subrayados. Juntos amplifican un fragmento de 2233 pb.
35SLEF 35SLER	<u>CCCGGG</u> GCCTTCAGTTTAGCTTCATGG TCTAGACTCTTAGGTTTACCCGCCAA	Partidores diseñados para amplificar de manera específica el fragmento de ADN 35S-LeSDH-NOS. Poseen respectivamente el sitio de corte para <i>Xma</i> I (partidor en sentido) y <i>Xba</i> I (partidor antisentido) subrayados. Juntos amplifican un fragmento de 1980 pb.
PGLEF PGLER	<u>CCCGGG</u> TAAGTACCATCACATAATTGAGACG TCTAGACACTGATAGTTTAATTCCCGATCTA	Partidores diseñados para amplificar de manera específica el fragmento de ADN PG-LeSDH-NOS. Poseen respectivamente el sitio de corte para <i>Xma</i> I y <i>Xba</i> I subrayados. Juntos amplifican un fragmento de 2173 pb.
18S 5' 18S 3'	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT ACAATGATCCTTCCGCAGGT	Partidores utilizados para verificar la integridad del ADN. Amplifican un fragmento de 196 pb del gen de ARN ribosomal 18S (18S rADN).
M13 F M13 R	GTAAAACGACGGCCAG CAGGAAACAGCTATGAC	Partidores utilizados para secuenciar las construcciones en pCR8.
Higro F Higro R	TTTGTGTACGCCGACAGT AAGACCTGCCTGAAACCGA	Partidores en sentido (F) y en antisentido (R) diseñados para amplificar un fragmento interno de 500 pb del gen que codifica resistencia a Higromicina (<i>hptII</i>).

MdF	GGCAACTAGTAAAATGGGCAAGGGAGGC	Diseñados para amplificar el ADN de <i>MdSDH</i> . Juntos amplifican un fragmento de 1119 pb (<i>MdSDH2</i>).
MdR	GGCAGCTAGCATTACTATAGATTAACATG	
GFP5'	GAGGGTGAAGGTGATGCAAC	Partidores utilizados para verificar la inserción de GFP en el genoma de las plantas transformadas establemente. Juntos amplifican un fragmento interno de 510 pb de <i>GFP</i> .
GFP3'	CAGGTAATGGTTGTCTGG	
LeF	GGCAACTAGTCTAATGGGTAAAGGAGGC	Partidores diseñados para amplificar el ADNc de <i>LeSDH</i> . Juntos amplifican un fragmento de 1072 pb.
LeR	GGCAGGTGACCTTTTACAAATTAACATGAC	

3.5.5 Purificación de ADN desde geles de agarosa

Fragmentos de ADN de interés fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean Up System de Promega.

3.5.6 Secuenciación

La secuenciación de los ADN plasmidiales fue realizada en MacroGen Co. (USA), usando los partidores M13F, M13R, MdF, MdR, LeF y LeR (sección 3.5.4).

3.5.7 Clonamiento de fragmentos de interés por el sistema pCR[®]8

El sistema pCR[®]8/GW/TOPO[®] de Invitrogen permite clonar productos de PCR que contengan en su extremo terminal 3' desoxiadenosina (A) debido al apareamiento de bases que ocurre con la desoxitimidina desapareada que posee el vector en su sitio de clonamiento. Además, este vector de 2,8 kb cuenta con una enzima del tipo topoisomerasa unida a la desoxitimidina, la cual ayuda eficientemente en la ligación de ambos ADN (vector e inserto).

Para utilizar este sistema, fue necesario agregar en forma previa una adenina terminal en los extremos 3' del producto de PCR purificado (promotor-gen-terminador) obtenida con Pfu

polimerasa (sección 3.5.3). Con este objetivo, se realizó una mezcla que contenía: 1X tampón, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dATP, 0,5 U de Taq ADN polimerasa y 250 ng de producto PCR purificado. La mezcla se incubó a 72 °C durante 30 min. Luego, se realizó la reacción de ligación con el vector pCR8 en una mezcla que contenía 1 µL de vector, 1 µL de solución salina y 4 µL de producto de PCR. La mezcla se incubó a 4 °C durante 10 horas y luego se transformó *E. coli* (sección 3.3.2).

3.5.8 Digestiones enzimáticas

3.5.8.1 Digestiones enzimáticas para la confirmación de clones positivos

Para confirmar la identidad de los fragmentos clonados en los vectores pCR8-35S-MdSDH, pCR8-35S-LeSDH y pCR8-PG-MdSDH, se realizaron ensayos de restricción con la endonucleasa EcoRI, la cual digiere justo 5' y 3' del fragmento clonado para el caso de pCR8-35S-LeSDH. Para los otros 2 vectores la enzima debería digerir 3 veces, las dos mencionadas anteriormente más un sitio interno presente en el ADN de *MdSDH2*. La mezcla para cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1X tampón EcoRI, 1 U de enzima EcoRI y 500 ng de ADN plasmidial. Todas las reacciones de digestión fueron incubadas a 37 °C durante 12 hr.

3.5.8.2 Digestión enzimática secuencial para la clonación en vector PCP

Se utilizaron las enzimas XmaI y XbaI para clonar los fragmentos de interés en PCP. Sin embargo, estas enzimas no eran compatibles en ninguna solución tampón. Por lo tanto, se procedió a realizar una digestión enzimática secuencial. Primero se digirió con XmaI a 37 °C por 16 h, en un volumen total de 20 µL compuesta por 1X tampón XmaI, 1 U XmaI y 500 ng de ADN plasmidial. Posteriormente las muestras se resolvieron en un gel y las bandas correspondientes al vector linearizado se purificaron mediante el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean Up System de Promega. Una vez purificadas las bandas, se comenzó la segunda digestión enzimática con XbaI a 37 °C, durante 8 hr, en un volumen total de 20 µL que contenía 1X tampón React2, 1 U

XbaI y 500 ng de ADN de la muestra purificada anteriormente. Este mismo procedimiento se utilizó para digerir el vector PCP.

3.5.9 Clonamiento de fragmentos de interés en el vector PCP

Luego de las digestiones enzimáticas con las enzimas XmaI y XbaI (sección 3.5.8), la ligación de los fragmentos obtenidos se llevó a cabo utilizando ADN T4 ligasa (Promega). Cada mezcla de reacción contenía 150 ng del vector PCP, 50 ng de inserto, 1X tampón ligasa y 1 U de ADN T4 ligasa. Las mezclas fueron incubadas a 37 °C durante 12 hr. Luego se procedió a transformar *E. coli* (sección 3.3.2).

3.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

3.6.1 Transformación transitoria de frutos de tomate

Los clones de *A. tumefaciens* portadores de los vectores pCambia PG-MdSDH, PG-GFP, 35S-MdSDH o 35S-GFP fueron crecidos en medio LB líquido suplementado con los antibióticos de selección hasta alcanzar D.O₆₀₀ cercana a 0,8. Las bacterias fueron sedimentadas mediante centrifugación (5000 x g, 5 min) y se resuspendieron hasta una D.O₆₀₀ de 0,8 en medio de infiltración (MI; medio MS 1X, sacarosa 20 g/L y acetosiringona 200 µM). La suspensión obtenida se usó para agro-infiltrar frutos de tomate utilizando jeringas BD ultra-fine™ II con aguja de 5 mm. Cada fruta se transformó transitoriamente con los distintos constructos, inyectando suavemente 800 µL de suspensión a 3-4 mm de profundidad con el fin de minimizar el daño en el fruto. Para cada vector se hicieron 5 réplicas biológicas y cada una de éstas tenía 3 réplicas técnicas. Los frutos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 días (Orzáez y cols, 2006). Transcurrido este tiempo, se cosecharon las muestras agro-infiltradas y se les extrajo proteínas totales.

3.6.2 Extracción de proteínas desde frutos de tomate

Para extraer las proteínas totales de frutos, se siguió el protocolo descrito por Lo Bianco y Rieger (1998). Para esto, se cortó una porción de mesocarpo y se pesaron 3 g, luego se molió en un mortero hasta obtener una pasta. Se agregó 3 mL de la solución 1 (Tris-HCl 0,1 M pH 9,0, glicerol 8% v/v, 2-mercaptoetanol 20 mM) y se continuó moliendo en presencia de la solución. Posteriormente se agregó 3 mL de solución 2 (PVPP 1% p/v, Tween-20 0,1% v/v) y se mezcló bien. Se colocó una gasa sobre un tubo Falcon de 50 mL y se vertió la suspensión dejando pasar sólo la parte líquida y descartando la gasa con el resto de pulpa. Rápidamente se llevó el tubo al hielo y posteriormente se centrifugó (14000 x g, 15 min, 4°C) descartando el sedimento y conservando en hielo el sobrenadante, para ser utilizado inmediatamente en la cuantificación de proteínas totales y análisis de actividad.

3.6.3 Cuantificación de proteínas totales

Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el reactivo Bradford. Para esto, se hizo una curva de calibración con la proteína BSA (albúmina de suero bovino) y el reactivo Bradford. Se realizaron 6 estándares con diferentes concentraciones de la proteína (desde 0 µg/mL hasta 10 ng/µL). La mezcla contenía 500 µL de reactivo Bradford en un volumen final de 1 mL y las muestras se midieron en el espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda EZ201) a una longitud de onda de 595 nm. Una vez obtenida la curva de calibración, se calculó la ecuación de la recta obtenida con los puntos analizados y ésta se utilizó para cuantificar la concentración de proteínas de cada extracto crudo obtenido. Para esto se hizo una mezcla de 500 µL de reactivo Bradford, 497 µL de agua NP y 3 µL de extracto de proteínas totales.

3.6.4 Medición de actividad en los extractos de proteínas

Para la medición de actividad de SDH en los extractos de proteínas, se hizo una mezcla de solución de actividad (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, sorbitol 300 mM, ZnSO₄ 3 μM) con el extracto crudo de proteínas (Lo Bianco y Rieger, 1998). En la reacción estándar, se mezcló 445 μL de solución de actividad, 50 μL de extracto de proteína (de concentración variable dependiendo la muestra) y 5 μL de NAD⁺ 100 mM el cual fue agregado al final para iniciar la reacción. Se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm por 10 minutos con intervalos de 20 seg entre cada medida. El control positivo correspondía a la misma reacción, agregando 0,5 U de la enzima purificada SDH de oveja (Sigma) en vez del extracto de proteína. Uno de los controles negativos se hizo con la reacción estándar, sin sorbitol (control negativo de sustrato), y el otro con la reacción estándar sin agregar el extracto de proteínas totales (control negativo de proteína).

3.7 CULTIVO IN VITRO Y TRANSFORMACIÓN DE TOMATES

3.7.1 Esterilización y sembrado de semillas de tomate

Para la transformación estable de tomate, se utilizaron explantes de plántulas cultivadas *in vitro*. Para llevar a cabo el cultivo *in vitro*, se esterilizaron semillas de tomate, variedades Ailsa Craig, Red Cherry y Micro-Tom, agitándolas durante 15 min en la solución de esterilidad (10% v/v hipoclorito de sodio, 2 gotas de tween). Luego las semillas se lavaron 5 veces con agua destilada estéril y se retiró el exceso de agua mediante papel absorbente previamente autoclavado. Posteriormente, las semillas fueron sembradas en placas MS (Medio basal MS con vitaminas, sacarosa 15 g/L, agar 6 g/L, pH 5.8). Las placas se ubicaron a 25 °C bajo fotoperíodo 16 hr luz a 2400 lux.

3.7.2 Obtención de explantes de tomate

3.7.2.1 Primer método de obtención de explantes de la variedad Ailsa Craig y Red Cherry

Plántulas de tomate de 7 días luego de su germinación, fueron colocadas en placas de petri estériles con una cantidad suficiente de agua destilada. En condiciones de esterilidad los explantes de tomate fueron preparados según método "flamingo" (Saker y cols, 2007; Pozueta y cols, 2001) removiendo una de las hojas y el brote meristemático desarrollado entre ambos cotiledones. El resto de la planta que incluye hipocotilo y una hoja del cotiledón constituyeron el explante blanco para su posterior transformación.

3.7.2.2 Segundo método de obtención de explantes de la variedad Micro-Tom

Se tomaron plántulas de tomates de 8 días desde su germinación, se cortaron los cotiledones y se les removió los extremos distal y proximal. Luego se cortaron transversalmente en dos partes y estos explantes se pusieron inmediatamente en medio de co-cultivo (sección 3.8.5) con la cara abaxial hacia abajo. Se dispuso los explantes de tomate ordenadamente en una placa de petri para su posterior transformación.

3.7.3 Transformación de explantes mediante *A. tumefaciens*

Cultivos de *A. tumefaciens* portadores de los vectores pCambia 35S-GFP, 35S-MdSDH, PG-GFP, PG-MdSDH y PG-LeSDH fueron crecidos hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0.2-0,3 (para Micro-Tom) y de 0,8 (para Ailsa Craig y Red cherry), y luego centrifugados (2.000 x g, 15 min). El sedimento fue resuspendido mediante agitación suave (150 rpm) en 20 ml de medio de co-cultivo líquido. Se aplicó una gota de esta solución sobre cada explante de cotiledón (sección 3.7.2). Se dejó la solución durante 15 min sobre cada uno de los explantes y luego se secaron

usando papel absorbente estéril y se mantuvo a los explantes en medio de co-cultivo (sección 3.7.5) durante 48 hr en oscuridad a 25 °C.

3.7.4 Regeneración de explantes de tomate mediante organogénesis somática.

Luego de 48 hr en medio de co-cultivo sólido, los explantes fueron transferidos a placas petri con medio de inducción (sección 3.7.5), y cambiados semanalmente a medio fresco durante 7-8 semanas. Se realizaron dos controles de transformación: el control positivo consistió en explantes de cotiledones sin transformar y puestos en el medio de inducción sin el antibiótico de selección higromicina, mientras que para el control negativo, explantes sin haber sido co-cultivados con *A. tumefaciens*, fueron sembrados en medio de inducción suplementado con higromicina.

Brotos verdes bien formados de 1 cm de altura fueron transferidos a frascos de plástico con medio de elongación y enraizamiento (sección 3.7.5), y transferidos semanalmente a medio fresco durante 7 semanas. Se dejó en este medio hasta que a las plantas le salieron un gran número de raíces. Luego de 3 meses y medio, se obtuvieron plántulas de tomate con raíces suficientes para su aclimatación a tierra. Para el cultivo en invernadero, se trasplantaron las plántulas cultivadas *in vitro* a maceteros con una mezcla de tierra de hoja:vermiculita (2:1) y condiciones de 16 hr de luz y 8 hr de oscuridad a una temperatura constante de 22 °C. Para la aclimatación de las plantas, éstas inicialmente fueron cubiertas con un vaso plástico con el fin de mantener la humedad con la que estuvieron durante el cultivo *in vitro* y luego de 2 semanas se le hizo pequeños agujeros en su parte superior. Luego de 4 semanas en aclimatación, se comenzaron a destapar las plantas gradualmente, para finalmente destaparlas por completo en un período de 2 meses.

3.7.5. Medios para el desarrollo *in-vitro* de plántulas de tomate

A continuación se presenta dos Tablas que resumen todos los componentes de los distintos medios en los que se desarrollaron las plantas de tomate de las 3 variedades descritas. La Tabla III corresponde a las variedades Ailsa Craig (Extraída de Aguayo, 2010) y Red Cherry, mientras que la Tabla IV corresponde a la variedad Micro-Tom (Pino y cols, 2010). Las cantidades se han asignado para un volumen de 1 L.

Tabla III. Composición de medios para las variedades Ailsa Craig y Red Cherry

Composición	Medio MS Germinación	Medio Co-cultivo	Medio de Inducción	Medio de Elongación	Medio de Enraizamiento
MS sales (g)	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
Sacarosa (g)	30	30	30	15	15
Agar-agar (g)	7	7	7	7	7
pH	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
BAP (mg)	-	-	1	-	-
IBA (mg)	-	-	0,1	-	5
NAA (mg)	-	-	-	-	-
Acetosiringona (μM)	-	300	-	-	-
Higromicina (mg)	-	-	2,5	2,5	2,5
Cefotaxime (mg)	-	-	200	300	400

Tabla IV. Composición de medios para la variedad enana Micro-Tom.

Composición	Medio MS Germinación	Medio Co-cultivo	Medio de Inducción	Medio de elongación y enraizamiento
MS sales (g)	2,2	4,4	4,4	4,4
Sacarosa (g)	15	30	30	10
Agar-agar (g)	7	7	7	7
pH	5,8	5,8	5,8	5,8
BAP (mg)	-	-	0,3	-
IBA (mg)	-	-	-	-
NAA (μM)	-	0,4	-	-
Acetosiringona (μM)	-	100	-	-
Higromicina (mg)	-	-	2	2,5
Cefotaxime (mg)	-	-	400	400

3.7.6 Análisis mediante PCR para confirmar plantas de tomate transgénicas

Para determinar la inserción estable en el genoma de tomate, variedad Ailsa Craig, se amplificó el gen de resistencia a higromicina mediante PCR. Se extrajo ADN genómico de tomates silvestres y transformantes, y se utilizó el programa denominado Higo y los primarios HigoF e HigoR (secciones 3.5.2 y 3.5.3). Como control negativo se utilizó ADN de tomate silvestre y como controles positivos, se usó ADN plasmidial. Para determinar la inserción estable en el genoma de tomate, variedad Micro-Tom, se amplificaron los genes MdSDH y GFP. Como control negativo se utilizaron plantas silvestres y como control positivo se usó ADN plasmidial.

4. RESULTADOS

4.1. Generación de plantas de tomate transformadas establemente

4.1.1. Primer intento de generación de plantas transgénicas de tomate

Para realizar la transformación estable de la planta de tomate, se utilizaron cepas de *A. tumefaciens* portadoras de los vectores 35S-MdSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH y PG-GFP obtenidos de los seminarios de título de Patricio Mandujano (2008) y Francisca Aguayo (2010). Explantes de la variedad Ailsa Craig se transformaron establemente y se sometieron al proceso de organogénesis somática (sección 3.7.4). Este es un procedimiento de propagación *in-vitro* que permite generar brotes de plantas a partir de un tejido diferenciado, tales como las hojas.

Para la transformación estable, se utilizaron explantes obtenidos de cotiledones de tomate, variedad Ailsa Craig crecidos en condiciones *in vitro*, 7 días transcurrida la germinación (sección 3.7.4). Cotiledones de 3 cm de longitud fueron seleccionados y preparados según el método flamenco (Saker y cols, 2007; Pozueta y cols, 2001), que se puede apreciar en la Figura 4.B.

El método flamenco implicó el corte de una de las hojas del cotiledón y el brote meristemático desarrollado entre ambas hojas. En la Figura 4.C se presentan explantes tipo flamenco recién transformados con *A. tumefaciens* portadora de los vectores de sobre-expresión. Luego, los explantes transformados con cada vector fueron cultivados en medios suplementados con higromicina para la selección de plantas que insertaron en su genoma el transgén, durante todo el proceso de organogénesis. Se aprecia el engrosamiento del diámetro de los explantes, lo que refleja la acción de *A. tumefaciens* y de las hormonas BAP e IBA suplementadas en el medio de cultivo (Figura 4.D). La formación de callo se observó a partir de la tercera semana de cultivo en este medio y transcurrida la quinta semana se observó el

desarrollo de brotes . Explantes que desarrollaron callos de color café oscuro (signo de muerte por higromicina) fueron descartados. Se observa la elongación de los brotes avanzada la cuarta semana de cultivo en medio sin fitohormonas (Figura 4.E). Se transfirieron estos explantes a frascos con medio MS suplementado con IBA para favorecer el enraizamiento.

Como control positivo se utilizaron plántulas WT no transformadas y sometidas al procedimiento de regeneración *in-vitro*. Estas presentaron un desarrollo similar al observado en explantes transformantes durante el proceso de organogénesis. En cambio, como controles negativos de transformación, se utilizaron plantas no transformadas (WT) y crecidas con el antibiótico de selección. Éstas fueron drásticamente afectados por higromicina a partir de la tercera semana de cultivo en medio de inducción (datos no mostrados) y posteriormente murieron.

De los 4 vectores con los que se transformó, sólo se obtuvo brotes y plantas regeneradas de la línea PG-GFP, las cuales se observan en la Figura 4.F. El procedimiento implicó transformar 452 plántulas durante todo el proceso, es decir, 113 plántulas para cada vector. De cada plántula se obtienen dos explantes utilizando el método flamingo, por lo tanto, corresponden a 226 explantes para cada vector. Las líneas presentaron un porcentaje de regeneración de alrededor de 2,21% (5 plantas), es decir, aquellos explantes que fueron capaces de regenerar tejido en el medio *in-vitro* suplementado con hormonas vegetales. Sin embargo, la línea PG-GFP fue la única en sobrevivir la selección y por lo tanto, presentar porcentaje de transformación, el cual fue de un 1,32% (3 plantas). El porcentaje de regeneración fue calculado considerando todos los explantes que regeneraron y dieron origen a brotes con respecto al total de explantes transformados por línea. El porcentaje de transformación fue calculado considerando todas las plantas regeneradas que resultaron tener el transgén luego del proceso de transformación, con respecto al total de explantes transformados por línea.

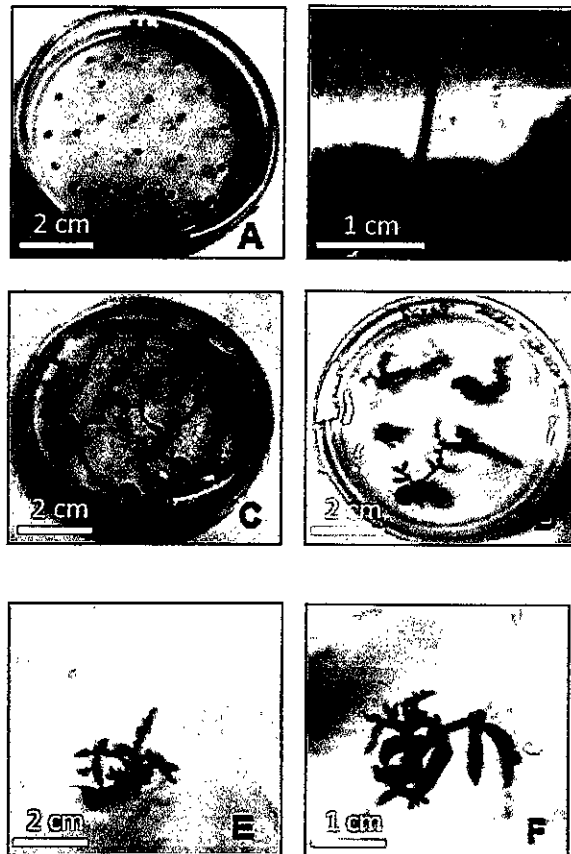


Figura 4. Organogénesis somática de explantes de tomate Ailsa Craig transformados con el vector PG-GFP mediante *A. tumefaciens*. A: Semillas esterilizadas en medio MS de germinación B: Detalle del corte tipo flamingo realizado a cotiledones seleccionados de 7 días. C: Explantes recién transformados con *A. tumefaciens* en medio de co-cultivo. D: Explantes mantenidos en medio de inducción, se ve la formación del callo y desarrollo de brotes en un explante de 6 semanas E: Detalle de un explante luego de 4 semanas en medio de elongación. F: Explante de 5 semanas en medio de elongación.

4.1.2. Análisis de la inserción del transgén en tomates transgénicos: Ailsa Craig

Para corroborar la inserción del gen GFP en el genoma de las 3 plantas obtenidas de la línea PG-GFP, se realizó una extracción de ADN a partir de hojas. En primer lugar, se amplificó el gen 18S para verificar la integridad del ADN. En la Figura 5 se muestran los geles de agarosa obtenidos. Se observa que amplificó correctamente el gen 18S de la planta no transformada (WT) como el de las plantas transgénicas (Figura 5.A). Posteriormente, se amplificó un fragmento del gen de GFP, cuyo tamaño de banda mide 500 pb aproximadamente, obteniéndose este fragmento para las tres plantas transformadas con el vector PG-GFP, no así

para la planta WT (Figura 5.B). Finalmente, para corroborar los resultados obtenidos del PCR de GFP, se amplificó el gen de resistencia a higromicina, cuyo tamaño de banda esperado es 510 pb (Figura 5.C). Se obtuvo amplificado en las tres plantas transformadas con el vector PG-GFP, pero no se obtuvo amplificación del gen en las plantas WT, como era de esperar ya que estas plantas no poseen *hptII* en su genoma.

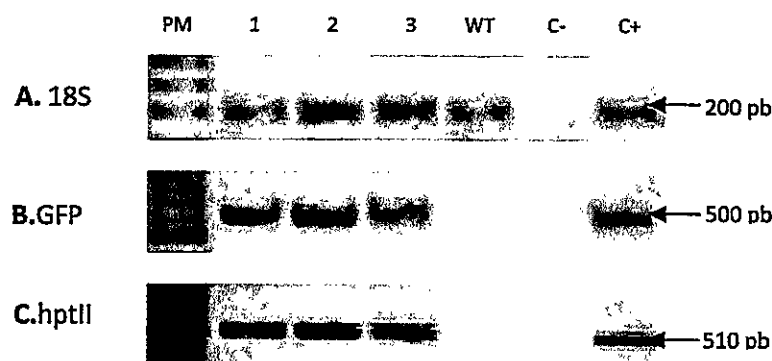


Figura 5: Amplificación de los genes 18S, GFP y *hptII* a partir de ADN genómico de plantas de tomate transformadas establemente con el vector PG-GFP, y obtenidas del proceso de organogénesis somática. Los carriles 1-3 corresponden a las tres plantas que se obtuvieron de la línea PG-GFP. En A se muestra la amplificación del gen 18S, el cual genera una banda de 200 pb. En B se muestra la amplificación del gen GFP, el cual genera una banda de 500 pb. Se visualiza para las plantas transformadas, no así para la WT. En C se muestra la amplificación del gen de resistencia a higromicina (*hptII*). C-: control negativo de la reacción de PCR, realizado con agua NP. C+: Control positivo, realizado con el ADN plasmidial (PG-GFP).

Sin embargo, a partir de la quinta semana en medio de elongación, las plantas comenzaron a ponerse necróticas en algunas hojas y no sobrevivieron en este medio, impidiendo ensayos posteriores. Debido a esto, se buscó otro método de regeneración con la variedad Red cherry, con la cual no se obtuvieron resultados positivos (datos no mostrados) y con la variedad enana de tomate, Micro-Tom.

4.1.3 Segundo intento de generación de plantas transgénicas de tomate

Se eligió la variedad enana Micro-Tom para realizar el proceso de transformación estable con los vectores 35S-MdSDH y 35S-GFP. Micro-Tom fue originalmente creado para la

jardinería y tiene varias características útiles, como su pequeño tamaño que las hace crecer a una alta densidad, pueden dar semillas si están bajo fotoperiodo corto con luz fluorescente y tienen un ciclo de vida corto que permite obtener frutos maduros a los 90 días después de la siembra (Hyeon-Jin Sun y cols., 2006).

Para realizar este procedimiento se siguió el método utilizado por Pino y cols., (2010). Se esterilizaron semillas que fueron sembradas en placas con medio MS (sección 3.7.2.2). Se cortaron los cotiledones de plántulas de 8 días, se les extirpó ambos extremos y se cortó cada cotiledón por la mitad, de manera que de cada plántula se obtuvieron 4 explantes (Figura 6.A). Se usaron también los hipocotilos de estas plantas. Los explantes una vez cortados, fueron puestos inmediatamente en placas con medio MS suplementado con acetosiringona (sección 3.7.5), en el caso de las hojas con la cara abaxial hacia abajo.

Se inocularon los explantes con la suspensión de *A. tumefaciens* (sección 3.7.3). Los explantes comenzaron a presentar engrosamiento del tejido a partir de la segunda semana. A los 25 días presentaban pequeños brotes inducidos por la razón citoquininas: auxina del medio (Figura 6.B). A los 45 días del proceso, se evidenciaron numerosos brotes, los cuales presentaban pequeñas hojas. Estos brotes se separaron del callo en el cual se encontraban y se traspasaron al medio de elongación y enraizamiento, el cual no está suplementado con hormonas vegetales (Figura 6.C). A los 2 meses y medio, las plantas comenzaron a desarrollar raíces y se alargó el periodo en este medio, más del establecido en el protocolo, hasta que se desarrollaran raíces fuertes y largas (Figuras 6.D y 6.E). A los tres meses y medio, las plantas fueron sacadas del medio de elongación y enraizamiento, y se traspasaron a tierra, en el proceso denominado aclimatación (Figura 6.F). Este paso es crítico, ya que la planta sufre un desbalance en la humedad a la cual ha estado sometida durante todo el proceso de regeneración *in-vitro*. Fue necesario hacer este procedimiento con mucha precaución, evitando romper las raíces de las plantas al sacarlas del medio MS donde estaban intrincadas. Una vez que se traspasaron a tierra, se les colocó encima un vaso plástico transparente invertido para

mantener las condiciones de humedad similares a las del cultivo *in-vitro* (Figura 6.F). Con el paso de las semanas, se hizo algunos agujeros en la parte superior del vaso hasta destapar completamente las plantas cuando tenían 5 meses.

Para el proceso de transformación se transformaron un total de 192 plántulas. De cada planta se obtienen 4 explantes, por lo tanto se transformaron 768 explantes para las 4 líneas. De este total, las plantas que regeneraron y dieron origen a brotes y posteriormente a pequeñas plantas, correspondieron a 7 plantas para la línea 35S-MdSDH y a 10 plantas para la línea 35S-GFP; de las cuales resultaron ser efectivamente transformantes 5 y 7 plantas respectivamente. Como se transformaron 192 explantes por línea, el porcentaje de regeneración obtenido de la línea 35S-MdSDH correspondió al 3,64% y el porcentaje de transformación al 2,6%. El porcentaje de regeneración fue de 5,2% para la línea 35S-GFP y de un 3,64% su porcentaje de transformación. El porcentaje de regeneración se calculó en base a los explantes que regeneraron con respecto al total de explantes utilizados para cada línea (192). El porcentaje de transformación se calculó como las plantas que poseen el transgén del total de explantes transformados por línea (192).

Las 12 plantas transgénicas (5 de la línea 35S-MdSDH y 7 de la línea 35S-GFP), se colocaron en una cámara con condiciones reguladas de luz y temperatura. Se mantuvieron bajo fotoperiodo corto, para inducir el proceso de floración. A los 5 meses y medio, se tenían numerosos primordios florales. A los 6 meses comenzó el proceso de floración (Figura 6.G), las plantas se autopolinizaron y se obtuvieron múltiples frutos en cada planta de ambas líneas luego de 7 meses. Posteriormente, con estos frutos se hicieron extracciones de proteínas totales y mediciones de actividad SDH (sección 3.6.4). Las semillas fueron recolectadas para conservar las líneas transgénicas (Figura 6.H).

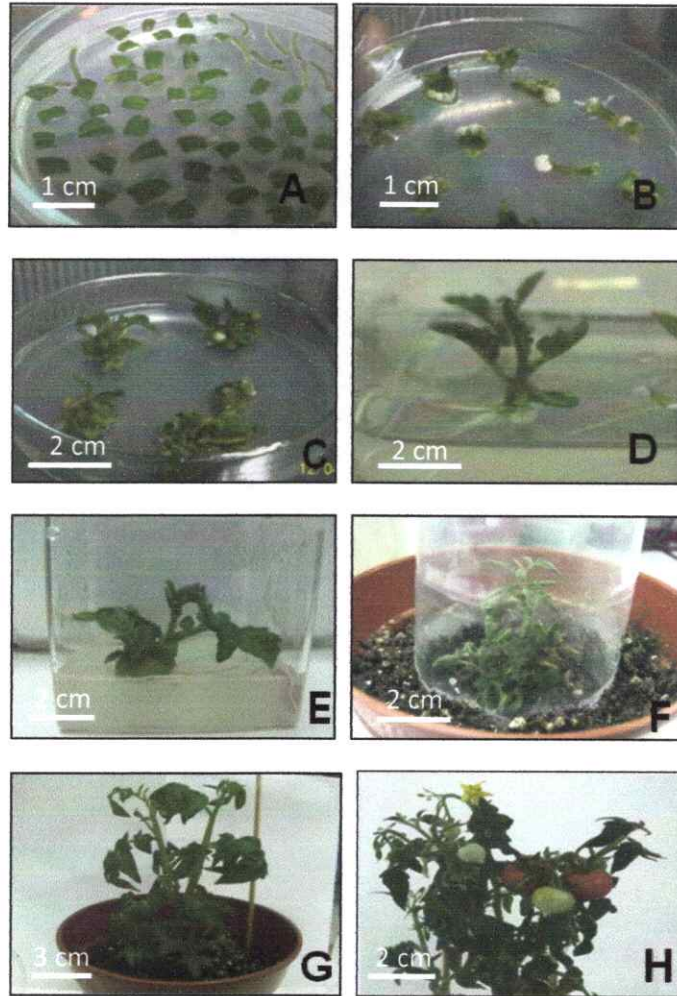


Figura 6. Organogénesis somática de explantes de tomate, variedad Micro-Tom, transformados con los vectores 35S-MdSDH y 35S-GFP mediante *A. tumefaciens*. En A: cotiledones de 8 días cortados y puestos en medio de co-cultivo, previo a la inoculación con *A. tumefaciens* B: Explantes de 25 días, presentan engrosamiento del tejido y pequeños brotes C: Explantes de 45 días en medio de inducción, se desarrollaron brotes sobre el callo del explante. D: Brote transferido a medio de elongación y enraizamiento. El brote fue transferido a los 2 meses y medio y se mantuvo en este medio por un mes, hasta que se desarrollaron raíces largas y fuertes. E: Plántula transformada de 3 meses y medio, en este estadio las plantas fueron traspasadas a tierra. F: Planta de 4 meses, en aclimatación, se le pone un vaso plástico transparente sobre ella para mantener el nivel de humedad. G: Planta de 5 meses, aclimatada en tierra, comienzan a salir los primordios florales tras estar bajo fotoperiodo corto. H: Planta de 6 meses y medio, presenta flores, frutos maduros e inmaduros.

En la bibliografía (Pino y cols., 2010; Hyeon-Jin Sun y cols., 2006), el procedimiento completo demora 90 días (3 meses) hasta obtener líneas transgénicas que sean capaces de dar semillas. En este trabajo, las plantas se obtuvieron luego de 6 meses. Este aumento en la duración del proceso se debe a que las plantas transformadas se dejaron un mayor tiempo en el

medio de enraizamiento ya que respondieron más lentamente que las plantas sin transformar (control positivo). Estas últimas presentaron raíces a la semana de estar en contacto en el medio sin fitohormonas, sin embargo, las plantas transformadas presentaron raíces a las tres semanas de estar en contacto con el medio de enraizamiento, y su crecimiento fue más lento. Exitosamente, se obtuvieron 5 plantas transgénicas de la línea 35S-MdSDH y 7 de la línea control 35S-GFP. El control positivo del experimento fueron plantas no transformadas las cuales se sometieron al proceso de regeneración *in-vitro* pero sin ser sometidas a la selección por antibiótico. El control negativo fueron explantes no transformados los cuales se sometieron a los medios con antibiótico de selección. Estos explantes se pusieron necróticos a las 2 semanas de estar en el medio de inducción y posteriormente murieron.

4.1.4. Análisis molecular de tomates transgénicos: Micro-Tom

A las 12 plantas que se obtuvieron de las dos líneas (35S-MdSDH y 35S-GFP), se les extrajo ADN a partir de hojas. Además, se purificó ADN de dos plantas WT que también fueron obtenidas del procedimiento de cultivo *in-vitro*, sin el paso de transformación por *A. tumefaciens* (control positivo). Plantas del control negativo murieron debido al tratamiento con antibiótico, como era de esperar, y fueron descartadas. En las Figuras 7 y 8 se observan los geles obtenidos para cada línea transgénica (plantas transformadas establemente).

Para cada línea se amplificó el gen control 18S, de forma de comprobar la integridad del ADN (sección 3.5.3). Luego se amplificó el transgén de cada línea, es decir, MdSDH para la línea 35S-MdSDH (Figura 7.B) y el transgén GFP para la línea 35S-GFP (Figura 8.B). Finalmente se realizó un PCR cruzado para cada línea, es decir, se hizo la reacción con los partidores de GFP para la línea 35S-MdSDH y con los partidores MdSDH para la línea 35S-GFP. De esta manera se corrobora que no haya habido contaminación cruzada de las cepas de *Agrobacterium* o de las líneas de plantas en el proceso regenerativo.

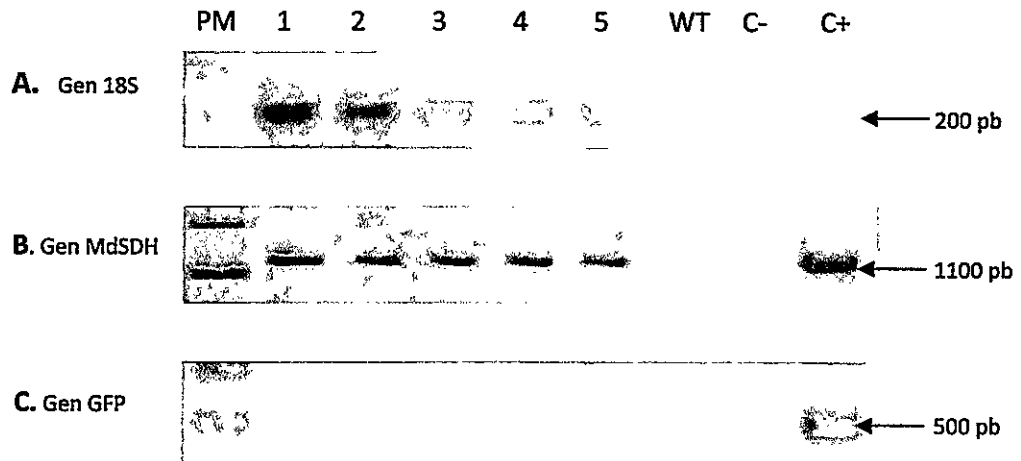


Figura 7: Amplificación de los genes 18S, MdSDH y GFP a partir de ADN genómico de las 5 plantas de tomate transformadas establemente con el vector 35S-MdSDH, y obtenidas del proceso de organogénesis somática. En A se muestra la amplificación del gen 18S, el cual genera una banda de 200 pb. En B se muestra la amplificación del transgén MdSDH, el cual genera una banda de 1100 pb. Se visualiza para las plantas transformadas (carriles 1-5), no así para la WT. En C se muestra la amplificación del transgén GFP. Como era de esperar, no hay amplificación, ya que las plantas no se transformaron con ese vector. C-: control negativo de la reacción de PCR, realizado con agua NP. C+: Control positivo, realizado con el ADN genómico (para el gen 18S) y plasmidial (obtenido de los vectores pCambia 35S-MdSDH (B) ó pCambia 35S-GFP (C)).

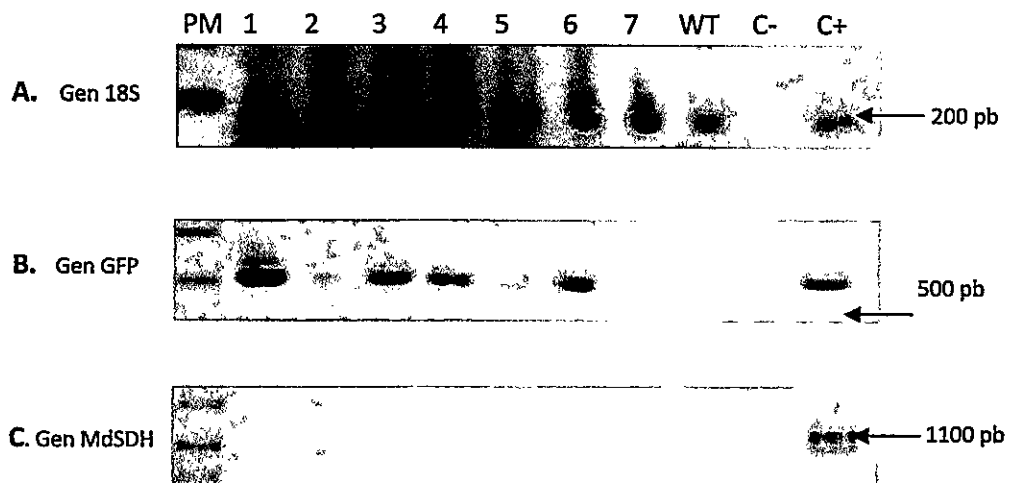


Figura 8: Amplificación de los genes 18S, GFP y MdSDH a partir de ADN genómico de plantas de tomate transformadas establemente con el vector 35S-GFP, y obtenidas del proceso de organogénesis somática. En A se muestra la amplificación del gen 18S, el cual genera una banda de 200. En B se muestra la amplificación del transgén GFP, el cual genera una banda de 500 pb. Se visualiza para las plantas transformadas (carriles 1-5), no así para la WT. En C se muestra la amplificación del transgén MdSDH. Como era de esperar, no hay amplificación, ya que las plantas no se transformaron con

ese vector. C-: Control negativo de la reacción de PCR con agua NP. C+: Control positivo realizado con ADN genómico (para el gen 18S) y plasmidial (obtenido de los vectores pCambia 35S-MdSDH (C) ó pCambia 35S-GFP (B)).

4.2 Medición de actividad SDH

Una vez obtenidas las líneas transgénicas se procedió al análisis de los extractos proteicos obtenidos desde frutos para medir actividad SDH. Inicialmente, este experimento se llevó a cabo con frutos transformados transitoriamente, con los cuatro vectores (35S-MdSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH y PG-GFP) ya que aún no se disponía de los frutos de las plantas transformadas establemente (plantas transgénicas 35S-MdSDH y 35S-GFP). De esta manera, se podría tener una aproximación de lo que ocurriría en los frutos de las plantas transgénicas, sobreexpresoras constitutivamente de SDH.

4.2.1 Análisis de actividad SDH en extractos de proteínas obtenidos de la transformación transitoria de frutos de tomate

Para llevar a cabo los experimentos de transformación transitoria y extracción de proteínas totales, se utilizaron tomates obtenidos comercialmente y que presentaban un bajo nivel de maduración (sección 3.2.2). Primero, se demarcaron 5 tomates (réplicas biológicas), en 4 partes iguales, una para cada vector con el que se transformaron (sección 3.6.1). Luego, se inyectó la suspensión de *Agrobacterium* portando los vectores de interés en el pericarpo de los frutos, verificando que la suspensión entraba al fruto, ya que se tornaba más oscuro. Luego de 4 días post-infiltración, se hizo una extracción total de proteínas. El extracto crudo se centrifugó una vez a 5000 x g (sección 3.6.2) para eliminar cualquier rastro de tejido del fruto y con el sobrenadante se realizaron los ensayos de actividad (sección 3.6.4).

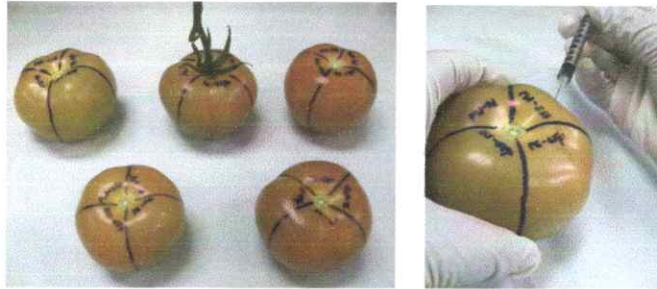


Figura 9: Procedimiento de infiltración de frutos de tomate. Tomates que presentaban un estadio temprano de maduración fueron infiltrados con las suspensiones de *Agrobacterium* portadora de los 4 vectores pCambia (35S-MdSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH y PG-GFP). En **A** las 5 réplicas biológicas fueron demarcados en 4 partes iguales, una para cada vector. En **B** se muestra la inyección de la suspensión de *Agrobacterium* en el pericarpio de los frutos, para la cual se utilizó una jeringa de 5 mm.

Para llevar a cabo los ensayos de actividad se preparó una solución de actividad que contenía sorbitol, el cual es el sustrato de la enzima SDH (secciones 1.2.4 y 3.6.4). La solución se hizo a pH 9 para favorecer la oxidación del sorbitol a fructosa y no la reacción inversa (Yamaguchi y cols, 1994). La reacción se midió en el espectrofotómetro a 340 nm, durante 10 minutos registrando los valores cada 20 segundos. Los valores obtenidos fueron graficados considerando 3 réplicas técnicas para cada vector con el que se infiltró cada réplica biológica.

En la Figura 10 se ven los gráficos obtenidos de los análisis de actividad de los tomates transformados transitoriamente. Se graficó la actividad de la proteína en nmol NADH producido / mg de proteína total (PT) por minuto para cada muestra. Las muestras 35S-MdSDH y PG-MdSDH se compararon con sus controles respectivos (35S-GFP y PG-GFP; sección 3.6.4).

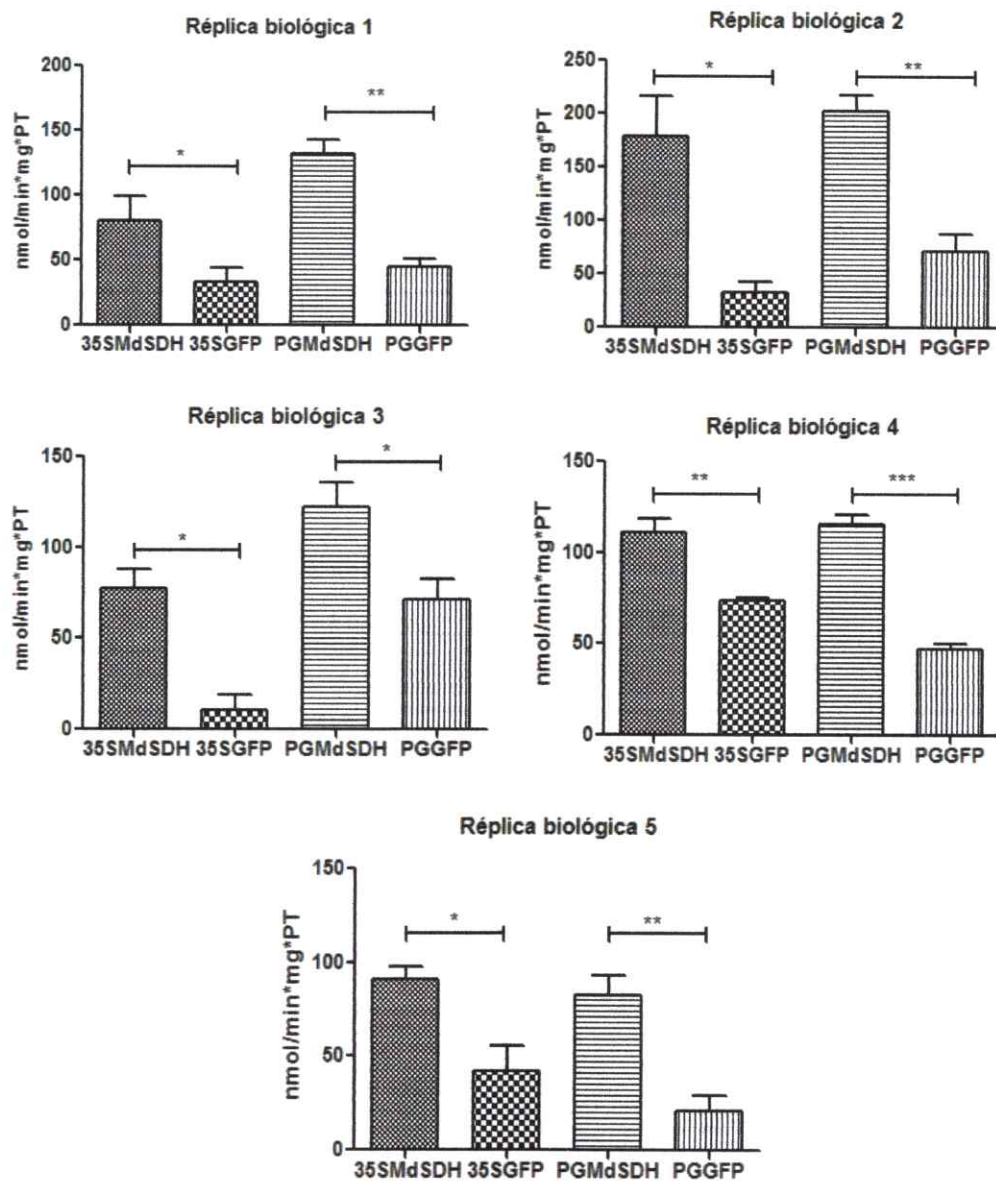


Figura 10: Actividad SDH en los frutos de tomates comerciales transformados transitoriamente con los vectores pCambia 35S-MdSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH y PG-GFP. En el eje Y se muestra la actividad SDH por minuto, medida en nmol NADH producido/mg proteína total (PT). En el eje X se presentan las 4 muestras correspondientes a cada uno de los vectores. Se hicieron análisis estadísticos con los que se comprobó la significancia en el aumento de actividad de las muestras transformadas con SDH vs sus respectivos controles GFP. Se aplicó test de Student no pareado, $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Las barras corresponden a las desviaciones estándar (SD).

En el gráfico de la réplica biológica 1 se aprecia que las muestras infiltradas con los vectores 35S-MdSDH y PG-MdSDH tienen una actividad significativamente mayor que sus controles respectivos; para el caso de 35S-MdSDH el promedio de actividad alcanza los 80 nmol /min*mg PT mientras el promedio de su control es de 35 nmol/min*mg PT. Los controles 35S-GFP y PG-GFP poseen valores cercanos de actividad, sin embargo, las muestras 35S-MdSDH y PG-MdSDH muestran una clara diferencia, obteniéndose mayor actividad en el extracto de PG-MdSDH para la réplica biológica 1. Tendencias similares fueron observadas en las otras cuatro réplicas biológicas. La actividad que se obtiene en los controles negativos, corresponde a la actividad basal que se produce por la SDH endógena del fruto.

Otra manera de expresar estos resultados es calculando el promedio de actividad de todas las réplicas biológicas juntas, considerando 3 réplicas técnicas para cada uno de los extractos. De esta manera se puede concluir más fehacientemente el aumento de actividad de aquellas muestras que fueron transformadas con el transgén de SDH bajo ambos promotores (Figura 11).

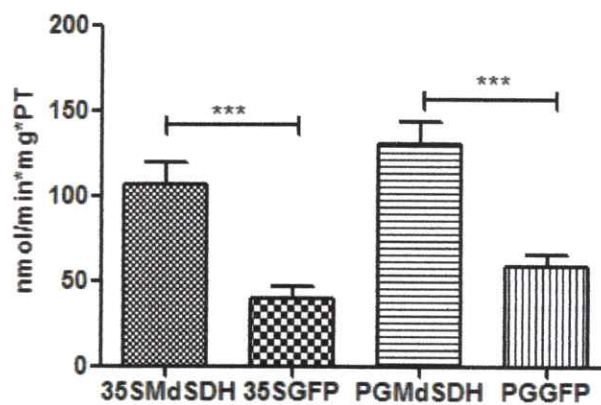


Figura 11: Actividad SDH promedio de los frutos de tomates comerciales transformados transitoriamente con los vectores pCambia 35S-MdSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH y PG-GFP. El gráfico muestra en el eje Y la actividad de SDH por minuto medida en nmol de NADH producido/mg proteínas totales (PT). En el eje X se muestra cada vector con el que se transformó las 5 réplicas biológicas, obteniéndose 3 réplicas técnicas para cada muestra. El análisis estadístico muestra un aumento significativo en las muestras transformadas con SDH frente a sus controles transformados con GFP. Se realizó un test de Student no pareado pvalue < 0,05 (*); p <0,01 (**); p <0,001 (***). Las barras corresponden a la desviación estándar.

El promedio de actividad SDH en la muestra 35S-MdSDH es de 107 nmol/min*PT y el promedio de su respectivo control, 35S-GFP, es de 40 nmol/min*PT. Es decir, hay un aumento de actividad de 2.6 veces. Para el caso de la muestra PG-MdSDH, el promedio es de 131 nmol/min*PT y la de su control PG-GFP es de 58 nmol/min*PT. Es decir, hay un aumento de 2.2 veces en la actividad SDH comparado con la de su control GFP.

En conclusión, estos resultados nos indican que todas las muestras transformadas con las cepas de *Agrobacterium* portador del transgén que codifica para SDH, presentan mayor actividad SDH. En resumen, fue posible determinar que: 1) Los vectores son funcionales, 2) Los promotores 35S y PG son promotores fuertes que producen niveles de actividad parecidos de SDH en frutos transformados y 3) comparando MdSDH (evaluada en este seminario de título) con LeSDH (evaluada por Aguayo (2010) y Mandujano (2008)) se concluye que ambas presentan tasas de actividad parecidas con respecto a los controles y que por este motivo, ambas son candidatas aptas para utilizar en etapas posteriores en el proyecto INNOVA.

4.2.2 Análisis de actividad SDH en extractos de proteínas obtenidos de la transformación estable de frutos de tomate Micro-Tom

Como se mencionó en la sección 4.1.2, se obtuvieron 5 plantas transgénicas de la línea 35S-MdSDH y 7 plantas transgénicas de la línea control 35S-GFP. Estas plantas dieron frutos a los 6 meses desde el proceso de transformación, y se hicieron los experimentos de medición de actividad SDH con extractos de proteínas de estos frutos. Para esto, se tomaron entre 3 a 4 tomates de una misma planta, los cuales presentaban un bajo estado de maduración, determinada por la coloración verdosa-amarilla, tratando de repetir las mismas condiciones que se utilizaron en la sección 4.2.1. Se hizo una extracción de proteínas totales (Lo Bianco y Rieger, 1998), para tres plantas de la línea 35S-MdSDH y tres plantas de la línea 35S-GFP, elegidas por ser las de mayor tamaño y que presentaban mayor cantidad de frutos al momento

del análisis, por lo tanto, se hicieron 6 análisis de actividad independientes, con tres réplicas técnicas para cada planta (las que correspondían a diferentes mediciones de la misma alícuota de extracto de proteína). Los resultados se visualizan en la Figura 12.

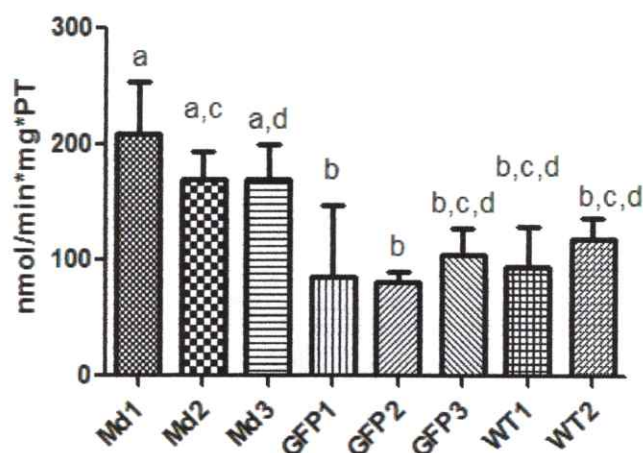


Figura 12: Análisis de actividad de SDH en los tomates Micro-Tom transformados establemente con 35S-MdSDH y 35S-GFP. El gráfico muestra en el eje Y la actividad de SDH por minuto medida en nmol NADH producido /mg proteínas totales (PT). La línea 35S-MdSDH está representada por la abreviatura Md1, Md2, Md3 correspondientes a las plantas 1, 2 y 3. Lo mismo ocurre para la línea 35S-GFP, la cual está representada para GFP1, GFP2 y GFP3 correspondientes a las plantas 1, 2 y 3. WT1 y WT2 corresponden a plantas de tomate silvestre. Se hizo análisis estadístico ANOVA de una vía 0,05 para las 8 muestras y posteriormente se realizó la comparación múltiple de Dunnet para comprobar las significancias entre las muestras. Las letras sobre las barras corresponden al análisis estadístico. Letras distintas entre barras muestran que existe diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En la Figura 12 se visualiza un aumento de actividad de SDH en las muestras pertenecientes a la línea que sobreexpresa SDH constitutivamente en comparación con las líneas que posee en su genoma el transgén control GFP o las plantas WT. El gráfico muestra las diferencias significativas entre las distintas líneas estudiadas. Se puede apreciar que Md1 presenta un aumento significativo al compararla con todos los controles GFP y WT. Sin embargo, las líneas Md2 y Md3 presentan sólo un aumento significativo frente a los controles GFP1 y GFP2.

Además, se calculó el promedio de la actividad SDH de cada línea transgénica, control y WT. Se tomaron los datos de la línea 35S-MdSDH (Md1, Md2 y Md3), se promediaron y se obtuvieron las desviaciones estándar. Lo mismo se hizo para las plantas de la línea 35S-GFP (GFP1, GFP2 y GFP3) y las dos plantas WT. Los resultados se presentan en la Figura 13.

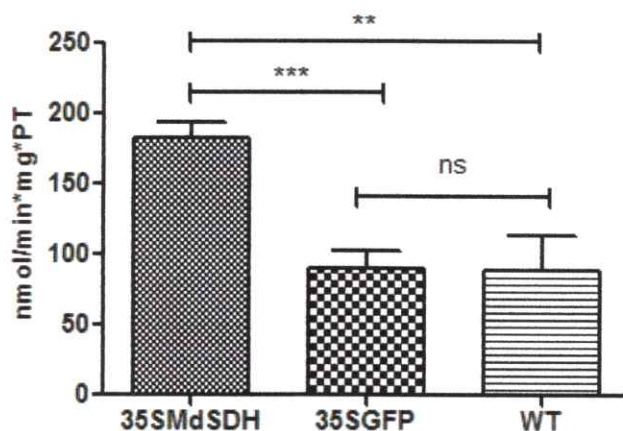


Figura 13: Análisis del promedio de actividad de SDH en los tomates Micro-Tom transformados establemente con 35S-MdSDH y 35S-GFP. El gráfico muestra en el eje Y la actividad de SDH por minuto medida en nmol NADH producido/mg proteínas totales (PT). En el eje X se muestra el promedio de cada línea transgénica (3 plantas), por una parte 35S-MdSDH y por otra 35S-GFP, utilizando 3 réplicas técnicas para cada planta (9 valores para cada análisis). Además se añade el promedio de las 2 plantas WT con 3 réplicas técnicas cada una. El análisis estadístico muestra un aumento significativo en las muestras transformadas con SDH frente a sus controles transformados con GFP. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Se realizó un test de Student no pareado, $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

En el gráfico, es posible observar un aumento estadísticamente significativo de actividad SDH en los frutos de tomate transformados establemente con el transgén MdSDH respecto al grupo control GFP y WT. Aproximadamente, el aumento que se genera es de 1,5 a 1,8 veces entre las líneas que sobre-expresan SDH frente a sus controles, GFP y WT.

En resumen, se puede concluir que la transformación estable y transitoria de tomates con el gen de la Sorbitol deshidrogenasa (SDH) resulta en un aumento significativo de actividad SDH con respecto a sus muestras controles (GFP), las cuales compartían el mismo promotor,

que podía ser el promotor constitutivo 35S o el promotor fruto específico PG (para el caso de las transformaciones transitorias). Resultados muy similares se obtienen al comparar las plantas transformadas establemente (transgénicas) con sus respectivos controles.

4.3 Clonación de los fragmentos obtenidos del vector pCambia en el vector PCP

Los vectores utilizados para transformar establemente plantas de tomate y transitoriamente frutos de tomate, correspondían al vector pCambia con los siguientes constructos: 35S-MdSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH, y PG-GFP (Seminario de título: Aguayo, 2010). Además en este trabajo se utilizaron otros 2 vectores, PG-LeSDH y 35S-LeSDH, obtenidos en el trabajo de seminario de título de Patricio Mandujano (2008). Sin embargo, pese a la utilidad que hemos obtenido con los vectores pCambia, se decidió clonar las secuencias de interés de 4 vectores (35S-MdSDH, 35S-LeSDH, PG-MdSDH, y PG-LeSDH) en el vector PCP el cual presenta el gen de resistencia al herbicida BASTA. De esta manera es probable que no presente complicaciones en la aceptación del consumidor (Gustafson, 2008; Vila Aiub y cols, 2008; Alimentos transgénicos con resistencia a BASTA que se comercializan; soya (1996), canola (1996), algodón (1997), maíz (2001)), ya que no posee el gen de resistencia a higromicina (presente en pCambia), el cual es un antibiótico de selección bacteriano.

Para llevar a cabo este objetivo, se procedió a hacer una extracción de ADN plasmidial de los cuatro vectores pCambia (datos no mostrados). Luego, se procedió con la amplificación de los fragmentos de interés, que comprenden promotor (35S o PG), gen (MdSDH o LeSDH) y terminador (NOS) con los partidores diseñados en este seminario de título (sección 3.5.2). La amplificación se llevó a cabo con la enzima Pfu polimerasa, la cual exhibe actividad exonucleasa en sentido 3'→5' impidiendo la incorporación de nucleótidos erróneos durante la amplificación. De los 4 fragmentos con los que se pretendía hacer la clonación en el vector PCP, se logró amplificar 3 de ellos (35S-MdSDH-NOS, 35S-LeSDH-NOS y PG-MdSDH-NOS,

Figura 14). A pesar de numerosos intentos, no se logró amplificar el fragmento PG-LeSDH-NOS.

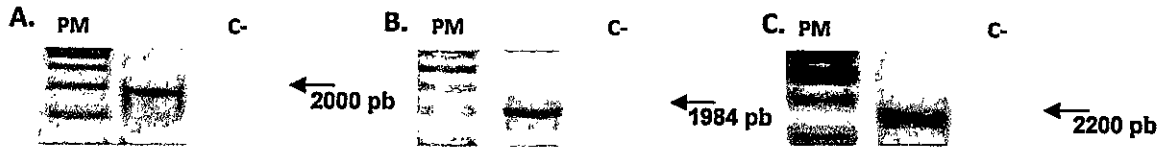


Figura 14: Amplificación de los fragmentos promotor-gen-terminador a partir de los vectores pCambia. Se observa el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. (A) Se distingue la banda de 2000 pb correspondiente al tamaño esperado para los fragmentos 35S-MdSDH-NOS, (B) 1984 pb para 35S-LeSDH-NOS y (C) 2200 pb para PG-MdSDH-NOS. PM: Estándar de peso molecular. C-: control negativo, realizado con agua NP.

Los fragmentos amplificados fueron purificados del gel (sección 3.5.5) y se agregó una adenina en el extremo 3' del producto de PCR (sección 3.5.3) para luego realizar la ligación en el vector pCR8 que posee una timina desapareada en el extremo 3'.

Posteriormente se transformó *E. coli* quimiocompetentes (sección 3.3.2), y luego se seleccionaron las colonias en LB suplementada con espectinomicina. Para corroborar que las colonias resistentes presentaban los fragmentos de interés, se realizó un PCR de colonia (sección 3.5.4, Figura 15).

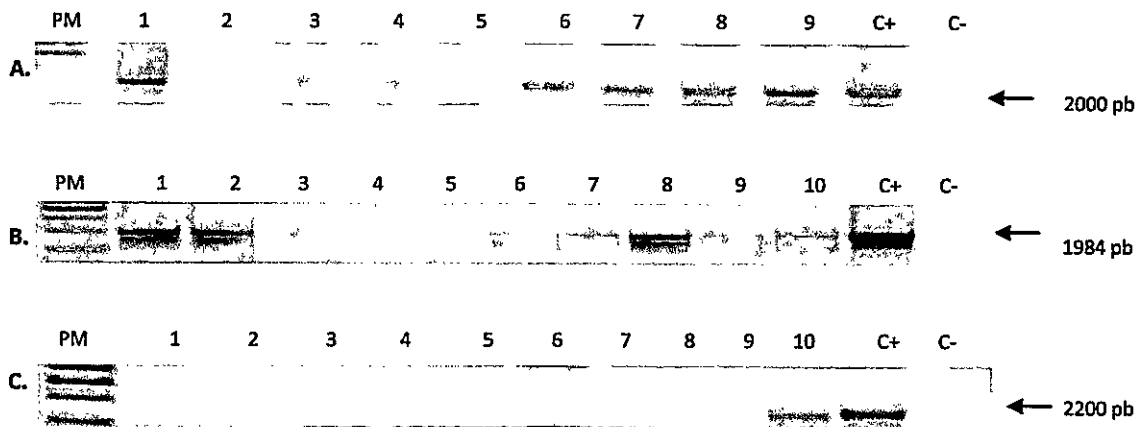


Figura 15: PCR de colonia para verificar la presencia de pCR8-35S-MdSDH-NOS, pCR8-35S-LeSDH-NOS y pCR8-PG-MdSDH-NOS en *E. coli*. La reacción de PCR tuvo como fin amplificar los fragmentos de interés clonados en el vector pCR8. En la figura, 1-10 corresponden a 10 colonias de *E. coli* seleccionadas para los análisis A: Amplificación de 35S-MdSDH-NOS (2000 pb), B: Amplificación de 35S-LeSDH-NOS (1984 pb), C: Amplificación de PG-MdSDH-NOS (2200 pb). PM: estándar de peso molecular. C+ corresponde a la amplificación del fragmento a partir de ADN plasmidial obtenido del vector pCambia. C- corresponde a la reacción realizada con agua NP.

A los clones positivos para el PCR de colonia, se les extrajo ADN plasmidial y posteriormente se sometieron a un análisis de restricción, con el fin de comprobar que el fragmento amplificado correspondía al clonado en pCR8 y no a una amplificación inespecífica. La digestión se hizo utilizando la enzima EcoRI. Los patrones de bandas se ven en las Figuras 16, 17 y 18.

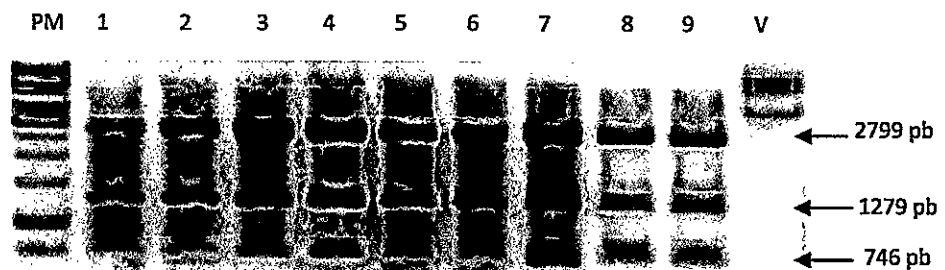


Figura 16: Digestión enzimática del vector pCR8-35S-MdSDH-NOS. Con el fin de analizar el fragmento clonado en *E. coli*, se digirió el plásmido con la endonucleasa EcoRI. Los tamaños esperados de banda corresponden a 2799 pb, 1279 pb y 746 pb, los cuales se distinguen en la imagen. Los números (1-9) corresponden a las colonias analizadas, V: vector pCR8 sin fragmento, digerido con la enzima EcoRI.

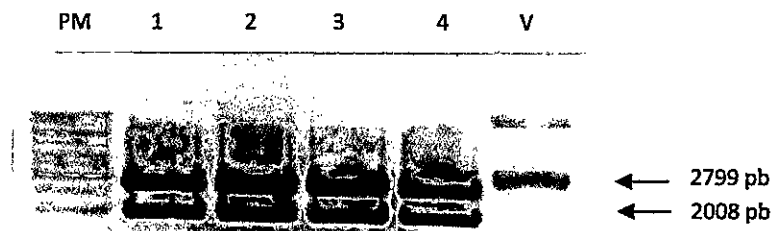


Figura 17: Digestión enzimática del vector pCR8-35S-LeSDH-NOS. Con el fin de analizar el fragmento clonado en *E. coli*, se digirió el plásmido con la endonucleasa EcoRI. Los tamaños esperados de banda corresponden a 2799 pb y 2008 pb, los cuales se distinguen en la imagen. Los números (1-4) corresponden a las colonias analizadas, V: vector pCR8 sin fragmento, digerido con la enzima EcoRI.

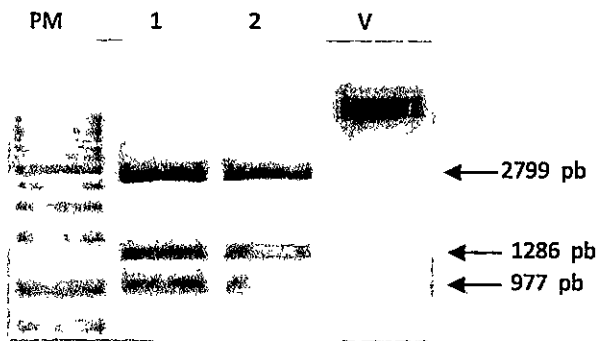


Figura 18: Digestión enzimática del vector pCR8-PG-MdSDH-NOS. Con el fin de analizar el fragmento clonado en *E. coli*, se digirió el plásmido con la endonucleasa EcoRI. Los tamaños esperados de banda corresponden a 2799 pb, 1286 pb y 977 pb, los cuales se distinguen en la imagen. Los números (1-2) corresponden a las colonias analizadas, V: vector pCR8 sin fragmento, digerido con la enzima EcoRI.

Como muestran las Figuras 16, 17 y 18, se comprobó mediante digestión enzimática que el vector había ligado correctamente con los tres fragmentos de interés. Pese a que la amplificación del fragmento se realizó utilizando la polimerasa Pfu, la cual es una enzima de alta fidelidad, se comprobó mediante secuenciación que el fragmento clonado no presentara mutaciones o corrimientos en el marco de lectura. La secuenciación de los ADN plasmidiales fue realizada en Macrogen Co. (USA), usando los partidores M13F y M13R (sección 3.5.6), los cuales se hibridan a secuencias flanqueantes al fragmento clonado. Sin embargo, estos dos partidores no son suficientes para secuenciar todo el fragmento, el cual mide entre 2000 a 2200 pb. Para esto, se utilizaron dos partidores internos (MdF y LeF) que hibridan en la zona intermedia (Figura 19.A, Tabla II). En los geles de agarosa de la Figura 19.B se ven las bandas amplificadas por PCR al usar los partidores internos MdF - MdR o LeF- LeR, utilizando el vector pCR8 como templado.

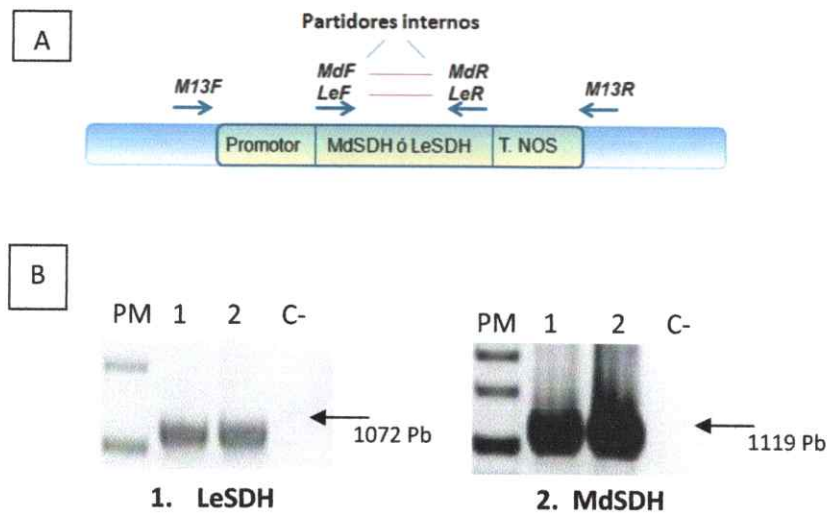


Figura 19: Diagrama de hibridación de los partidores que se utilizaron para la secuenciación. A. Los partidores M13F y M13R hibridan en zonas flanqueantes al fragmento clonado (Promotor-gen-terminador). Además se muestran los partidores adicionales que se usaron para secuenciar el fragmento completo (Partidores internos). Los partidores MdF y MdR amplifican el gen MdSDH mientras que los partidores LeF y LeR amplifican el gen LeSDH. B, Verificación de la funcionalidad de los partidores internos mencionados, 1 y 2 corresponden a dos ADN plasmidiales del amplificados por PCR 1. Con los partidores internos LeF y LeR (para pCR8-LeSDH) y 2. Con los partidores internos MdF y MdR (para pCR8-MdSDH). C -: corresponde al control negativo, que fue la reacción realizada con agua NP. PM: peso molecular.

Se secuenciaron 4 clones de cada línea con los partidores M13F, M13R y MdF (para 35S-MdSDH-NOS y PG-MdSDH-NOS) y con los partidores M13F, M13R y LeF (para 35S-LeSDH-NOS). Al menos uno de los clones no presentaba mutaciones ni corrimientos en el marco de lectura, es decir, tenían un porcentaje de identidad del 100% con la secuencia obtenida de los vectores pCambia (datos no mostrados) y estos fueron seleccionados para continuar con la digestión enzimática y posterior ligación.

Los partidores que se utilizaron para amplificar los fragmentos de los 3 vectores, fueron diseñados con sitios de restricción en sus extremos (sección 3.5.2). Una vez que se comprobó la identidad de secuencia de ADN de los clones transformados y se extrajo el ADN plasmidial, se digirió con las enzimas de restricción flanqueantes al fragmento. Se utilizaron las enzimas XmaI y XbaI, las cuales tienen sitios únicos de corte y también cortan el vector de destino PCP.

Primero se digirió pCR8-35S-LeSDH-NOS y PCP con XmaI y luego con XbaI, ambas cortan dejando extremos cohesivos, lo cual facilita la ligación final (Figura 20).

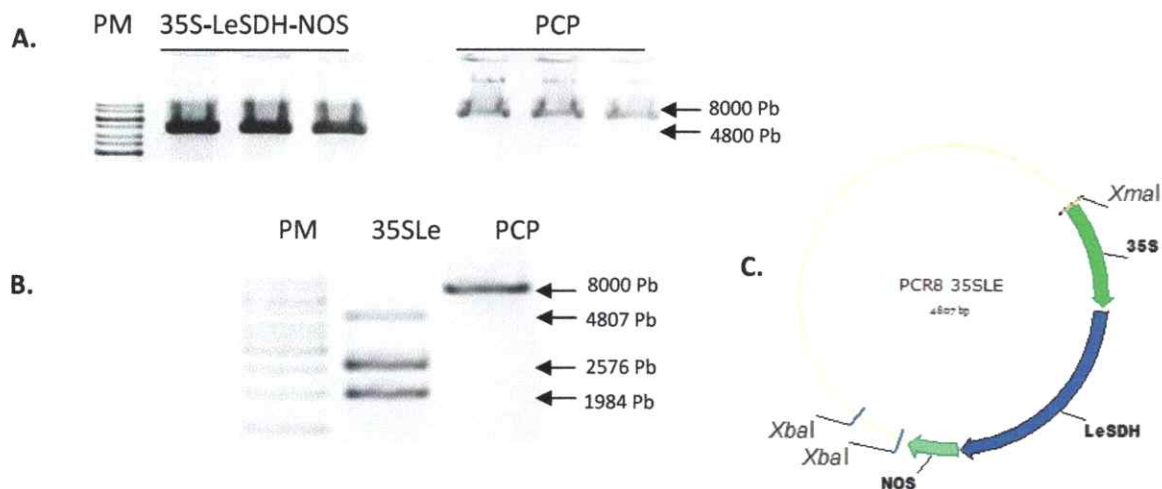


Figura 20: Digestión enzimática secuencial del vector pCR8-35S-LeSDH-NOS y del vector de llegada PCP. En **A** se muestra la digestión con XmaI, los tamaños esperados son de 4800 pb para el vector pCR8-35S-LeSDH-NOS y de 8000 pb para PCP. En **B** se muestra la segunda digestión con XbaI, los tamaños esperados de banda para el vector pCR8-35S-LeSDH-NOS son 4807 pb, 2576 pb y 1984 pb. El tamaño esperado para el vector PCP es de 8000 pb. En **C** se muestra el diagrama del vector pCR8-35S-LeSDH-NOS con los sitios de corte para ambas enzimas. Los análisis de restricción y diagramas de los otros dos vectores son parecidos (datos no mostrados).

Los tamaños de los fragmentos de interés correspondían a 1984 pb para 35S-LeSDH-NOS, 2000 pb para 35S-MdSDH-NOS y 2200 pb para el fragmento PG-MdSDH-NOS. Estos fueron purificados a partir de geles de agarosa de la digestión enzimática (sección 3.5.8). Posteriormente, se procedió a ligar los fragmentos en el vector de llegada PCP (sección 3.5.9), para luego transformar *E. coli* con esta reacción. Los cultivos transformados se dejaron crecer en agitación por 1 hr y luego se sembraron en placas, suplementadas con espectinomicina. Las colonias crecidas en las placas con antibiótico se sometieron a PCR de colonia con los partidores 35SMDF y 35SMDR (A); 35SLEF y 35SLER (B); PGMDF y PGMDR (C); para confirmar que poseían el fragmento de interés (Figura 21).

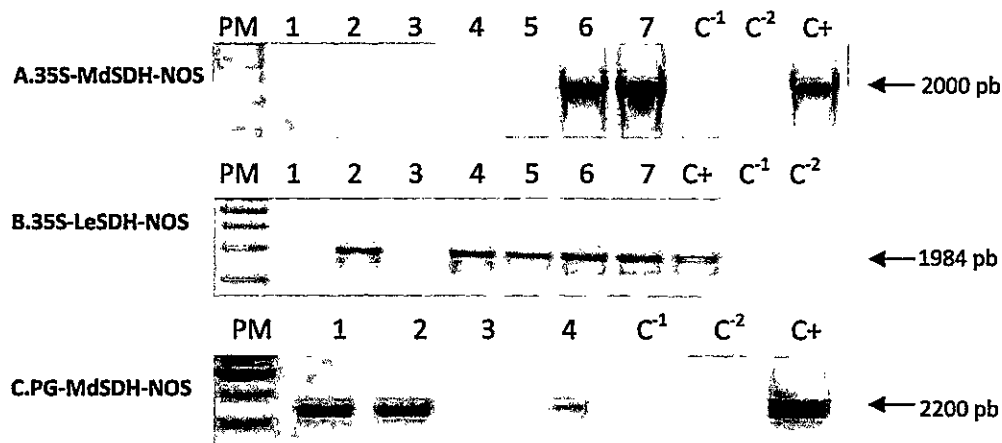


Figura 21: PCR de colonia de *E. coli* para corroborar la transformación con vector PCP-35S-LeSDH-NOS, PCP-35S-MdSDH-NOS y PCP-PG-MdSDH-NOS. Las colonias de *E. coli* fueron transformadas con PCP-35S-MdSDH-NOS (A), PCP-35S-LeSDH-NOS (B) y PCP-PG-MdSDH-NOS (C), y sujeto a PCR de colonia. El tamaño de los fragmentos esperados es de 1984 pb para 35S-LeSDH-NOS, 2000 pb para 35S-MdSDH-NOS, y de 2200 pb para PG-MdSDH-NOS. C⁻¹ corresponde al control negativo de agua, C⁻² corresponde al control negativo de la cepa de *E. coli* sin transformar, C⁺: control positivo, corresponde a ADN extraído del vector pCR8 de cada fragmento.

A las colonias que salieron positivas para el PCR de colonia se les extrajo ADN plasmidial y se realizó un nuevo PCR con los partidores 35SMDF y 35SMDR (B); 35SLEF y 35SLER (D); PGMDF y PGMDR (F) y un análisis de digestión, para corroborar la identidad del fragmento clonado (Figura 22). Los geles de los vectores PCP-35S-MdSDH-NOS y PCP-35S-LeSDH-NOS presentan el mismo patrón de bandas (2000 pb aprox.) (Figura 22.A, B, C y D). El patrón de bandas obtenido para el fragmento PG-MdSDH-NOS se muestra en la Figura 22.E y F.

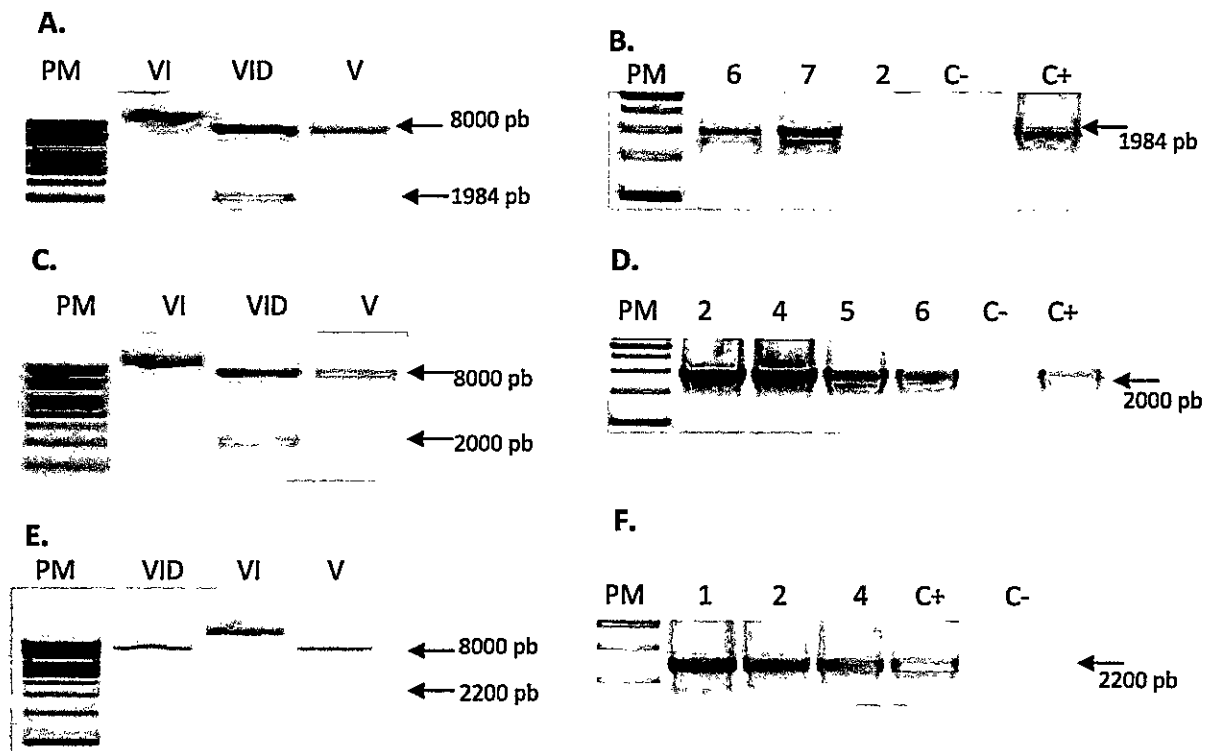


Figura 22: PCR y análisis de restricción de ADN plasmidial obtenido de *E. coli* transformadas con el vector PCP-35S-LeSDH-NOS, PCP-35S-MdSDH-NOS y PCP-PG-MdSDH-NOS. En A se muestra el ensayo de restricción con las enzimas de restricción XbaI y XmaI, resultando el fragmento de 1984 pb correspondiente al fragmento 35S-LeSDH-NOS. En B se muestra el PCR hecho en base al ADN plasmidial obtenido, amplificando un fragmento esperado de 2000 pb del fragmento 35S-MdSDH-NOS. En C se muestra la digestión del vector PCP-35S-MdSDH-NOS con las enzimas de restricción XbaI y XmaI, liberando un fragmento de 2000 pb. En D se muestra el análisis de PCR para el vector PCP-35S-LeSDH-NOS, amplificando un fragmento esperado de 1984 pb. En E se muestra la digestión para el vector PCP-PG-MdSDH-NOS, liberándose el fragmento PG-MdSDH-NOS de 2200 pb. En F se muestra el PCR realizado para vector PCP-PG-MdSDH-NOS que amplifica una banda de 2200 pb. VID: vector con inserto y digerido. VI: Vector con inserto sin digestión. V: Vector PCP sin inserto y con digestión. El C+ corresponde a la reacción de PCR llevada a cabo con ADN plasmidial del vector pCambia correspondiente. C- corresponde a la reacción realizada con agua NP.

Una vez comprobado mediante PCR y análisis de restricción que los fragmentos estaban clonados correctamente en el vector PCP, se purificó el ADN plasmidial a partir de *E. coli* y se transformó *A. tumefaciens* (sección 3.3.4), para que estos vectores se puedan utilizar posteriormente en transformaciones de especies vegetales. Una vez que se transformó *A.*

tumefaciens mediante golpe térmico, se dejó creciendo el cultivo 1 hora y luego la suspensión se sembró en placas suplementadas con espectinomicina. Al cabo de dos días se obtuvieron numerosas colonias, de las cuales se eligieron entre 4-6 y se hizo un PCR de colonia con los partidores 35SMDF y 35SMDR (A); 35SLEF y 35SLER (B); PGMDF y PGMDR (C) (Figura 23).

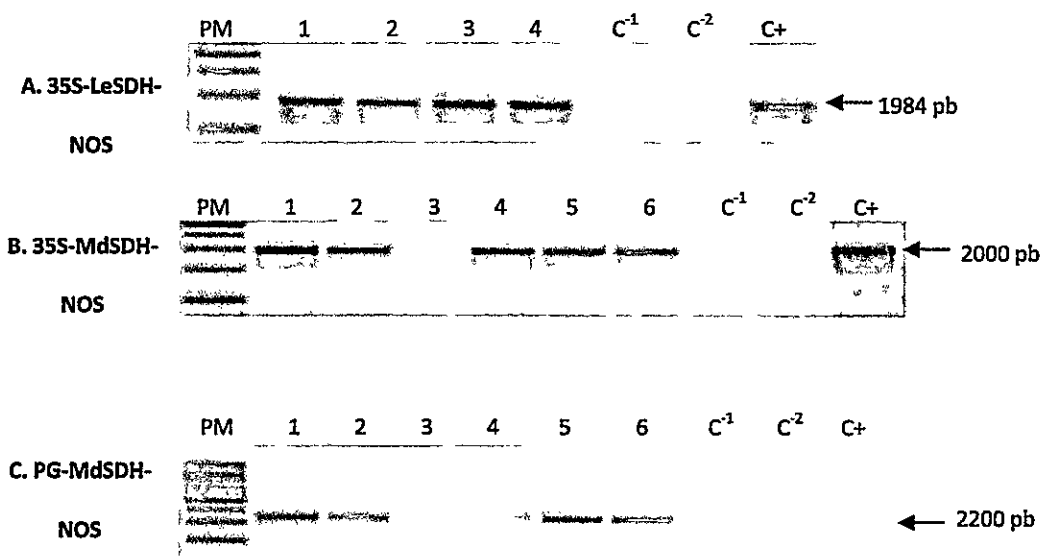


Figura 23: PCR de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con PCP-35S-MdSDH-NOS, PCP-35S-LeSDH-NOS y PCP-PG-MdSDH-NOS. El tamaño de los fragmentos amplificados esperados es de 1984 pb para 35S-LeSDH-NOS (A), de 2000 pb para 35S-MdSDH-NOS (B) y 2200 pb para PG-MdSDH-NOS. Los números (1-4 (A), 1-6 (B, C)) corresponden a las colonias elegidas. C⁻¹ corresponde al control negativo de agua, C⁻² corresponde al control negativo de la cepa de *A. tumefaciens* sin transformar, C+ corresponde al control positivo, que es ADN plasmidial del vector pCR8 portador de los fragmentos correspondientes. PM: Marcador de peso molecular.

Finalmente, mediante análisis de digestión, PCR convencional y PCR de colonia se comprobó la clonación en el vector PCP, de las secuencias de interés que pertenecían a los vectores pCambia. Colonias de *Agrobacterium tumefaciens* fueron exitosamente transformadas con los vectores PCP-35S-MdSDH-NOS, PCP-35S-LeSDH-NOS y PCP-PG-MdSDH-NOS. Se hicieron alícuotas de estos cultivos y se guardaron a -80 °C para experimentos futuros.

5. DISCUSIÓN

El objetivo del proyecto en el cual se enmarca este seminario de título, tiene como finalidad el incremento del dulzor en los frutos de manzanos. Para lograr este objetivo, es necesaria la sobre-expresión fruto-específica de la enzima SDH, que oxida el sorbitol en fructosa, un azúcar con un mayor poder edulcorante. Se requiere de la sobre-expresión fruto-específica, ya que se ha reportado que la sobreexpresión de SDH bajo un promotor constitutivo produciría manzanos de menor tamaño y con frutos de menor calidad (Teo y cols, 2006). Por lo tanto, con esta estrategia se potenciaría el dulzor en el fruto, manteniendo la calidad de la planta y la fruta. Con el objetivo de evaluar en el corto plazo y verificar la funcionalidad de vectores construidos anteriormente, se implementó y desarrolló un procedimiento de transformación (estable y transitoria) del sistema vegetal modelo Tomate.

Transformación estable de plantas de tomate: En primer lugar, se transformaron plantas de tomates establemente con los vectores pCambia obtenidos en los seminarios de título de Patricio Mandujano (2008; 35S-LeSDH y PG-LeSDH) y Francisca Aguayo (2010, 35S-MdSDH y PG-MdSDH). En un comienzo, se utilizó la variedad Ailsa Craig ya que se contaba con un protocolo de transformación generado en el laboratorio del Dr. Patricio Arce (P. Universidad Católica de Chile), con el cual se habían registrado porcentajes de transformación altos, cercanos al 10%. Siguiendo este protocolo, se realizó el procedimiento de transformación de Ailsa Craig con los 4 vectores pCambia 1302 portadores de los siguientes constructos: 35S-MdSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH y PG-GFP. Solamente se obtuvieron 3 plantas transgénicas de la línea PG-GFP, las cuales fueron corroboradas por análisis de PCR de los transgenes (Figura 5). Sin embargo, pese a los reiterados esfuerzos y múltiples transformaciones realizadas, no fue posible obtener plantas transgénicas de las otras 3 líneas, lo que podría haber sido causado por numerosas causas. Hay múltiples factores que intervienen en el proceso de transformación, entre ellos se encuentran: 1. El estadio de los explantes a transformar; este depende de la

variedad a transformar, que en el caso de Ailsa Craig correspondía a plántulas de una semana post-germinación; 2. El inóculo de *Agrobacterium* que se utiliza, generalmente se requiere que la D.O (600 nm) se encuentre en un rango de 0,2 hasta 1,0 (se ha reportado que D.O más altas, 0,8-1,5, disminuyen la tasa de transformación (Vinoth y cols, 2013); 3. El tiempo que se mantienen a los explantes transformados en el medio de co-cultivo el cual está suplementado con acetosiringona (compuesto fenólico que estimula el proceso de transformación; Jeroen y cols, 1993) y la concentración de este compuesto; 4. Además se ha reportado que la cepa de *Agrobacterium* influye en la efectividad de la transformación estable (Jeroen y cols, 1993), al igual que las concentraciones de hormonas vegetales en el proceso de regeneración, según la variedad vegetal que se transforme (Dang Thi Van y cols, 2010). Como se observa, son varios los factores que están interviniendo en el proceso y posiblemente, fue más bien una situación multifactorial la que generó que se redujeran los niveles de transformación de las plantas y que finalmente sólo se obtuvieran transformantes de una sola línea (el que fue de un 1,32% para los tomates transformados con PG-GFP, variedad Ailsa Craig). Entre los múltiples factores que pudieron haber ocasionado en conjunto este problema, se podría encontrar el estadio de los explantes a transformar. Aunque se esterilizan y se siembran las semillas a los mismos tiempos, la germinación es un proceso independiente entre las semillas y no uniforme, es decir, hay semillas que pueden germinar uno o dos días después que otras. Pese al intento de transformar aquellos explantes con los mismos días post-germinación, se pudieron haber transformado explantes que tenían una diferencia de al menos un día debido a que es prácticamente imposible diferenciarlas ya que en tamaño son iguales. Se ha reportado que esta pequeña diferencia en el estadio de los explantes, reduce considerablemente los porcentajes de transformación (reducción de hasta 30%, Pino y cols, 2010). Otro de estos múltiples factores que pudieron afectar, puede ser que la D.O con la que se transformó no haya sido la óptima para esta variedad. El rango de D.O de los cultivos utilizados para las transformaciones estables de esta cepa, es bastante amplio. Pese a que se nos recomendó realizar las

transformaciones con una D.O 0.8, hay reportes para la misma variedad en la que se utilizan D.O entre 0,3 - 0,5 (Alvarez y cols, 2012); Otro detalle importante, es que aquellos explantes que se transformaron de las 3 líneas no resultantes (PG-MdSDH, 35S-GFP y 35S-MdSDH), se contaminaron rápidamente con *Agrobacterium*, el cual creció vigorosamente en las placas, formando una masa de cultivo sobre los explantes transformados y generando que el tejido se pusiera necrótico rápidamente (en 2 semanas). Una D.O no apropiada, la carencia de algún aditivo en los medios de cultivo, el estadio de los explantes y el tiempo de contacto con *Agrobacterium*, entre otros; pudieron ser factores que ocasionaron que de estas plantas no se generaran transformantes, considerando que aunque el experimento se trate de hacer igual para las 4 líneas, éstas son independientes, y se pueden tener estos errores en líneas por separado. Otro factor clave en el proceso de transformación y que tiene directa relación con el inusual crecimiento de las colonias de *Agrobacterium* es la utilización del antibiótico cefotaxime para controlar esta cepa bacteriana. Se han realizado estudios que demuestran que cefotaxime disminuye notoriamente la diferenciación de los brotes y que junto a otros antibióticos (kanamicina, higromicina) muestra un efecto negativo en el crecimiento del callo, de la regeneración de los brotes y del porcentaje de eficiencia de regeneración de las plantas transformadas (Ling y cols, 1998). Es posible que las cepas de *Agrobacterium* hayan adquirido resistencia a este antibiótico y que con el paso del tiempo haya sido cada vez más difícil poder controlarlo, teniendo que aumentar gradualmente la concentración del antibiótico en los medios (desde 200 mg/L hasta 400 mg/L en el caso de la variedad Ailsa Craig y Red cherry) y generando como consecuencia directa la disminución y pérdida de algunos brotes transformados.

Las 3 plantas PG-GFP transgénicas generadas, posteriormente murieron cuando llevaban pocas semanas en el medio de elongación. Las posibles causas de esta situación pudieron deberse a que las condiciones establecidas no eran las adecuadas para esta variedad, a un crecimiento inesperado de *Agrobacterium* en las placas que contenían cefotaxime y/o a un

drástico cambio en el medio en el que se encontraban, pasando de un medio enriquecido en hormonas vegetales a un medio basal cuyo único suplemento era el antibiótico de selección.

Dado estos resultados con Alisa Craig, se procedió a transformar otra variedad con un ciclo de vida más corto, para así tener en un menor tiempo plantas de tomates transgénicos. Se eligió la variedad Red Cherry, la cual presenta un ciclo de vida de 5 meses y tomates de un menor tamaño, consiguiendo frutos más rápidamente que la variedad Ailsa Craig. Se siguió el mismo protocolo que para la variedad Ailsa Craig, sin embargo, con esta variedad no se obtuvieron transformantes. Pese a ser la misma especie vegetal, el proceso de transformación depende de cada variedad, ya que tienen distintas restricciones, ocasionadas por un nivel endógeno distinto de hormonas vegetales, el explante seleccionado para transformar y la edad del tejido de donde se obtenga el explante (Sharma y cols, 2009). Finalmente, se eligió la variedad Micro-Tom para continuar con las transformaciones estables, ya que se había reportado en la literatura un proceso de transformación simple, rápido y eficiente (Pino y cols, 2010). Con esta variedad de tomate se lograron resultados satisfactorios. Específicamente, se obtuvieron 5 y 7 plantas transformadas con 35S-MdSDH y con 35S-GFP (control), respectivamente, con porcentajes de transformación cercanos a los que aparecen en la literatura (3,9% N: 838, Guo y cols, 2012). Se corroboró la transgenia de estas plantas con análisis moleculares de PCR para amplificar los genes con los que se transformó (MdSDH y GFP; Figura 7). Las líneas PG-GFP y PG-MdSDH no fueron posibles de obtener, porque los explantes que fueron transformados presentaban un crecimiento excesivo de *Agrobacterium*, cubriendo todo el explante y produciendo la necrosis del tejido. Los motivos que pudieron ocasionar esto, son los mismos que se mencionaron anteriormente para la variedad Ailsa Craig. La única característica común entre todas estas transformaciones es que aquellos explantes que fueron inoculados con *Agrobacterium* presentaban tasas mucho menores de regeneración que los controles positivos (los cuales siguieron el proceso de organogénesis somática, sin

inocular previamente con *Agrobacterium*), lo cual también ha sido reportado en trabajos previos (Park y cols, 2003).

Con las plantas transgénicas generadas en este trabajo de seminario de título, se realizaron análisis de actividad de SDH, a partir de los frutos transgénicos para corroborar la expresión y la actividad del gen, además de verificar la funcionalidad del promotor 35S.

Actividad SDH en frutos de tomate transformados transitoriamente: Paralelamente a la transformación estable de tomates, se realizaron transformaciones transitorias en frutos, con la finalidad de comprobar la expresión y medir la actividad de SDH en los frutos transformados. Para estos análisis se contaron con 5 réplicas biológicas (5 tomates independientes) que fueron agroinfiltrados con una suspensión de *Agrobacterium* que llevaba los constructos de interés en pCambia (35S-MdSDH, 35S-GFP, PG-MdSDH y PG-GFP), es decir, utilizando el gen SDH de manzana (MdSDH) y sus respectivos controles (GFP). Los resultados obtenidos son muy alentadores al objetivo del proyecto, ya que hay un incremento estadísticamente significativo (hasta 2,2 veces) en las actividades obtenidas con los vectores que tienen la SDH frente a los que llevaban GFP (la cual no debería dar un incremento pronunciado; Figuras 10 y 11). En todas las muestras, tanto en los extractos agroinfiltrados con SDH como de GFP, se muestra actividad SDH. Los extractos obtenidos de GFP muestran una actividad basal, que se mantiene e incrementa levemente en el tiempo, ocasionada por la SDH endógena del fruto (Ohta y cols 2005). Sin embargo, la diferencia de actividad entre las muestras GFP y las SDH se debe a la transformación con MdSDH en el tejido. Por lo tanto, para obtener los valores de actividad que se obtienen de la transformación con SDH, es que a los valores de las actividades obtenidas con 35S-MdSDH se le debe restar el valor de 35S-GFP (basal), al igual que a PG-MdSDH se le debe restar el valor de PG-GFP. De esta manera, se encontró que los niveles de actividad de SDH de extractos de proteínas totales obtenido a partir de frutos transformados con los vectores 35S-MdSDH y PG-MdSDH medidos en este trabajo, variaban entre 0,06-0,07 $\mu\text{mol/mgprot}^*\text{min}$.

Otro punto importante, es que las réplicas biológicas poseen diferencias de actividad entre ellas (Figura 10). Estas diferencias pueden deberse a la eficiencia de transformación utilizando el procedimiento de agroinfiltración en frutos, y además a posibles diferencias en los niveles de SDH endógenos entre ellas, los cuales dependen del grado de madurez de cada fruto. Por otra parte, las reacciones se suplementaron con 3 μM de ZnSO_4 , tal como aparece en Negm y Loescher (1979), con la finalidad de revertir una posible inhibición por cisteína. Para descartar la posibilidad de un artefacto de la reacción suplementada con Zn^{+2} , se hicieron controles negativos, con todos los componentes de la reacción, excepto el extracto proteico. De estos controles, no se obtuvo actividad, tal como se esperaba. Es posible que para llevar a cabo la reacción se necesitara Zn^{+2} , ya que como se mencionó en la introducción, este es un ión estructural del sitio catalítico, y se ha reportado en experimentos en los cuales se purificó SDH de tomate, que iones de Zn^{+2} fueron esenciales para mantener la actividad de SDH durante la diálisis (Yamada y cols, 1998; Karlsson y Höög, 1993; Ohta y cols, 2005).

Aunque se ha determinado que existe un aumento de actividad SDH en los frutos transformados transitoriamente, esta al parecer no es tan grande. Al no existir trabajos relacionados con el aumento de actividad SDH en plantas, no existe un patrón con el cual comparar y sólo se puede plantear que la transformación transitoria mediante agro-inyección, genera un leve aumento en la actividad SDH medida, ya que sólo una fracción de las células vegetales está expresando el transgén.

Actividad SDH en frutos de tomate transformados establemente: Se realizaron análisis de actividad a los frutos de las plantas transformadas establemente con 35S-MdSDH, 35S-GFP y plantas WT, para evaluar cómo se comportaba este sistema, y si realmente se obtenía mayor actividad SDH en una transformación estable sobre-expresando SDH. Los extractos obtenidos de las plantas transformadas con 35S-MdSDH presentaron mayor actividad que aquellas que fueron transformadas con 35S-GFP, y que las plantas controles WT (Figuras 12 y 13). Los niveles de actividad para las plantas 35S-MdSDH se encontraban entre los 160-200

nmol/mgprot*min, frente a los 80-110 nmol/mgprot*min de las plantas GFP y WT. De esta manera, se obtuvo una actividad neta que variaba entre los 90-100 nmol/mgprot*min (valores obtenidos de 35S-MdSDH menos su control 35S-GFP). Los valores obtenidos para las plantas transformadas establemente son ligeramente mayores que los encontrados para las plantas transformadas transitoriamente con esos mismos vectores. Esto puede deberse a la variedad que se utilizó para las mediciones. En el caso de la transformación estable se utilizaron tomates variedad Micro-Tom y para las mediciones transitorias se utilizó una variedad comercial, probablemente los factores que pueden influir en estas diferencias son sus estados de maduración, sus niveles de hormona etileno u otros cambios a nivel molecular. Otro punto a considerar es que en la transformación transitoria se transforman sólo algunas células vegetales, el ADN introducido se expresa por un periodo corto de días y no se traspasa a la progenie. El hecho de que sólo se transformen algunas células vegetales y no estén todas transformadas, podría disminuir los niveles de actividad al compararla con una planta que esté homogéneamente transformada. Las plantas transformadas establemente corresponden a esta última descripción, aunque no se puede descartar que no se hayan formado quimeras, ya que sólo se obtuvo una generación de plantas transformadas establemente. Lo más importante, es recalcar que en ambos casos se obtuvo un aumento significativo de actividad de las muestras que sobre-expresaban SDH frente a aquellas que sobre-expresaban GFP, y la tasa de aumento en ambos casos fue muy parecida, entre 1,5 a 2,2 veces.

Clonación en PCP: Otro de los objetivos de este trabajo, fue subclonar los genes de SDH, más sus promotores y terminadores de los vectores pCambia en el vector PCP que posee resistencia al herbicida BASTA, mejor conocido como glifosato y utilizado ampliamente para el cultivo de plantas transgénicas en otros países (Gustafson, 2008; Vila Aiub y cols, 2008; Alimentos transgénicos con resistencia a BASTA que se comercializan; soya (1996), canola (1996), algodón (1997), maíz (2001)). Por este motivo es que se decidió clonar los constructos

en un vector con resistencia a un herbicida, ya que si se llegase a obtener el producto comercial (manzanas con mayor duizor), sería más aceptable entre los consumidores de dicho frutos que la selección de esas plantas se haya hecho con un herbicida que con un antibiótico bacteriano, ya que esta última causa cierta desconfianza en la población, mientras que la selección con herbicidas posee mayor aceptación en el mercado y es la que comúnmente se utiliza para seleccionar plantas transgénicas. Para lograr la clonación efectiva de los constructos, se diseñaron partidores específicos que poseían sitios de corte comunes con el vector PCP. Los fragmentos clonados correspondían al promotor-gen-terminador, en donde el promotor podía ser 35S o PG, el gen era MdSDH ó LeSDH y el terminador NOS. Se trataron de amplificar los 4 fragmentos por PCR: 35S-MdSDH-NOS, 35S-LeSDH-NOS, PG-MdSDH-NOS y PG-LeSDH-NOS. Para lograr este objetivo, se diseñaron 4 pares de partidores, uno para cada vector. Se hizo de este modo, ya que no fue posible encontrar partidores comunes óptimos entre los vectores, pese a que todos compartían el terminador NOS y habían sólo dos promotores distintos. Esto fue causado ya que las secuencias MdSDH y LeSDH presentan diferencias que causaban uniones inespecíficas con los partidores comunes que se trataron de diseñar. Finalmente se logró clonar los tres vectores en PCP, obteniéndose PCP-35S-LeSDH-NOS, PCP-35S-MdSDH-NOS y PCP-PG-MdSDH-NOS, los cuales fueron clonados en *Agrobacterium*. Las colonias positivas fueron guardadas a -80°C para trabajos futuros.

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Este seminario de título se dividió en tres ejes principales. Por una parte, mediante el uso de herramientas biotecnológicas, se transformó establemente tomates de la variedad Micro-Tom, con el gen que codifica para sorbitol deshidrogenasa de manzana. Los vectores utilizados para la transformación mediada por *Agrobacterium* correspondían a los vectores binarios pCambia. Estos tienen clonada a SDH bajo dos promotores, uno constitutivo (35S) y uno fruto específico (PG). Exitosamente se obtuvieron 2 líneas transgénicas, correspondientes a 35S-MdSDH y 35S-GFP. Con estas líneas se realizaron análisis de actividad SDH, con los cuales se comprobó que el gen se expresa y que se obtiene una mayor actividad SDH en aquellas plantas que fueron transformadas con el vector 35S-MdSDH. La tasa de aumento de actividad SDH que se obtuvo fue de 1,8 - 2,2 veces frente a las muestras controles.

El segundo punto que se abarcó, fue la transformación transitoria de frutos de tomate con los vectores pCambia, mediante agro-infiltración en el pericarpo de los frutos. Al igual que con los frutos transformados establemente, se midió la actividad SDH frente a su control GFP, encontrando un aumento en la tasa de actividad de SDH de 1,8 veces frente a su control. Los valores obtenidos de la transformación estable, como de la transformación transitoria son comparables entre sí y bastante similares, lo que indica que la técnica de agroinfiltración es adecuada para tener una aproximación de los resultados que se pueden obtener de una transformación estable.

Como tercer punto, se realizó la clonación de los constructos de interés de los vectores pCambia, en el vector PCP, el cual tiene resistencia al herbicida BASTA. Para lograr este objetivo se diseñaron partidores específicos, se amplificaron las secuencias con una polimerasa de alta fidelidad (Pfu) y posteriormente se clonaron en el vector de clonación pCR8. Finalmente se comprobó la correcta clonación de los fragmentos en PCP y se transformó *Agrobacterium tumefaciens* con estos vectores.

se comprobó la correcta clonación de los fragmentos en PCP y se transformó *Agrobacterium tumefaciens* con estos vectores.

Como proyecciones de corto y mediano plazo, se pretende generar las líneas de tomates transgénicos restantes (PG-MdSDH y PG-GFP). Además se podrían incluir las líneas 35S-LeSDH y PG-LeSDH, ya que de esta forma se podrían comparar las SDH obtenidas desde dos especies distintas, para determinar cuál de ellas posee una mayor actividad enzimática y es la más adecuada para transformar manzano. Aunque con los resultados de este seminario de título y los trabajos anteriores (Francisca Aguayo, 2010; Patricio Mandujano, 2008) se podría concluir que ambas enzimas (MdSDH ó LeSDH) son aptas para este objetivo.

Además, se podrían realizar Southern Blots para ver el número de copias con las que se insertó el gen de SDH al genoma de las plantas transformadas establemente. Al ser una transformación mediada por *Agrobacterium*, la inserción es aleatoria y puede ser en tándem.

Otra proyección del trabajo, es realizar ensayos de expresión génica (qRT-PCR), para medir los niveles de SDH de las plantas transformadas establemente frente a las transformadas con GFP o plantas WT.

Se podrían realizar las transformaciones posteriores de plantas, con los vectores PCP desarrollados en este seminario de título, para evaluar su funcionalidad y la resistencia efectiva al herbicida BASTA.

Finalmente, se podrían realizar ensayos de HPLC para corroborar la conversión de sorbitol en fructosa, en el fruto de la manzana transgénica.

Cabe destacar, que la modificación de la ruta de los azúcares mediante la sobre-expresión de la enzima SDH, podría ser aplicable para cualquier miembro de la familia de las Rosáceas, entre ellas se encuentran: durazno, peral, ciruelas, damascos, entre otros, ya que

todas estas especies traslocan sorbitol por el floema, como el principal metabolito de la fotosíntesis. En términos económicos, las exportaciones de estas especies corresponden al 40,9% del total de la fruta fresca (ODEPA, Boletín frutícola 2013), por lo que sería muy interesante poder ampliarse a estas especies. Para conseguir este objetivo, se podrían utilizar los vectores pCambia con los cuales se trabajó a lo largo del proyecto INNOVA, siempre y cuando la metodología de transformación estable sea conocida para las otras especies.

Cabe aclarar, que actualmente los organismos genéticamente modificados se rigen por la resolución exenta 1.523 del SAG (año 2001), la cual establece que se permite solamente la multiplicación de semillas de plantas transgénicas. En este aspecto, Chile no ha aprobado el consumo de alimentos transgénicos, ya que las normas técnicas en este punto, aún no han sido dictadas. Por lo tanto, se requiere de un cambio de legislación para la comercialización y consumo de alimentos transgénicos en el país.

7. CONGRESOS

- XXXV Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, 2012.
Trabajo "Development of a premium variety of apple seedlings with greater sweetness".
Díaz F., Aguayo F., Mandujano P., Zamudio S., Araya J., Arcos Y., Arce P., Norambuena L., Stange C., Handford M. Modalidad póster (1° autora).
- I Congreso nacional de Estudiantes de Ingeniería en Biotecnología, Chile 2012.
Trabajo "Evaluación bioquímica y molecular de plantas de tomate Micro-Tom transformadas establemente con sorbitol deshidrogenasa". Díaz F., Aguayo F., Handford M. Modalidad presentación oral.
- 6th Rosaceous Genomics Conference, Italia 2012.
Trabajo "Development of a premium variety of apple seedlings with greater sweetness".
Handford M, Díaz F., Aguayo F, Mandujano P, Zamudio S, Araya J, Arcos Y, Arce P, Norambuena L, Stange C. Modalidad póster.
- XXXIV Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, 2011.
Trabajo "Biochemical and Molecular analysis of tomato plants transformed with sorbitol dehydrogenase". Díaz F., Aguayo F., Araya J., Zamudio S., Handford M. Modalidad póster. Póster con distinción (1° autora).

8. REFERENCIAS

- Aguayo MF, Ampuero D, Mandujano P, Parada R, Muñoz R, Gallart M, Altabella T, Cabrera R, Stange C, Handford MG (2013).** SORBITOL DEHYDROGENASE is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, (205-206):63-75
- Archbold D (1999).** Carbohydrate availability modifies sorbitol dehydrogenase activity of apple fruit. *Physiol Plant* 105: 391-395.
- Áy Z, Mihály R, Cserhádi M, Kótai E, Pauk J (2012).** The effect of high concentrations of glufosinate ammonium on the yield components of transgenic spring wheat (*triticum aestivum* L.) constitutively expressing the bar gene. *Scientific world journal* 2012.
- Bińka A, Orczyk W, Nadołska-Orczyk A (2012).** The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*x Triticosecale* Wittmack): role of the binary vector system and selection cassettes. *J Appl Genet*.53(1):1-8
- Bird C R, Smith C J S, Ray J A, Moureau P, Bevan M W, Bird A S, Hughes S, Morris P C, Grierson D y Schuch W (1988).** The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 11: 651-662.
- Burt B (2006).** JADA Continuing Education: The use of sorbitol- and xylitol-sweetened chewing gum in caries control. *J Am Dent Assoc.* 137: 190-196.
- Cambia organization.** Information about pCambia vectors. Sitio web: www.pcambia.org, visitado el 21/05/2013.
- Dang thi Van, Ferro N, Jacobsen H (2010).** Development of a simple and efficient protocol for *Agrobacterium tumefaciens* mediated leaf disc transformation of commercial cultivars. *GM crops* 1-5:312-321.
- Doyle J y Doyle L (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.
- Génard M y Souty M (1996).** Modeling the peach sugar contents in relation to fruit growth. *J. Amer.Soc.Hort.Sci* 121: 1122-1131
- Guo M, Zhang YL, Meng ZJ, Jiang J (2012).** Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of Micro-Tom tomatoes. *Genet Mol Res.* 11(1):661-71
- Gustafson DI (2008).** Sustainable use of glyphosate in North American cropping systems. *Pest Manag Sci.* 64(4):409-16
- Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P. (1994)** The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25:989-994
- Hyeon-Jin Sun, Sayaka Uchii, Shin Watanabe y Hiroshi Ezura (2006).** A highly efficient transformation protocol for micro-tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol.* 47(3): 426-431

- Jackson J (2003).** Biology of Apples and Pears. Cambridge University Press. P. 238.
- Janick J, Cummins J, Brown S and Hemmat M (1996).** Apples In Fruit Breed, Volume I: Tree and Tropical Fruits, edited by Janick J and Moore JN. John Wiley & Sons pp 1-77
- Jeroen SC, Van Roekel, Damm B 1, Melchers L y Hoekema A (1993).** Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicum esculentum*). Plant cell reports **12**: 644-647.
- Kanayama Y, Yamada K, Kato K y Moriguchi R (2008).** Biochemical and molecular aspects of sorbitol metabolism in Rosacea fruit tres and other plants. Phytochemistry Research progress **4**:75-86.
- Karlsson C, Höög JO (1993).** Zinc coordination in mammalian sorbitol dehydrogenase. Replacement of putative zinc ligands by site-directed mutagenesis. Eur J Biochem. **216**(1):103-7
- Levy M, Rachmilevitch S and Abel S (2005).** Transient *Agrobacterium*-Mediated gene expression in the Arabidopsis Hydroponics root system for subcellular localization studies. Plant Molecular Biology reporter **23**: 179-184.
- Lindstad R., Hermansen I y Mckinley-mckee J (1992).** The kinetic mechanism of sheep liver sorbitol dehydrogenase. European Journal of Biochemistry, **210**: 641-647
- Ling H, Kriseleit D y Ganai M (1998).** Effect of ticarcillon/potassium clavunate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Plant cell reports **17**: 843-847.
- Lo Bianco R y Rieger M (1998).** A simple, rapid extraction and assay procedure for NAD+ dependent sorbitol dehydrogenase (SDH) in peach. Journal American Society Horticulture science. **123**(6): 1065-1068.
- Loescher W, Marlow G, Kennedy R (1982).** Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves. Plant Physiology **70**:335-339.
- Maret W y Auld D (1988).** Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase. Biochemistry, **27**(5):1622-1628
- McQueen JC, Minchin P (2005).** Brief look at sorbitol in 1-year-old shoots of apple (*Malus domestica*). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science **33**: 81-87.
- Ministerio de Agricultura (2011):** Gobierno apoya proyectos de mejoramiento genético para crear nuevas variedades vegetales. (<http://www.minagri.gov.cl>)
- Moggia C y Pereira M (2006).** Almidón y maduración en manzanas. Pomácea **6**: 1-3.
- Moggia C y Yury JA (2003).** Apple postharvest practices in chile. WSU—TFREC postharvest information network.
- Mulwa RMS, Mwanza LM.** Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. African Journal of Biotechnology. **5**(5):396-404

- Nadwodnik J, Lohaus G. (2008).** Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* **227**:1079–1089.
- Negm F y Loescher W (1979).** Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant Physiology* **64**: 69-73
- Ng K, Ye R, Wu X, Wong S (1992).** Sorbitol dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *The journal of biological chemistry* **267**: 24984-24994.
- Nosarzewski M, Downie A, Wu B, Archbold D (2012)** The role of sorbitol dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* **39**: 462-470
- Park S , Song K, Kim M, Hwang J, Shin Y, Kim W y Chung W (2002).** Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. *Plant Science*. **162**: 513–519.
- Park SH, Morris JL, Park JE, Hirschi KD, Smith RH (2003).** Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *J Plant Physiol.* (**10**):1253-7.
- Pino L, Lombardi S, Azevedo M, Scotton D, Borgo L, Quecini V, Figueira A, Peres L (2010).** The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. *Plant Methods* **6**:23.
- ODEPA (2009).** Situación de la industria de la fruta fresca en la temporada 2008/2009. Jaime Bravo Mina. Ministerio de Agricultura. Oficina de estudios y Políticas Agrarias, Gobierno de Chile.
- ODEPA (2011).** Mercado de la manzana. Jaime Bravo Mina. Ministerio de Agricultura. Oficina de estudios y Políticas Agrarias, Gobierno de Chile.
- ODEPA (2012).** Agricultura chilena: actualización de las perspectivas de crecimiento y desafíos a la competitividad en 2013. Jorge Campos González. Ministerio de Agricultura. Oficina de estudios y Políticas Agrarias, Gobierno de Chile.
- ODEPA (2013).** Boletín frutícola, Jaime Bravo Mina. Ministerio de Agricultura. Oficina de estudios y Políticas Agrarias, Gobierno de Chile.
- Ohta K, Moriguchi R Kanahama K, Yamak S, Yoshinori Kanayama Y (2005).** Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non- Rosaceae plant. *Phytochemistry*, **66**: 2822–2828
- Orzaez D, Mirabel S, Wieland W y Granell A (2006).** Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol.* **140**(1):3-11.
- Oura Y, Yamada K, Shiratake K and Yamaki S (2000).** Purification and characterization of a NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochem.* **54**: 567-572.
- Pozueta J, Houlné G, Cañas L, Schantz R y Chamarro J (2001).** Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **67**: 173–180.

- Reidel E, Rennie E, Amiard V, Cheng L, Turgeon L (2009).** Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology* **149**(3):1601-8
- Rolland F, Moore B y Sheen J (2002).** Sugar sensing and signaling in plants. *The plant Cell*. **14**:185-205.
- Saker M, Hussein H, Osman N y Soliman M (2008).** *In vitro* production of transgenic tomatoes expressing defensin gene using newly developed regeneration and transformation system. *Arab J. Biotech.* **11**: 59-70.
- Sharma M, Solanke A, Jani D, Singh Y y Sharma A (2009).** A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. *J Bioscience* **34**: 423-433
- Solano R, Nieto C, Avila J, Cañas L, Díaz I y Paz-Ares J (1995)** Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor from *Petunia hybrida*. *EMBO J* **14**: 1773-1784.
- Spolaore S, Trainotti L y Casadoro G (2001).** A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *Journal of Experimental Botany* **52** (357): 845-850.
- Sun H, Uchii S, Watanabe Sy Ezura H (2006).** A highly efficient transformation protocol for micro-tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant cell physiology* **47**: 426-431
- Teo G, Suzuki Y, Uratsu S, Lampinen B, Ormonde N, Hu W, Dejong T, y Dandeka A (2006).** Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality *PNAS* **103**:49
- Thammawong M y Arawaka O (2007).** Starch degradation of detached Apple fruit in relation to ripening and ethylene. *J.Japan.Soc.Hort.Sci* **76**:345-350
- Tuerck J y Fromm M (1994)** Elements of maize A1 promoter required for transactivation by the anthocyanin B/C1 or phlobaphene P regulatory genes. *Plant Cell* **6**:1655-663
- Vila-Aiub M, Vidal R, Balbi M, Gundel P, Trucco F, Ghersa C (2008).** Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. *Pest Manag Sci.* **64**(4):366-71.
- Vinoth S, Gurusaravanan P, Jayabalan N (2013).** Optimization of factors influencing microinjection method for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tomato. *Applied Biochemistry Biotechnology*. Online version.
- Visser T, Schaap A, Vries D.P (1968).** Acidity and sweetness in apple and pear. *Euphytica* **17**:153-167
- Wang X, Xu Y, Peng C, Fan R, Gao X (2008)** Ubiquitous distribution and different subcellular localization of sorbitol dehydrogenase in fruit and leaf of apple, *Journal of Experimental Botany*, **60**: 1025-1034
- Wroblesky T, Tomczak A y Michelmore R (2005).** Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* **3**:259-273.

Yamada K, Oura Y, Mori H y Shohei Y (1998). Cloning of nad-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit and gene expression. *plant cell physiol.* **39**(12): 1375-1379

Yamada K, Mori H, Yamaki S. (1999). Gene expression of NADdependent sorbitol dehydrogenase during fruit development of apple (*Malus pumila* Mill. var. *domestica* Schneid. *Journal of the Japanese, Society for Horticultural Science* **68**:1099-1103.

Yamaguchi H, Kanayama Y, Yamaki S (1994). Purification and properties of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from Apple fruit. *Plant cell physiology* **35**: 887-892

Yang Y, Rugang L y Qi M (2000). In vivo análisis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal* **22**(6): 543-551.