

UCH - FC
Biotecnología
Z26
C.1



ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**“Determinación de la localización subcelular y la expresión de
AtS6PDH, una potencial sorbitol-6-P deshidrogenasa en
Arabidopsis thaliana”**

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

Por

MARÍA SOFÍA ZAMUDIO CAÑAS

Director de Seminario de Título: Michael Handford, PhD
Co – Directora: Dra. Lorena Norambuena

JUNIO 2010
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. María Sofía Zamudio Cañas.

“DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y LA EXPRESIÓN DE AtS6PDH, UNA POSIBLE SORBITOL-6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN *Arabidopsis thaliana*”

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

Dr. Michael Handford
Director Seminario de Título

Michael Handford

Dra. Lorena Norambuena
Co-Directora

Lorena Norambuena

Comisión de Evaluación

Dra. Victoria Guixé
Presidente Comisión

Victoria Guixé

Dra. Claudia Stange
Evaluadora

Claudia Stange



Santiago de Chile, 20 de Diciembre 2010

BIOGRAFÍA



cual siempre me destacué con buenas notas.

Llegué a este mundo un memorable 16 de Mayo, como la menor de tres hermanos, en el ruidoso Santiago de Chile. Desde muy chica, tuve un gran interés por la naturaleza, además de ser muy curiosa y querer saber cómo funcionaba todo y el porqué de las cosas (especialmente cuando me mandaban a hacer las cosas de una manera y no de otra), característica que se fue acentuando con la edad. Así, llegué a la edad escolar, donde constantemente me llamaban la atención por conversar y distraer a mis compañeros, a pesar de lo

Realicé la enseñanza Básica y Media en el Colegio de la Salle, donde conocí a algunas de las personas que marcaron mi vida. En el último año ahí, descubrí lo que más tarde se convirtió en mi carrera: la biotecnología, que llamó mi atención por permitirme comprender cómo funcionan sobre los procesos de la naturaleza y darme la posibilidad de utilizarlos provechosamente.

Posteriormente entré a la Universidad de Chile, donde conocí un grupo único de personas, con las cuales compartí los mejores años de carretes, colapsos, risas, noches de estudio, paseos, viajes, estrés, acampadas, etc. Durante ese tiempo, incursioné en más de un laboratorio, hasta que finalmente encontré BMV, donde me quedé hasta el día de hoy. Ahí realicé este Seminario de Título rodeada de un gran grupo de gente, siempre dispuestos a apoyarse, ayudar y celebrar. Que en los años venideros se mantenga ese espíritu que nos caracteriza.

Un beso para todos.



AGRADECIMIENTOS

Por supuesto, y en primer lugar, a mi familia, por siempre estar conmigo, en las buenas, en las malas y en las peores. A mis hermanos, por siempre tratar de entender mis problemas y a mi papá, por siempre preocuparse por mí. Agradezco especialmente a mi mamá, por escucharme hasta el cansancio y mas allá, compartiendo mis frustraciones, angustias y éxitos.

Agradezco a mis compañeros y amigos biotec (uds. saben bien quienes son), por compartir esta gran aventura conmigo desde el primer día y hacer de la universidad la mejor experiencia, transformando hasta las situaciones más desesperadas en recuerdos inolvidablemente agradables. También a mis amigos de la vida, ésta no sería nada sin ustedes.

Mil gracias también a los compañeros de laboratorio por la buena acogida, los consejos, el interés y la ayuda ante cualquier problema. Gracias por hacer del laboratorio un segundo hogar para todos.

Agradecimientos especiales para el director de este Seminario de Título Dr. Michael Handford, por la inestimable guía, confianza y siempre buena disposición ante cualquier tipo de problema, duda o petición. También a las profesoras integrantes de la Comisión Evaluadora, por su apoyo y excelente disposición.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Papel y metabolismo de poli-alcoholes en plantas.....	1
1.2. Sorbitol-6-fosfato Deshidrogenasas (S6PDH).....	3
1.3. Sorbitol en no-Rosáceas y no-Plantagináceas.....	6
1.4. Investigación propuesta.....	8
1.5. Estrategia desarrollada.....	9
2. HIPÓTESIS.....	10
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo general.....	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. Material Biológico	11
4.1.1 Crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Nicotiana tabacum</i>	11
4.1.2 Crecimiento de bacterias: <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
4.2. Preparación de células competentes.....	11
4.2.1 <i>E. coli</i> DH5 α Quimiocompetentes.....	12
4.2.2 <i>E. coli</i> DH5 α Electrocompetentes	12
4.2.3 <i>A. tumefaciens</i> GV3101 Quimiocompetentes	13
4.3. Bioinformática.....	13
4.3.1 Análisis de secuencias: Alineamientos, dendrograma y localización subcelular.....	13
4.3.2 Diseño y verificación <i>in silico</i> de partidores de PCR	15



4.4. Extracción de DNA genómico desde hojas de <i>A. thaliana</i> .	17
4.5. Comprobación de la calidad y cuantificación de ácidos nucleicos.	17
4.5.1 Cuantificación	17
4.5.2 Integridad y calidad	18
4.6. Reacción de PCR para amplificar <i>AtS6PDH</i> desde DNA genómico de <i>A. thaliana</i> .	19
4.7. Extracción de RNA desde <i>A. thaliana</i> .	19
4.8. Reacción de Transcripción Reversa (RT-PCR).	20
4.8.1 Tratamiento con DNAsas	20
4.8.2 RT-PCR para obtener cDNA de <i>AtS6PDH</i>	20
4.8.3 Reacción de PCR para determinar expresión de <i>AtS6PDH</i>	21
4.8.4 Reacción de PCR para clonar cDNA de <i>AtS6PDH</i>	21
4.9. Clonación de <i>AtS6PDH</i> en el vector bacteriano pCR®8/GW/TOPO®	22
4.9.1 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa	22
4.9.2 Agregado de sobresaliente Adenosina 3' al fragmento purificado	22
4.9.3 Clonación en el vector pCR®8/GW/TOPO®	23
4.9.4 Transformación de <i>E. coli</i> electrocompetentes con el vector pCR8- <i>AtS6PDH</i>	23
4.9.5 Reacción de PCR de colonias.	24
4.10. Minipreparaciones para purificar el vector pCR8- <i>AtS6PDH</i> .	24
4.11. Comprobación molecular y secuenciación de pCR8- <i>AtS6PDH</i> .	25
4.11.1 Reacción de PCR para confirmar la presencia del fragmento <i>AtS6PDH</i> .	25
4.11.2 Digestión enzimática para determinar la orientación de <i>AtS6PDH</i> en pCR8.	25
4.11.3 Secuenciación.	26
4.12. Clonación de <i>AtS6PDH</i> en los vectores binarios pMCD84 y pMDC43	26
4.12.1 Reacción de recombinación entre pCR8- <i>AtS6PDH</i> y pMDC84, pCR8- <i>AtS6PDH</i> y pMDC43.	26
4.12.2 Transformación de células de <i>E. coli</i> quimiocompetentes con los vectores pMDC84- <i>AtS6PDH</i> y pMDC43- <i>AtS6PDH</i> .	27



4.13. Determinación de la presencia y orientación de <i>AtS6PDH</i> en los vectores pMDC84- <i>AtS6PDH</i> y pMDC43- <i>AtS6PDH</i>	27
4.13.1 pMDC84- <i>AtS6PDH</i>	27
4.13.2 pMDC43- <i>AtS6PDH</i>	28
4.14. Transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> con <i>A. tumefaciens</i> portando pMDC84- <i>AtS6PDH</i> y pMDC43- <i>AtS6PDH</i>	28
4.14.1 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con los vectores pMDC84- <i>AtS6PDH</i> y pMDC43- <i>AtS6PDH</i>	28
4.14.2 Agroinfiltración de hojas de tabaco con <i>A. tumefaciens</i> transformadas	28
4.15. Determinación de la localización subcelular de GFP- <i>AtS6PDH</i> y <i>AtS6PDH</i> -GFP	29
4.15.1 Expresión de <i>AtS6PDH</i> en tabaco transformado con los vectores pMDC84- <i>AtS6PDH</i> y pMDC43- <i>AtS6PDH</i>	29
4.15.2 Localización subcelular de <i>AtS6PDH</i> -GFP y GFP- <i>AtS6PDH</i> por microscopía de fluorescencia	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Bioinformática	30
5.1.1 Dendrograma	30
5.1.2 Análisis de las secuencias candidatas	31
5.2. Expresión <i>in silico</i> e <i>in vivo</i> de <i>AtS6PDH</i>	34
5.3. Clonación de <i>AtS6PDH</i> en el vector pCR8	37
5.4. Determinación de la localización subcelular de <i>AtS6PDH</i>	39
5.4.1 Análisis <i>in silico</i>	39
5.4.2 Análisis <i>in vivo</i>	40
5.4.2.1 Clonación de <i>AtS6PDH</i> en pMDC84 y análisis funcional de pMDC84- <i>AtS6PDH</i>	44
5.4.2.2 Clonación de <i>AtS6PDH</i> en pMDC43 y análisis funcional de pMDC43- <i>AtS6PDH</i>	44
6. DISCUSIÓN	48
7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	54



8. CONGRESOS.....	56
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Secuencias utilizadas en este Seminario de Título	14
Tabla II: Partidores utilizados.	16
Tabla III: Localización subcelular predicha de AtS6PDH.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo del sorbitol en hojas y órganos sumidero.	2
Figura 2: Esquema de la estructura del gen <i>AtS6PDH</i>	15
Figura 3: Dendrograma.	32
Figura 4: Motivos de secuencia conservados en Aldo/Ceto Reductasas.	32
Figura 5: Alineamiento múltiple de <i>AtS6PDH</i> y sus ortólogos.	33
Figura 6: Expresión <i>in silico</i> de <i>AtS6PDH</i>	35
Figura 7: Expresión <i>in vivo</i> de <i>AtS6PDH</i>	36
Figura 8: RT-PCR de <i>AtS6PDH</i>	37
Figura 9: Digestión de pCR8- <i>AtS6PDH</i> con BstEII y NcoI.	38
Figura 10: Digestión de pMDC84 y pMDC84- <i>AtS6PDH</i> con HindIII y NcoI.	41
Figura 11: RT-PCR de tabaco transformado con pMDC84- <i>AtS6PDH</i>	42
Figura 12: Fluorescencia de <i>AtS6PDH</i> -GFP.	43
Figura 13: Digestión de pMDC43- <i>AtS6PDH</i> con XbaI.	45
Figura 14: RT-PCR de <i>AtS6PDH</i> y visualización de GFP en tabaco transformado con pMDC43- <i>AtS6PDH</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR: Región 3' no-traducida
5'UTR: Región 5' no-traducida
ABA: Ácido Abscísico.
AGI ID: Código identificador del Arabidopsis Genome Initiative.
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.
CaMV: Cauliflower mosaic virus.
cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementario.
CTAB: Bromuro de cetil-trimetil-amonio.
DEPC: Dietil Pirocarbonato.
dNTP's: deoxi-nucleótidos-trifosfato: dATP, dTTP, dGTP, dCTP.
EDTA: Acido Etilendiaminotetraacético.
GAPA: Gliceraldehido-3-Fosfato Deshidrogenasa.
GFP: Proteína Fluorescente Verde.
kb: Kilobases (1000 pb).
Km: Constante de Michaelis-Menten.
LB: Medio Luria-Bertani.
M6PR: Manosa-6-fosfato Reductasa.
mRNA: RNA mensajero.
MS: Medio Murashige-Skoog.
rRNA: RNA ribosomal.
ORF: Marco de Lectura Abierto.
pb: Pares de bases.
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RT: Reacción de Transcriptasa Reversa.
S6PDH: Sorbitol-6-fosfato Deshidrogenasa.
SDH: Sorbitol Deshidrogenasa.
SGPT: Silenciamiento Génico Post-Transcripcional
Tm: Temperatura media de denaturación o de "melting".
Tris: Tris (hidroximetil) aminometano.
U: Unidad enzimática.
UV: Luz ultra-violeta.

RESUMEN

Los poli-alcoholes son carbohidratos que pueden ser transportados por el floema de las plantas, aportando varias ventajas al metabolismo y constituyendo en algunas familias la principal forma de carbono translocado. El sorbitol es el poli-alcohol de mayor presencia en plantagináceas y rosáceas, siendo sintetizado a partir de glucosa-6-fosfato por la sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa (S6PDH), la enzima clave de esta vía. Esta proteína se ha expresado en plantas que no acumulan sorbitol, obteniéndose organismos con mayor resistencia al estrés abiótico y movilidad de boro mejorada (al acumular sorbitol en bajas concentraciones), pero con senescencia temprana y dificultad para crecer (a altas concentraciones). Enzimas similares a S6PDH se encuentran en numerosas especies no plantagineáceas y no-rosáceas que acumulan sacarosa, cuya expresión se asocia principalmente al estrés osmótico. Una de estas especies es *Arabidopsis thaliana*, donde se encuentran dos marcos de lectura que codifican S6PDH potenciales y propias del organismo. En este seminario de título se realizó el estudio preliminar de una de estas secuencias, llamada *AtS6PDH*. Éste consistió en el análisis *in silico* e *in vivo* de la expresión del gen, de su secuencia y su clonación como proteína de fusión con GFP para determinar su localización subcelular. Un error de apareamiento de partidores permitió crear también un vector que debería ser capaz de gatillar silenciamiento génico de *AtS6PDH* para estudios futuros. Los resultados revelan una Aldo/Ceto Reductasa citosólica con alta identidad a otras *S6PDHs* (>66%) que se expresa en diversos órganos durante gran parte del ciclo de vida de esta planta. Estudios futuros podrían permitir su uso biotecnológico para la producción de sorbitol a bajas concentraciones, otorgando tolerancia al estrés osmótico a plantas incapaces de sintetizar este compuesto.

ABSTRACT

Polyols are carbohydrates that can be transported through the phloem of plants, which have several metabolic advantages and are the main form of carbon translocated in some families. Sorbitol is the main polyol in Plantaginaceae and Rosaceae, and is synthesised from glucose-6-phosphate by sorbitol 6-phosphate dehydrogenase (S6PDH), the key enzyme of this pathway. This protein has been expressed in plants that do not accumulate sorbitol, obtaining organisms with higher stress tolerance and improved boron mobility (at low sorbitol concentrations), but early senescence and diminished growth (at high sorbitol concentrations). S6PDH-like enzymes are found in many sucrose-accumulating non-Rosaceae and non-Plantaginaceae plants, where S6PDH expression is associated with osmotic stress. One of these is *Arabidopsis thaliana*, where two potential S6PDH open reading frames can be found. In this thesis, preliminar research on one of these sequences, named *AtS6PDH*, was performed. The gene sequence and the *in silico* and *in vivo* expression profiles were analysed. *AtS6PDH* was also cloned as a GFP-fusion protein to determine its subcellular localization. Additionally, a primer mismatch allowed the creation of a construct that should be able to trigger post-transcriptional gene silencing of *AtS6PDH* for future studies. The results obtained show that it is a cytosolic Aldo/Keto Reductase with high identity (>66%) to other *S6PDHs* which is expressed in several organs during the lifecycle of the plant. Future studies could develop a biotechnological use of *AtS6PDH* to produce low-concentration sorbitol, giving osmotic stress tolerance to plants unable to synthesise this compound.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Papel y metabolismo de poli-alcoholes en plantas.

Los poli-alcoholes o alcoholes de azúcar (productos reducidos de azúcares lineales) como manitol, galactitol y sorbitol se encuentran ampliamente distribuidos entre angiospermas, siendo el manitol el de mayor distribución (Lewis y Smith, 1967). Son los únicos carbohidratos, además de la sacarosa y rafinosa, que se transportan por el floema de las plantas superiores, constituyendo en algunas familias la principal forma de carbono translocado (manitol en las Apiaceae, Oleaceae, Combretaceae y Plantaginaceae, galactitol en las Celastraceae y sorbitol en las Plantaginaceae y Rosaceae), pudiendo llegar a formar 50-90% del carbono en el floema (Watari y cols, 2004). La utilización de poli-alcoholes como principal producto fotosintético implica varias ventajas: permiten un uso más eficiente del carbono, proveen mayor tolerancia al estrés hídrico o salino, protección ante radicales hidroxilo y facilitan la movilización de boro por el floema (Pommerrenig y cols, 2007). Además son carbohidratos altamente solubles, químicamente estables y que a altas concentraciones no suelen alterar la funcionalidad de otras enzimas en la planta (solutos compatibles) (Ahmad y cols, 1979, Deguchi y cols, 2002), participan en la interacción planta-patógeno y actúan como osmorreguladores endógenos y sumideros de poder reductor (Reidel y cols, 2009).

Debido a estas características, diversos poli-alcoholes han sido ampliamente estudiados en diferentes especies. Uno de los que suscita mayor interés es el sorbitol, el poli-alcohol de mayor presencia en las Plantaginaceae (por ejemplo, llantén y *Plantago maritima*) y Rosaceae (que incluye especies como manzano, durazno, damasco, níspero,

almendro, etc.). Esta molécula se sintetiza como producto primario de la fotosíntesis en las hojas, a partir de glucosa-6-fosfato (G6P, Figura 1). Este compuesto se transforma en sorbitol-6-fosfato (S6P) por la acción de la sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa (S6PDH; también llamada aldosa-6-fosfato reductasa, A6PR) y luego es desfosforilado por la sorbitol-6-fosfato fosfatasa (S6PP). Además, una vía menor de síntesis (activa sólo en hojas jóvenes) usa la NADP-sorbitol deshidrogenasa (NADP-SDH) para reducir directamente glucosa en sorbitol (Yamaki, 1995). Luego, el sorbitol se acumula en células compañeras del floema, al cual se incorpora gracias a transportadores de poli-alcoholes (Watari y cols, 2004). Posteriormente, es descargado por otros transportadores

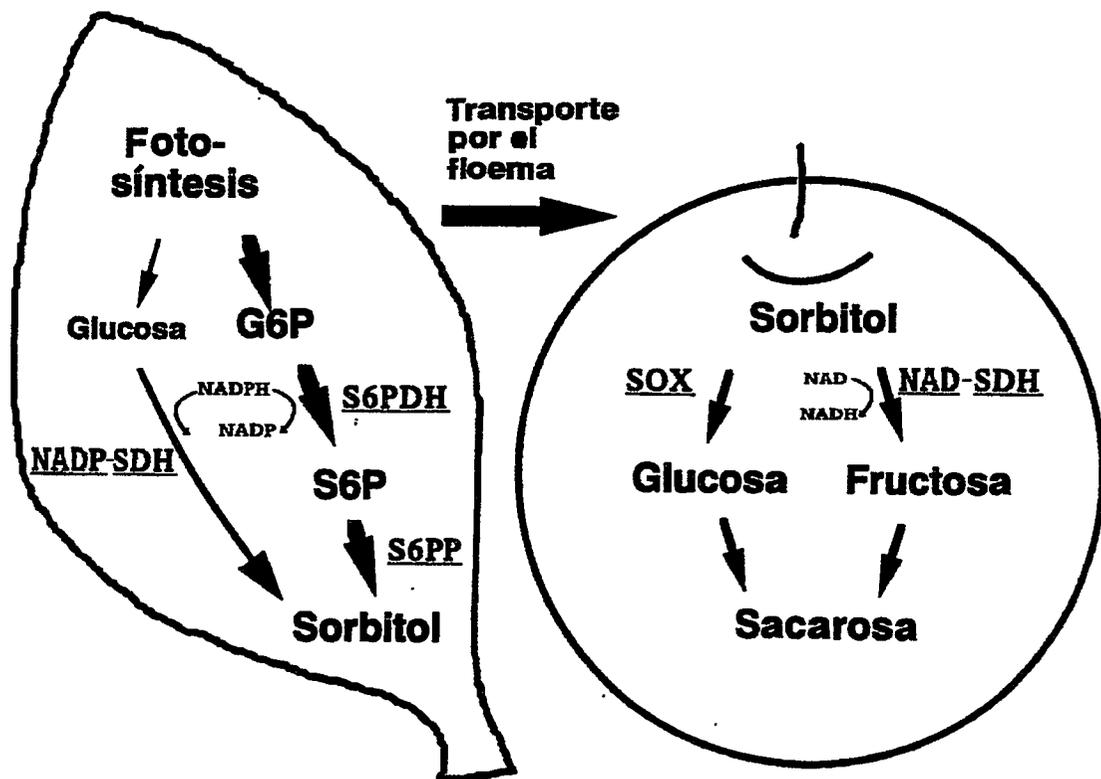


Figura 1: Metabolismo del sorbitol en hojas y órganos sumidero. El sorbitol es sintetizado por S6PDH y S6PP en hojas maduras y también por NADP-SDH en hojas jóvenes. En frutos y otros órganos sumidero, el sorbitol se acumula y puede ser convertido a fructosa y glucosa por las SDH y SOX, respectivamente. S6PDH: sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa. S6PP: sorbitol-6-fosfato fosfatasa. NADP-SDH: NADP-sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa. NAD-SDH: NAD-sorbitol deshidrogenasa. SOX: sorbitol oxidasa. (Modificado de Kanayama y Odanaka, 2000).

a los órganos sumidero (raíces, hojas inmaduras y frutos) donde se acumula en las vacuolas de las células del parénquima, pudiendo ser oxidado a fructosa por la NADSDH o a glucosa por la sorbitol oxidasa (SOX) (Ohkawa y cols., 2008; Teo y cols., 2006; Yamaki, 1995), para su posterior metabolismo, por ejemplo en la glicólisis.

1.2. Sorbitol-6-fosfato Deshidrogenasas (S6PDH).

Las enzimas del metabolismo de sorbitol que presentan mayor actividad son S6PDH (en hojas maduras) y SDH (en frutos), y se les considera los pasos claves en su síntesis y degradación, respectivamente (Kim y cols., 2007; Teo y cols., 2006). La S6PDH (E.C.1.1.1.200) es un homodímero de ~65 kDa (~36 kDa cada subunidad), que cataliza la conversión reversible de G6P a S6P, con una K_m entre 2,22 y 3 mM para S6P y entre 13,9 y 20 mM para G6P (Hirai, 1981; Negm y Loescher, 1981). La reacción se desplaza hacia la producción de sorbitol-6-P, utilizando NADPH como cofactor (Kanayama y Odanaka, 2000; Yamaki, 1995), y siendo inhibida por ATP (Matsumoto, 2008). La mayor actividad de esta enzima para la reducción de G6P se registra a pH ligeramente alcalino, entre 7 y 9; mientras que para la oxidación de S6P sólo se encuentra actividad a pH 9,5-9,8 (Hirai, 1981; Negm y Loescher, 1981). De esta forma, en el citosol de las células (cuyo pH se aproxima al neutral) se favorece la formación de sorbitol.

La síntesis de sorbitol comparte el sustrato (G6P, Figura 1) con la vía de síntesis de sacarosa en el citosol (ya que aún en plantas que transportan principalmente poli-alcoholes, se mantiene la síntesis y utilización de sacarosa), por lo que se ha propuesto

una posible co-regulación entre estas dos vías (Zhou y Cheng, 2008). En numerosos estudios, líneas transgénicas de Rosáceas con sobre-expresión o silenciamiento génico de S6PDH presentan alteraciones en la tasa de partición del carbono entre sorbitol y sacarosa, acumulación de almidón e incluso incremento en los azúcares totales de las hojas, frutos y ápices meristemáticos, sugiriendo que la expresión de S6PDH tiene un papel importante en la distribución del flujo de carbono. Estas alteraciones, que no afectaron el crecimiento vegetativo de la planta, indican que la tasa de partición de carbono entre sacarosa y alcoholes de azúcar se encuentra bajo un estricto control metabólico, variando de acuerdo a la especie y a las condiciones ambientales (Everard y cols., 1997; Kanamaru y cols., 2004; Cheng y cols., 2005; Teo y cols., 2006; Zhou y cols., 2006; Slewinsky y Braun, 2010). Sin embargo, la evidencia indica que la regulación de S6PDH ocurre principalmente a nivel transcripcional, con una correlación positiva y fuerte entre los niveles de transcrito, proteína y actividad detectada en las S6PDH de durazno (Shakanishi y cols., 1998) manzana (Kanamaru y cols., 2004), níspero (Bantog y cols., 2000), y pera (Deguchi y cols., 2002).

La expresión de S6PDH se ve alterada ante condiciones de estrés abiótico. Ante bajas temperaturas, estrés osmótico o presencia de ácido abscísico (ABA), la expresión y actividad de esta enzima se incrementa y se acumula sorbitol (Lo Bianco y cols., 2000; Matsumoto, 2008; Deguchi y cols., 2002; Kanayama y cols., 2007; Veeranagamallaiah y cols., 2009). Se ha propuesto que la acumulación de este metabolito retiene agua en situaciones de estrés hídrico (Sheveleva y cols., 1998), y la alta concentración de sorbitol puede proveer protección a proteínas y membranas celulares bajo estrés salino, frío y sequía (Deguchi y cols., 2002). En *Plantago maritima*, altas concentraciones de

sal inducen la acumulación de sorbitol en el citoplasma y mayor expresión de transportadores de sorbitol en el floema para igualar el potencial osmótico con la vacuola, que acumula NaCl para incrementar la tolerancia a salinidad de esta halófito (Ahmad y cols, 1979, Pomerrenig y cols, 2007).

La actividad osmoprotectora del sorbitol no sólo se observa en Rosáceas o Plantagináceas. En plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y caqui japonés (*Diospyros kaki*; ambas translocan sacarosa) transformadas para expresar S6PDH, se ha observado la presencia de sorbitol – demostrando que esta enzima es suficiente para la síntesis de esta molécula – acompañada de un incremento en la tolerancia al estrés osmótico (Gao y cols, 2001; Matsumoto, 2008). La síntesis de sorbitol también produce un incremento en la resistencia de las plantas a la deficiencia de boro (Brown y cols., 1999, Bellallouie y cols., 1999) debido a que este micronutriente se une a este poli-alcohol, formando complejos que le permiten ser transportado por el floema, aumentando su movilidad (Blevins y Lukaszewski, 1998).

Si bien la expresión de S6PDH y acumulación de sorbitol implican varias ventajas, cuando éste se presenta a altas concentraciones en tabaco (mayores a 15 $\mu\text{mol/g}$ peso fresco) también se puede observar pérdida de clorofila, lesiones necróticas en las hojas, infertilidad, incapacidad para desarrollar raíces y disminución del crecimiento dependientes de la concentración de sorbitol (Sheveleva y cols., 1998). Algunos de estos efectos también se han observado en caña de azúcar (*Saccharum hybrids*; Chong y cols, 2007) y caqui japonés; sin embargo en este último se presentaron fenotipos enanos sin lesiones necróticas a concentraciones entre 20 y 50 $\mu\text{mol/g}$ peso

fresco, lo que plantea la existencia de especies tolerantes a altas concentraciones de sorbitol (Gao y cols, 2001; Deguchi y cols., 2004). Debido a que en estos experimentos las plantas con menor acumulación de sorbitol no presentan una disminución en su crecimiento, se ha sugerido la existencia de una concentración umbral de este alcohol de azúcar a partir de la cual se altera el crecimiento de la planta (Gao y cols., 2001). Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares que relacionan la acumulación de sorbitol a los fenotipos observados.

1.3. Sorbitol en no-Rosáceas y no-Plantagináceas.

Se han encontrado proteínas similares a las enzimas de la vía de síntesis del sorbitol ampliamente distribuidas en plantas no-rosáceas y no-plantagináceas, y que acumulan sacarosa. Por ejemplo, se ha encontrado actividad SDH en semillas de soya, endosperma de maíz y frutos de tomate (Matsumoto, 2008; Ohta y cols., 2005). También se ha encontrado expresión de una aldosa reductasa (ALR), con producción de sorbitol a partir de D-glucosa, en *Setaria italica*, una de las Gramíneas de mayor cultivo en Asia (Veeranagamallaiah y cols., 2009) y existen numerosos EST con similitud a SDHs o S6PDHs en bases de datos de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas divergentes entre sí (Matsumoto, 2008).

El aumento de actividad de estas enzimas en plantas no-Rosáceas o no-Plantagináceas se asocia principalmente a la tolerancia al estrés, participando en las relaciones osmóticas de diversos organismos bajo condiciones adversas (Ahmad y cols, 1979). En el endosperma de maíz, la presencia de SDH también se correlaciona con la

regeneración de NAD^+ y la mantención del estado redox de la célula, que incrementa la expresión de SDH ante concentraciones altas de azúcar y bajas de oxígeno (Morais de Sousa y cols., 2008). En *Arabidopsis thaliana*, una Brassicaceae tolerante al frío y el organismo más utilizado como modelo de estudio en plantas, se ha detectado presencia e incremento de sorbitol en plantas expuestas a estrés por frío (Kaplan y cols., 2004), el cual altera la fluidez de las membranas, interrumpiendo la respiración aeróbica (Christie y cols., 1991). En estas condiciones, también aumentan los niveles de la hormona ABA, que induce expresión de genes de tolerancia al frío, incluyendo el mRNA y la actividad de la alcohol deshidrogenasa (ADH), que cataliza la reducción reversible de aldehídos a alcoholes (Jarillo y cols., 1993).

En común con la gran mayoría de especies vegetales, *A. thaliana* transporta sacarosa y, a menor grado, rafinosa en el floema (Haritatos y cols., 2000). Sin embargo, presenta un marco de lectura abierta (ORF) que codifica una potencial sorbitol deshidrogenasa (AtSDL) con >75% identidad amino acídica con SDHs de especies Rosáceas. Trabajos anteriores en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal han mostrado que AtSDL es citosólica y prefiere sorbitol como sustrato por sobre otros poli-alcoholes [xilitol, eritritol, arabitol, manitol e inositol, (Mandujano, 2010)]. La actividad de esta enzima, sumada a la presencia de sorbitol en *A. thaliana* (Kaplan y cols., 2004) sugiere fuertemente que se requeriría de una enzima para sintetizar sorbitol en este organismo, la que no ha sido descrita. Se propone que esta enzima es una S6PDH, y no una NADP-SDH (sección 1.1), dado que AtSDL es el único ortólogo a las SDHs de otras especies en *A. thaliana*, y se ha mostrado que esta enzima usa NAD^+ , y no NADP, como cofactor (Mandujano, 2010). Considerando los efectos desfavorables observados

en tabaco y caña de azúcar con acumulación de sorbitol a altas concentraciones (sección 1.2), la existencia de S6PDHs provenientes de no rosáceas constituye un interesante tema de estudio, ya que el uso biotecnológico de una S6PDH de *A. thaliana*, potencialmente con una actividad menor que las ya descritas, posibilitaría la acumulación de sorbitol en otras especies mediante su transformación génica para tener los beneficios de bajas concentraciones (movimiento de boro, resistencia a estrés osmótico, etc.) y no las desventajas de altas concentraciones (infertilidad, senescencia temprana etc.) de este metabolito.

1.4 Investigación propuesta

En el genoma de *A. thaliana*, existen dos ORF, At2g21250 y At2g21260, que presentan una alta homología con S6PDH de diversas Rosáceas (entre 65 y 82% de identidad aminoacídica, sección 5.1.2). Estas secuencias constituyen fuertes candidatos a S6PDH propios de este organismo, cuyo estudio se inició con este Seminario de Título. Cabe destacar que no existen trabajos anteriores que estudien estos ORFs. Como primera aproximación, el estudio de la expresión génica de una de estas secuencias puede proporcionar indicios sobre su papel en el metabolismo de la planta. Además, debido a que la acumulación de sorbitol que causa el efecto osmoprotector ocurre en el citosol de la célula (Deguchi y cols., 2004), la localización subcelular del producto génico de una de estas secuencias candidatas también es un importante aspecto a estudiar.

1.5 Estrategia desarrollada.

La estrategia para cumplir los objetivos planteados consiste en el estudio de una de las secuencias candidatas a través de herramientas bioinformáticas, técnicas de biología molecular y transformación genética. Utilizando recursos y algoritmos disponibles en la web, se analizaron ambas secuencias candidatas y, en base a similitud respecto a S6PDH de rosáceas, número de líneas mutantes disponibles y longitud del promotor, se escogió una para luego determinar su expresión y localización subcelular experimentalmente.

Para ello, se aisló la secuencia seleccionada a partir del mRNA de *A. thaliana* y se clonó en un vector binario. Un vector binario permite realizar los pasos de clonación iniciales en *Escherichia coli* para luego transferir el vector a *Agrobacterium tumefaciens*, que se encarga de la transformación génica del tejido vegetal. Este vector además es capaz de fusionar el producto génico de la secuencia de interés al gen reportero GFP (Proteína Fluorescente Verde), bajo el control de un promotor de expresión constitutiva (CaMV35S, virus del mosaico de la coliflor) (Curtis y Grossniklaus, 2003). Debido al pequeño tamaño de *A. thaliana*, y el largo período de tiempo requerido para obtener plantas transgénicas, se realizó una transformación transitoria en *N. tabacum* mediante la agro-infiltración para determinar la localización subcelular de la proteína de fusión vía microscopía de fluorescencia. Además, se determinó la expresión de la secuencia de interés mediante RT-PCR en distintos órganos de la planta.

2. HIPÓTESIS

El ORF At2g21250 de *Arabidopsis thaliana*, una posible S6PDH propia de este organismo, se expresaría *in vivo* y su producto génico se localizaría en el citosol de las células.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Analizar la expresión de *AtS6PDH* en *Arabidopsis thaliana* y determinar la localización subcelular de AtS6PDH-GFP.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1 Analizar la expresión del gen *AtS6PDH* desde datos de microarreglos y verificarlos experimentalmente.
- 3.2.2 Clonar el cDNA de *AtS6PDH* desde hojas de *Arabidopsis thaliana*.
- 3.3.3 Construir un vector para sobreexpresar transitoriamente AtS6PDH-GFP en hojas de *Nicotiana tabacum* y observar la localización subcelular de la proteína.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material Biológico

4.1.1 Crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*

Se sembraron semillas no estériles de *A. thaliana* Col-0 y *N. tabacum* silvestre (wild type o wt) en cultivo hidropónico descrito por Gibeaut (Gibeaut, 1997). Éstas se dejaron crecer durante 6-8 semanas a 23 °C, con 16 hrs de fotoperíodo a 4500-6500 lux.

4.1.2 Crecimiento de bacterias: *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*.

Las bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α , DB3.1 y OneShot se crecieron en medio LB líquido [NaCl 1% (p/v), Triptona 1% (p/v), Extracto de Levadura 0,5% (p/v), pH 7 a 25 °C] o sólido [la mezcla anterior suplementada con agar 1,6% (p/v)] durante 16-18 hrs a 37 °C, con agitación de 220 rpm para el cultivo líquido. El medio LB se suplementó con antibiótico (espectinomicina o kanamicina 100 μ g/mL) para la selección de las colonias transformadas.

Las bacterias *A. tumefaciens* de la cepa GV3101 se crecieron en medio LB líquido y sólido durante 36-48 hrs, a 28 °C, con agitación de 200 rpm para el cultivo líquido. El medio LB fue suplementado con los antibióticos rifampicina (10 μ g/mL), gentamicina (100 μ g/mL) y kanamicina (100 μ g/mL) para la selección cromosómica de la cepa, del plásmido Ti y del vector, respectivamente.

4.2. Preparación de células competentes

Se prepararon células de *E. coli* (cepa DH5 α) y *A. tumefaciens* (cepa GV3101) para hacerlas competentes, es decir, capaces de incorporar DNA exógeno dado un estímulo determinado (shock térmico o un pulso eléctrico).

4.2.1 *E. coli* DH5 α Quimiocompetentes

Se creció hasta saturación un pre-inóculo (100 μ L de células) en 5 mL de medio LB (sección 4.1.2) y 0,9 μ L de ácido nalidíxico 100 μ g/mL a 37 °C durante 16-18 hrs con agitación. Luego se tomó 1 mL de células y se pasó a 100 mL de medio LB con 30 μ L de ácido nalidíxico. Se dejó crecer (3 hrs, 37 °C) con agitación, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,4-0,5. Se centrifugó (1600 g, 4 °C, 10 min) y se resuspendieron las células en 10 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril. Se centrifugó nuevamente (1100 g, 4 °C, 5 min) y se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 0,1 M. Se incubó en hielo por 30 min y nuevamente se centrifugó (1100 g, 4 °C, 5 min). Finalmente, se resuspendieron las células en 2 mL de CaCl₂ 0,1 M y se agregó 600 μ L de glicerol estéril. Para finalizar, se separaron las células en alícuotas de 200 μ L y se almacenaron a -80 °C.

4.2.2 *E. coli* DH5 α Electrocompetentes

Se creció hasta saturación un pre-inóculo de células (5 mL) en medio LB (16-18 hrs, 37 °C), con agitación (sección 4.1.2). Se tomó 1 mL, se agregaron 49 mL de medio fresco y se creció (2 hrs, 37 °C) con agitación (sección 4.1.2) hasta una D.O.₆₀₀ de 0,5 – 0,8. Se centrifugó (8500 g, 4 °C, 10 min) y se descartó el sobrenadante. En hielo, se resuspendieron las células en 1 volumen de agua estéril fría y se centrifugó (8500 g, 4 °C, 10 min). Se resuspendieron las células en medio volumen de agua estéril fría y se centrifugó (8500 g, 4 °C, 10 min). Se resuspendieron las células en 10 mL de glicerol 10% estéril y frío, se centrifugó (8500 g, 4 °C, 10 min) y se agregaron 500 μ L de glicerol 10% estéril y frío. Se separaron las células en alícuotas (40 μ L) y se almacenaron a -80 °C.

4.2.3 *A. tumefaciens* GV3101 Quimiocompetentes

Se creció hasta saturación un pre-inóculo de células (500 μ L) en 25 mL de LB (sección 4.1.2) con rifampicina 10 μ g/mL y gentamicina 25 μ g/mL. Se dejó a 28 °C con agitación durante 16-18 hrs. Posteriormente, se llevó el cultivo a 100 mL de LB (con los mismos antibióticos) y se incubó a 28 °C, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,5. Se incubó en hielo (10 min) y se centrifugó (3000 g, 4 °C, 20 min). Se resuspendieron las células en 1 mL CaCl₂ estéril 20 mM y se separaron en alícuotas de 200 μ L, que fueron congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80 °C.

4.3. **Bioinformática.**

4.3.1 Análisis de secuencias: Alineamientos, dendrograma y localización subcelular.

Las secuencias proteicas utilizadas en estos análisis se obtuvieron desde la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). En la Tabla I se detalla el número de acceso de las secuencias utilizadas en el desarrollo de este trabajo, el organismo a la cual pertenecen y el producto génico de dichas secuencias, incluyendo ambas secuencias candidatas (NP_179721.1 y NP_179722.1).

Para identificar sitios conservados en estas secuencias, se utilizaron las herramientas ScanProsite del Swiss Institute of Bioinformatics (<http://expasy.org/prosite>) e InterProScan del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>).

Tabla I: Secuencias utilizadas en este Seminario de Título. Se indica el organismo del cual proviene la secuencia, el código de acceso y la descripción de su producto génico.

Género y especie	Descripción del producto génico según NCBI	Nº de acceso
<i>Amelanchier alnifolia</i>	S6PDH dependiente de NADP	AAL86682.1
<i>Apium graveolans</i>	M6PR dependiente de NADPH	AAB97617.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	posible M6PR dependiente de NADPH	NP_179721.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	posible M6PR dependiente de NADPH	NP_179722.1
<i>Holodiscus microphyllus</i>	S6PDH dependiente de NADP	AAL86685.1
<i>Kageneckia oblonga</i>	S6PDH dependiente de NADP	AAL86678.1
<i>Malus domestica</i>	S6PDH dependiente de NADP	BAA01853.1
<i>Phelipanche ramosa</i>	M6PR dependiente de NADPH	AAG15839.2
<i>Prunus dulcis</i>	S6PDH dependiente de NADP	AAL86653.1
<i>Prunus persica</i>	S6PDH dependiente de NADP	ABQ45405.2
<i>Triticum aestivum</i>	M6PR dependiente de NADPH	AAP80625.1
<i>Zea mays</i>	S6PDH dependiente de NADP	NP_001152936.1

Los alineamientos múltiples de secuencias se ejecutaron con ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), mientras que el dendrograma se obtuvo con MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Este programa realizó 1000 repeticiones del análisis, utilizando un algoritmo basado en matrices de distancia (UPGMA) y un modelo de estimación de distancia p-distance. La localización subcelular predicha de *AtS6PDH* se obtuvo desde The Subcellular Arabidopsis Database (SUBAII, <http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/>), mientras que para analizar su expresión, se utilizó el recurso Arabidopsis eFP Browser del servidor del Botany Array Resource (BAR, <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Éste, a su vez, utiliza datos de microarreglos (Affymetrix ATH1 array) obtenidos por Schmid y cols (2005) y del AtGenExpress Consortium Data (<http://igrt0.psc.riken.jp/AtGenExpressJPN/>).

4.3.2 Diseño y verificación *in silico* de partidores de PCR

Para clonar *AtS6PDH*, se diseñaron partidores (Tabla II) utilizando la secuencia nucleotídica de At2g21250 disponible en The Arabidopsis Information Resource (TAIR, www.arabidopsis.org). Según TAIR, la secuencia genómica de *AtS6PDH* contiene 1981 nucleótidos, incluyendo 6 exones, 5 intrones y las regiones no traducidas 5' y 3' (Figura 2). Debido a la gran identidad de *AtS6PDH* con el loci adyacente At2g21260 (93% de identidad en la región codificante), se incorporaron en los partidores secuencias de las regiones 5'UTR y 3'UTR, que presentan mayor variabilidad.

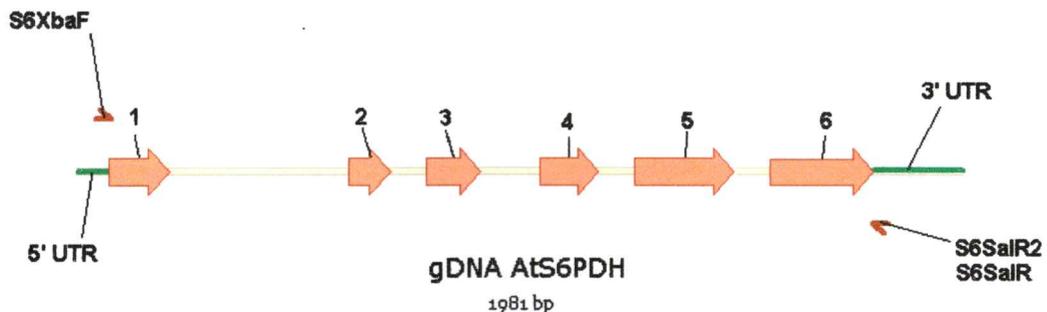


Figura 2: Esquema de la estructura del gen *AtS6PDH*. Se indican los exones 1-6 con flechas naranjas y se destacan las regiones no traducidas 5' y 3' (5'UTR y 3'UTR). Además, se indica la localización de los partidores S6XbaF, S6SalR y S6SalR2 (flechas rojas).

El partidor S6XbaF consta de 36 nucleótidos que hibridan con la porción 3' de la región 5'UTR y los dos primeros codones de *AtS6PDH*. Además posee un sitio de restricción XbaI entre los nucleótidos 8-13.

Los partidores S6SalR y S6SalR2 por su parte, se componen de 36 nucleótidos que hibridan con el último codón de la región codificante y el inicio de la región 3'UTR. Ambos poseen un sitio de restricción para SalI entre los nucleótidos 8-13 y 7 nucleótidos arbitrarios en el extremo 5'. En el partidor S6SalR, sólo 3 de estos nucleótidos hibridan con la secuencia de *AtS6PDH*, por lo que se rediseñó para mejorar su especificidad de

forma que en el partidor S6SalR2 los 7 nucleótidos iniciales hidridan con la secuencia de *AtS6PDH*.

Se evaluaron el Tm de todos los partidores y la probabilidad de que formen dímeros y horquillas con la aplicación OligoAnalyzer disponible en el servidor del IDT (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>). La especificidad de los partidores se evaluó *in silico* por BLAST de contra el genoma de *A. thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>).

Tabla II: Partidores utilizados.

Nombre	Secuencia	Descripción
GAPAF	5'-GGTAGGATCGGGAGGAAC-3'	Hibrida con una región interna 5' del gen y/o cDNA de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Junto con GAPAR, amplifica un producto de 300 pb
GAPAR	5'-GATAACCTTCTTGGCACCAG-3'	Hibrida con una región interna 3' del gen y/o cDNA de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Junto con GAPAF, amplifica un producto de 300 pb
18S 5'	5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3'	Hibrida con la región 5' del gen y/o cDNA del rRNA 18S. Junto con 18S 3', amplifica un producto de 200 pb.
18S 3'	5'-ACAATGATCCTTCCGAGGT-3'	Hibrida con la región 3' del gen y/o cDNA del rRNA 18S. Junto con 18S 5', amplifica un producto de 200 pb.
oligoAp	5'-CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Hibrida con la señal poli-A en la región 3' de los mRNA.
S6SalR	5'-CATGACCGT CGACT TTAGATAGAGAGAGTGTGA AAGC -3'	Contiene sitio de corte para Sall (rojo) y el último codón codificante (azul). Junto con S6XbaF, amplifica un producto de 1 kb
S6SalR2	5'-CTTCATT GTCGACT TGTAGATAGAGAGAGTGTGA AAGC -3'	Contiene sitio de corte para Sall (rojo) y el último codón codificante (azul). Junto con S6XbaF, amplifica un producto de 1 kb
S6XbaF	5'-CAGGACGT TAGAG GAGAAGCAGAGAAAGAA ATGGAG -3'	Contiene sitio de corte para XbaI (rojo) y el codón de inicio de la traducción (azul). Junto con S6SalR o S6SalR2, amplifica un producto de 1 kb

4.4. Extracción de DNA genómico desde hojas de *A. thaliana*.

Se probó la eficacia de los partidores amplificando *AtS6PDH* desde DNA genómico de *A. thaliana*. Para extraer el DNA, se utilizó una variante del método CTAB (Doyle y Doyle, 1987). Se congelaron 100 mg de hojas en N₂ líquido, se molieron con un pistilo plástico y se agregaron 700 µL de Buffer CTAB 2X [CTAB 2% p/v; NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM; β-mercaptoetanol 0,1% v/v (agregado antes de usar)]. Se incubó a 65 °C durante 1 hr, mezclando por inversión cada 5 min. Se eliminaron los restos de hoja mediante centrifugación (20.000 g, 5 min) y se rescató el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga. Luego se agregaron 700 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por 5 min. La mezcla fue centrifugada (6900 g, 5 min) y se rescató 500 µL de la fase superior a un nuevo tubo. Se repitió la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico y la separación de fases por centrifugación, y se rescató 300 µL de la fase superior. Posteriormente, se agregaron 250 µL de isopropanol, se incubó (-20 °C, 20 min) y se centrifugó a 20.000 g por 15 min. Se lavó el sedimentado de DNA con 500 µL de etanol 70%, se centrifugó brevemente (~ 1 min) y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se secaron las muestras al aire y se resuspendió el DNA en agua nanopura.

4.5. Comprobación de la calidad y cuantificación de ácidos nucleicos.

4.5.1 Cuantificación

Para cuantificar las muestras de DNA y RNA extraído, se utilizó un espectrofotómetro (NanoDrop®ND-1000 UV-Vis) y se midió la A₂₆₀. Además, se

determinó la pureza de las muestras a través de las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Para que una muestra se considere pura, el radio A_{260}/A_{280} debe ser cercano a 1,8 (si la muestra es de DNA) o a 2 (si la muestra es de RNA). Valores más bajos que éstos indican contaminación por proteínas o fenoles. El radio A_{260}/A_{230} debe encontrarse entre 1,8 y 2,2 para una muestra pura, ya que valores más bajos se deben a la presencia de solventes orgánicos, algunas sales y proteínas.

4.5.2 Integridad y calidad

Se determinó la integridad del DNA y RNA por electroforesis en geles de agarosa 1% p/v. El gel fue preparado en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8) y bromuro de etidio 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se mezclaron 5 μL de cada muestra con 1 μL de buffer de carga (6X DNA Loading Dye de Fermentas®) y se colocó el gel en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X a una diferencia de potencial de 100 V durante 30 min para muestras de DNA. Para las muestras de RNA se cargaron 3 μL de muestra y se utilizó una diferencia de potencial de 65 V durante 15 min. Se visualizaron las bandas en una cámara oscura equipada con un transiluminador UV y se usó GeneGenius Classic (SynGene®) para captar y analizar las imágenes.

Además, se comprobó la calidad del DNA por PCR, mediante la amplificación de los genes *GAPA* (*gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa*) y *18S*. La mezcla de la reacción consistió en 1X NH_4 Reaction Buffer de Bioline, MgCl_2 3 mM, dNTPs 0,2 mM, partidores GAPA F y GAPA R 0,5 μM cada uno (Tabla II), 1 U de Biolase™ DNA Polymerase de Bioline y 1 μL del DNA de *A. thaliana* (sección 4:4) como molde en un volumen final de 20 μL . El programa de PCR del termociclador consistió de 5 min de

denaturación inicial a 95 °C, seguidos por 30 ciclos con 30 seg de denaturación a 95 °C, 40 seg de apareamiento de partidores con el blanco a 52 °C y 40 seg de extensión de la polimerización a 72 °C. Se finalizó con una extensión final de 10 min a 72 °C y luego se mantuvieron las muestras a 10 °C.

4.6. Reacción de PCR para amplificar *AtS6PDH* desde DNA genómico de *A. thaliana*.

Se probaron los partidores diseñados (sección 4.3.2) amplificando por PCR el gen *AtS6PDH* desde DNA genómico de *A. thaliana*. La mezcla de la reacción consistió en Buffer Paq 1X de Stratagene (que contiene MgCl₂ 2 mM), dNTPs 0,2 mM, partidores S6XbaF y S6SalR2 0,5 µM cada uno (Tabla II), 1 U de Paq5000™ DNA Polimerasa de Stratagene y 1 µL del DNA de *A. thaliana* (sección 4.4) como molde en un volumen final de 20 µL. El programa de PCR consistía de: 2 min en “Hot-Start” a 95 °C, luego se detuvo la reacción y se agregó la enzima. Se retomó el programa con una denaturación inicial (3 min, 95 °C), y 40 ciclos de denaturación (95 °C por 1 min), apareamiento de partidores con el blanco (55 °C, 1 min) y extensión (72°C por 2 min). Se finalizó con una extensión final de 10 min a 72 °C y luego se mantuvieron las muestras a 10 °C.

4.7. Extracción de RNA desde *A. thaliana*.

Para amplificar el cDNA de *AtS6PDH*, se extrajo RNA desde tallo, hojas rosetas, hojas caulinares y flores de plantas de 6-8 semanas de edad por extracción fenólica con RNA-Solv® Reagent de Omega Bio-Tek siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La integridad y calidad del RNA extraído se verificó por electroforesis en

geles de agarosa 1% (sección 4.5.2), donde se comprobó la presencia de dos bandas correspondientes al rRNA 28S y 16S. La cuantificación y pureza de las muestras se determinó utilizando el NanoDrop®ND-1000 UV-Vis (sección 4.5.1).

4.8. Reacción de Transcripción Reversa (RT-PCR).

4.8.1 Tratamiento con DNAsas

Se eliminaron posibles restos de DNA en las muestras de RNA por tratamiento con DNasa. Se preparó una mezcla que consistió en 1 µg de RNA total, 1 U de DNasaI Fermentas, Buffer DNasaI 1X Fermentas y 10 U de RiboLock™ RNase Inhibitor de Fermentas en un volumen de 10 µL. Se incubó la mezcla (37 °C, 30 min), luego se dejó en hielo y se agregó 1 µL de EDTA 25 mM para detener la reacción.

4.8.2 RT-PCR para obtener cDNA de *AtS6PDH*

Se desarrollaron las reacciones de RT-PCR utilizando el sistema RT-Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega). En un volumen de 20 µL, se mezcló 0,5 µg del RNA tratado con DNasaI, 1X Improm-II™ Reaction Buffer, 1 µL de Improm-II™ RT, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,2 mM y 0,5 µM de partidor oligoAp (para determinar la expresión *in vivo* de *AtS6PDH*) o S6SalR2 (para clonarlo). La mezcla final está separada en dos volúmenes, el primero contiene el RNA y el partidor mientras que el segundo contiene el resto de la mezcla. A los restantes 0,5 µg del RNA se les agrega la misma mezcla pero sin enzima, como controles de presencia de DNA en las muestras.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, que ejecutó el siguiente programa: 70 °C por 5 min para desenrollar las hebras de RNA (durante los cuales se

incubó la mezcla de RNA y partidor). Luego se dejaron las muestras en hielo y se añadió el resto de la mezcla de la reacción. Se continuó el programa (25 °C, 5 min), que permitió el apareamiento del partidor con el RNA, seguidos por una extensión del cDNA (42 °C, 60 min) y la inactivación de la enzima (70 °C por 15 min).

4.8.3 Reacción de PCR para determinar expresión de *AtS6PDH*

Se utilizó el producto de la sección anterior (4.8.2) como DNA molde para esta reacción, siendo el tamaño del fragmento esperado de 993 pb (~1 kb). Para determinar la expresión *in vivo* de *AtS6PDH*, la mezcla de la reacción se compuso de 1X NH₄ Reaction Buffer de Boline, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,2 mM, partidores S6XbaF y S6SalR2 (0,5 µM cada uno; Tabla II), 1 µL del cDNA molde y 1 U de Biolase™ DNA Polymerase de Boline en un volumen de 20 µL. La amplificación se efectuó en un termociclador bajo el siguiente programa: 2 min de denaturación inicial a 94 °C, luego 40 ciclos de denaturación (94 °C, 45”), apareamiento de partidores con el DNA molde (55 °C, 1 min) y extensión de la polimerización (72 °C por 1’ 15”). Se finalizó con una extensión (10 min, 72 °C) y luego se mantuvieron los productos de la reacción a 10 °C.

4.8.4 Reacción de PCR para clonar cDNA de *AtS6PDH*

Para clonar *AtS6PDH* sin errores de amplificación, se utilizó la enzima de alta fidelidad Pfu DNA Polimerasa de Fermentas. Para esta reacción, la mezcla consistió en Buffer Pfu 1X + MgSO₄ 2 mM, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de partidor S6XbaF y S6SalR, 1 µL de cDNA molde y 0,5 U de Pfu DNA Polimerasa. La reacción se efectuó en un termociclador bajo el siguiente programa: 2 min en “Hot-Start” a 94 °C, luego 2 min de denaturación inicial en presencia de la enzima a 94 °C, seguidos por 40 ciclos de

denaturación (94 °C, 45”), apareamiento de partidores con el cDNA molde (55 °C, 1,5 min) y extensión de la polimerización (72 °C, 3’). Se finalizó con una extensión (10 min, 72 °C) y luego se mantuvieron los productos de la reacción a 10 °C.

4.9. Clonación de *AtS6PDH* en el vector bacteriano pCR®8/GW/TOPO®

4.9.1 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa

Se cargaron 20 µL del producto de PCR (amplificado con Pfu DNA Polimerasa) de la sección 4.8.4 en un gel de agarosa 1% y se resolvió la banda de interés (~1000 pb) por electroforesis (sección 4.5.2). Se purificó el cDNA de esta banda mediante el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.9.2 Agregado de sobresaliente Adenosina 3’ al fragmento purificado

La Taq DNA Polimerasa presenta actividad transferasa-terminal independiente del molde, que agrega un sobresaliente A a los extremos 3’ del producto de PCR. Para la clonación en el vector de entrada, se utilizó el sistema TOPO TA Cloning® System de Invitrogen, que aprovecha esta característica para la clonación rápida y eficiente de productos de PCR. Debido a que la Pfu DNA Polimerasa no presenta actividad transferasa terminal, los sobresalientes A se agregaron al fragmento, luego de su purificación (4.9.1). La mezcla contenía, en un volumen de 10 µL: 60 ng de cDNA purificado, 1X NH₄ Reaction Buffer, MgCl₂ 3 mM, dATP 0,2 mM y 0,5 U de Biolase™ DNA Polymerase de Bionline. Se incubó (72 °C, 30 min) y luego se almacenó a -20 °C.

4.9.3 Clonación en el vector pCR®8/GW/TOPO®

Como vector de entrada se utilizó pCR®8/GW/TOPO®, un vector perteneciente al sistema TOPO TA Cloning® System de Invitrogen. Este sistema utiliza una Topoisomerasa I (unida covalentemente al vector) para formar el enlace fosfodiéster entre el sobresaliente T 3' presente en el vector (que hibrida con el sobresaliente A 3' del inserto) y el extremo 5' del fragmento a insertar. De esta manera, se asegura una alta eficiencia en la clonación del producto de PCR. La reacción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el producto de PCR tratado en la sección 4.9.2. Se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente y posteriormente se utilizó para transformar *E. coli* electrocompetentes

4.9.4 Transformación de *E. coli* electrocompetentes con el vector pCR8-AtS6PDH

Se eliminaron las sales de la mezcla utilizada en la sección 4.8.3 por diálisis. Se utilizó un filtro MF™-Millipore Membrane Filters de 0,025 µm sobre el cual se depositó la mezcla y se dejó dializar bajo campana por 20 min. Se agregó la mezcla dializada a células electrocompetentes de *E. coli* (cepa DH5α), que luego se pasaron a una cubeta de electroporación. Las células fueron tratadas con un electroporador Gene Pulser Xcell™ de Bio-Rad, en una cubeta de 2 mm a una diferencia de potencial de 2500 V. Luego, se agregó 1 mL de medio LB líquido a la cubeta, se traspasó todo el contenido a un tubo de microcentrífuga y se dejó crecer (37 °C, 1 hr) con agitación. Luego, se centrifugaron las células (6500 g, 5 min) y después de eliminar el sobrenadante, se sembraron las células en LB sólido suplementado con espectinomicina 100 µg/mL para

la selección de colonias transformadas con el vector. La composición del medio y condiciones de cultivo se detallan en la sección 4.1.2.

4.9.5 Reacción de PCR de colonias.

Se realizó un PCR para amplificar el fragmento *AtS6PDH* desde las colonias resistentes a espectinomicina. La mezcla de PCR utilizada consistió en Buffer Paq 1X de Stratagene (que contiene $MgCl_2$ 2 mM), dNTPs 0,2 mM, partidores S6XbaF y S6SalR 0,5 μ M cada uno (Tabla II), 1 U de Paq5000™ DNA Polimerasa de Stratagene y 1 μ L de una suspensión celular de colonias aisladas. El programa aplicado por termociclador consistía de 4 min de denaturación inicial a 94 °C, seguidos por 33 ciclos de denaturación (94 °C, 45”), apareamiento de partidores con el vector (55 °C, 1 min) y extensión de la replicación (72 °C, 1’ 15”). Se finalizó con una extensión (10 min, 72 °C) y luego se mantuvieron los productos de la reacción a 10 °C.

4.10. Minipreparaciones para purificar el vector pCR8-AtS6PDH.

Se crecieron las colonias portadoras de pCR8-AtS6PDH (sección 4.9.5) en 5 mL de medio LB líquido según lo descrito en la sección 4.1.2. Para extraer el vector, se utilizó un derivado del kit casero para miniprep de Kotchoni et al., 2003, que utiliza lisis celular alcalina de células para luego purificar el DNA por extracción fenólica y posterior precipitación en una solución alcohólica fría.

En este sistema, se centrifugó el cultivo (12.000 g, 15 min, 25 °C) y se resuspendieron las células con agitación vigorosa, en una solución de resuspensión fría (100 μ L de Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8, 4 °C). Se trasasó la

mezcla a un tubo de microcentrífuga y se agregaron 200 μL de solución de lisis (NaOH 0,2 N y SDS 1% v/v). Se mezcló por inversión y se dejaron los tubos en hielo (1-2 min). Luego, se agregó Acetato de Potasio 5 M frío (150 μL), se mezcló por inversión, se incubó en hielo (5 min) y se centrifugó (12.000 g, 5 min, 4°C). Se rescataron 400 μL de sobrenadante y se extrajeron los ácidos nucleicos con 200 μL de fenol:cloroformo (1:1). Se agitó vigorosamente y se centrifugó (12.000 g, 5 min, 4 °C) para luego rescatar la fase superior acuosa. Se precipitó el DNA agregando 800 μL de isopropanol enfriado a -20 °C, se mezcló por inversión y se incubó a -80 °C por 5 min. Se centrifugó (12.000 g, 5 min, 4 °C), se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 800 μL de etanol 70% (v/v). Se centrifugó nuevamente (12.000 g, 3 min, 4 °C), se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el DNA al aire. Una vez seco, se resuspendió el DNA plasmidial en 25 μL de agua nanopura, se agregó 2 μL de RNasa A (10 mg/mL) y se incubó por 20 min a 37 °C. Finalmente, se determinó la concentración y pureza de la muestra por electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría (sección 4.5).

4.11. Comprobación molecular y secuenciación de pCR8-AtS6PDH.

4.11.1 Reacción de PCR para confirmar la presencia del fragmento AtS6PDH.

Se amplificó *AtS6PDH* utilizando como molde el DNA plasmidial purificado en la sección 4.10. La mezcla y el programa de PCR se describen en la sección 4.9.5.

4.11.2 Digestión enzimática para determinar la orientación de AtS6PDH en pCR8

Se realizó una digestión simple y doble de DNA plasmidial con las enzimas NcoI y BstEII de Fermentas. La mezcla de la digestión consistió en Buffer Tango™ 2X, 0,5 μg de DNA y 5 U de la(s) enzima(s) en un volumen final de 20 μL (37°C, 2 hrs).

4.11.3 Secuenciación.

Se utilizaron los partidores universales M13 forward y reverse para secuenciar *AtS6PDH* en el vector pCR8-*AtS6PDH* (Macrogen, USA) y se compararon los resultados con la secuencia de bases de datos (TAIR, At2g21250) para determinar la presencia de posibles mutaciones ocurridas durante el proceso de la clonación.

4.12. Clonación de *AtS6PDH* en los vectores binarios pMCD84 y pMDC43

4.12.1 Reacción de recombinación entre pCR8-*AtS6PDH* y pMDC84, pCR8-*AtS6PDH* y pMDC43.

Los vectores binarios pMDC (que confieren resistencia a kanamicina en bacterias y a higromicina en plantas) son vectores de destinación compatible con la tecnología Gateway® (Curtis y Grossniklaus, 2003). Ésta permite transferir con alta eficiencia un fragmento de DNA flanqueado por sitios de recombinación (sitios *attL* o *attachment*) desde un vector de entrada como pCR8 hasta vectores que contengan sitios de recombinación compatibles (*attR*) a través de una reacción mediada por el LR Clonase™ Enzyme Mix de Invitrogen (Karimi et al., 2002). En este caso, se utilizó la tecnología Gateway para transferir *AtS6PDH* (colonia 3, sin codón de stop; ver sección 5.3) desde el vector pCR8 al vector pMDC84 (que fusiona el fragmento de interés a GFP C-terminal) y *AtS6PDH* (colonia B, con codón de stop; ver sección 5.3) desde pCR8 a pMDC43 (que fusiona el fragmento de interés a GFP N-terminal), utilizando LR Clonase™ Enzyme Mix de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.12.2 Transformación de células de *E. coli* quimiocompetentes con los vectores pMDC84-AtS6PDH y pMDC43-AtS6PDH.

Se utilizaron 4 μL de la mezcla de las recombinaciones (4.12.1) para transformar *E. coli* quimiocompetentes (cepas DH5 α y OneShot[®]Mach1[™]-T1[®] para los vectores pMDC84-AtS6PDH y pMDC43-AtS6PDH, respectivamente) por shock térmico, según las indicaciones del vendedor (cepa OneShot). El mismo protocolo se utilizó para la cepa DH5 α , preparada en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal (sección 4.2.1).

Se sembraron las células transformadas en medio LB sólido con kanamicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y gentamicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (sección 4.1.2). Se confirmó la presencia de *AtS6PDH* en todas las colonias obtenidas por PCR de colonia (sección 4.9.5) y se purificó el vector siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.10.

4.13. **Determinación de la presencia y orientación de *AtS6PDH* en los vectores pMDC84-AtS6PDH y pMDC43-AtS6PDH.**

4.13.1 pMDC84-AtS6PDH.

Se determinó la presencia de *AtS6PDH* por digestión enzimática con HindIII de Fermentas. La mezcla de reacción contenía Buffer Red 1X de Fermentas, 250 ng de DNA y 5 U de enzima en un volumen final de 20 μL (37 °C, 1,5 hrs).

Se determinó la orientación de *AtS6PDH* por digestión enzimática con NcoI de Fermentas. La mezcla de esta reacción consistió en Buffer Tango[™] 1X, 250 ng de DNA y 5 U de enzima en un volumen final de 20 μL (37 °C, 1,5 hrs).

4.13.2 pMDC43-AtS6PDH.

Se determinaron la presencia y orientación de *AtS6PDH* por digestión enzimática con XbaI de Fermentas. La mezcla consistió en 250 ng de DNA plasmidial, buffer Tango™ 1X y 5 U de enzima en un volumen total de 20 µL (37 °C, 3 hrs).

4.14. Transformación transitoria de *N. tabacum* con *A. tumefaciens* portando pMDC84-AtS6PDH y pMDC43-AtS6PDH

4.14.1 Transformación de *A. tumefaciens* con los vectores pMDC84-AtS6PDH y pMDC43-AtS6PDH

Se agregaron 450 ng de pMDC84-AtS6PDH y pMDC43-AtS6PDH a alícuotas de *A. tumefaciens* quimiocompetentes y se incubaron en hielo (5 min). Se traspasaron los tubos con células a N₂ líquido (5 min) y se devolvieron al hielo. Se agregó 1 mL de LB líquido, se incubó (28 °C, 16-18 hrs) y luego, se centrifugaron las células y se sembraron en medio LB sólido suplementado con antibióticos (sección 4.1.2). Se verificó la presencia de *AtS6PDH* en las transformantes por PCR de colonia (sección 4.9.5).

4.14.2 Agroinfiltración de hojas de tabaco con *A. tumefaciens* transformadas

Se crecieron células sin transformar (como control negativo) y las colonias transformadas con pMDC84-AtS6PDH, pMDC43-AtS6PDH y pCAMBIA1302 (como control de expresión de GFP soluble) en medio LB líquido (sección 4.1.2), se centrifugaron y se eliminó el medio sobrenadante. Se resuspendieron las células en medio de infiltración [MS (Murashige & Skoog Basal Salt Mixture) 4,43 g/L, mio-inositol 0,56 mM y Acetosiringona 0,6 mM] hasta alcanzar una DO₆₀₀ 0,6. Con una

jeringa de 5 mL sin aguja, se infiltró la parte inferior de hojas de tabaco de 10 semanas de edad, que fueron mantenidas en condiciones ambientales controladas (sección 4.1.1).

4.15. Determinación de la localización subcelular de GFP-AtS6PDH y AtS6PDH-GFP.

4.15.1 Expresión de *AtS6PDH* en tabaco transformado con los vectores pMDC84-*AtS6PDH* y pMDC43-*AtS6PDH*.

Cuatro días después de la agroinfiltración, se extrajo RNA total desde las hojas transformadas con cada vector, siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.7. Posteriormente, éste se trató con DNaseI (sección 4.8.1) y se realizó la reacción de RT-PCR descrita en las secciones 4.5.2, 4.8.2 y 4.8.3. El producto de PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) (sección 4.5.2).

4.15.2 Localización subcelular de GFP-*AtS6PDH* y *AtS6PDH*-GFP por microscopía de fluorescencia.

Cuatro días después de la transformación descrita en la sección 4.14.2 con los vectores pMDC84-*AtS6PDH* y pMDC43-*AtS6PDH*, se prepararon muestras de "peeling" del epidermis inferior de las hojas agro-infiltradas. Éstas fueron observados bajo un microscopio de epifluorescencia Axiovert 200M de Zeiss, con un aumento de 400 veces (objetivo 40X) y a una longitud de onda incidente entre 488 y 498 nm.

Con ayuda del software utilizado por este microscopio (AxioVision 4.8) se reguló el tiempo de exposición para la toma de fotos a 2800 ms, permitiendo eliminar el efecto de la autofluorescencia característica de los cloroplastos en órganos fotosintéticos. La cámara utilizada fue la Zeiss AxioCam HRm.

5. RESULTADOS

5.1. Bioinformática.

5.1.1 Dendrograma

Las secuencias candidatas (At2g21250 y At2g21260) se encuentran descritas como posibles manosa-6-fosfato reductasa (M6PR; <http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=32982&type=locus>) y poseen >63% id aminoacídica con estas proteínas (datos no mostrados). Sin embargo, también poseen una alta identidad (>65% id aminoacídica, sección 5.1.2) con las sorbitol-6-fosfato deshidrogenasas (S6PDH) descritas en las bases de datos, la mayoría pertenecientes a la familia de las *Rosaceae*.

Para esclarecer la relación entre las secuencias candidatas, las M6PR y las S6PDH, se realizó un dendrograma (Figura 3) utilizando el software MEGA4. Con este objetivo, se compararon At2g21250 y At2g21260 con las secuencias aminoacídicas de S6PDH de 6 especies de Rosáceas (*Prunus dulcis*, *Prunus persica*, *Holodiscus microphyllus*, *Amelanchier alnifolia*, *Kageneckia oblonga* y *Malus domestica*), una no-Rosácea (*Zea mays*) y con las M6PR de especies provenientes de 3 familias (*Apium graveolans*, *Triticum aestivum* y *Phelipanche ramosa*).

En la Figura 3, se destacan dos grupos principales, que discriminan Rosáceas (A) de no-Rosáceas (B). Dentro del grupo de las no-Rosáceas, se distingue entre las M6PR (B1) y las secuencias similares a la S6PDH de *Z. mays* (B2), que incluye a ambas secuencias candidatas en *A. thaliana*. De lo anterior, se desprende que tanto At2g21250 como At2g21260 presentan una mayor relación filogenética con la secuencia de S6PDH de maíz que las otras secuencias analizadas, incluyendo las M6PR.

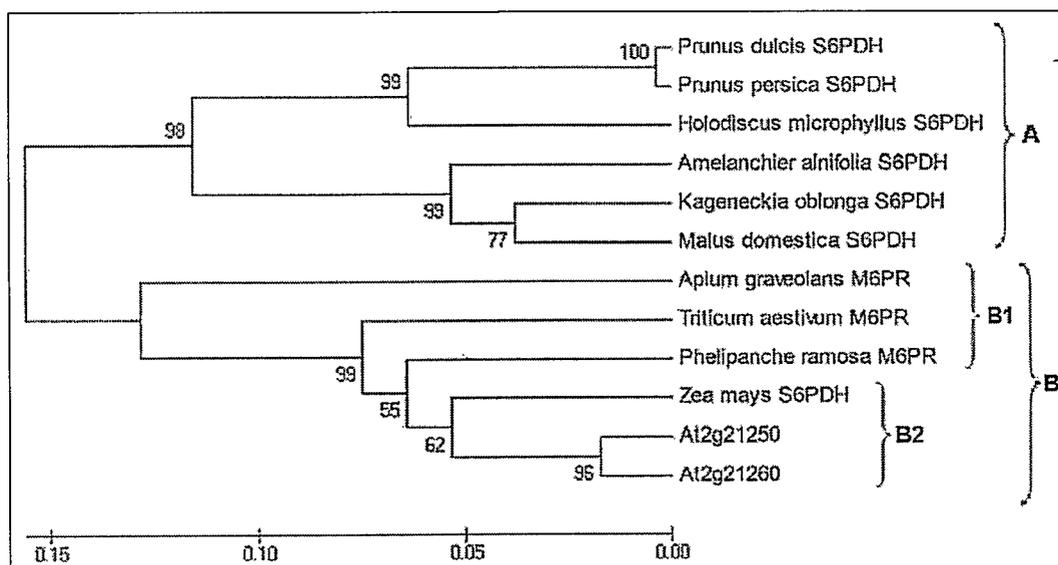


Figura 3: Dendrograma. Se distinguen dos grupos principales: **(A)** Rosáceas. **(B)** No-Rosáceas. En este último grupo, se distinguen dos sub-grupos: **(B1)** manosa 6-fosfato reductasas. **(B2)** Secuencias similares a sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa de maíz. Se indica en cada nodo el porcentaje de "bootstrap" obtenido con 1000 repeticiones y en el extremo inferior se presenta la "distancia" entre las secuencias aminoacídicas utilizadas. Este análisis se realizó con el software MEGA4.

5.1.2 Análisis de las secuencias candidatas

Para identificar dominios conservados en las secuencias candidatas y así obtener un primer indicio de su función, se utilizaron InterProScan y ScanProsite. Al igual que las M6PR (*P. ramosa*, *A. graveolans*) y S6PDH (*Z. mays*, *M. domestica*), éstas presentan tres motivos conservados característicos de las Aldo/Ceto Reductasas (Figura 4). Esta familia de proteínas engloba un grupo de oxidoreductasas citosólicas dependientes de NADPH, que catalizan la reducción de aldehídos y cetonas a alcoholes. Con unos 300 aminoácidos de longitud, los 3 sitios conservados característicos se denominan "Aldo/keto reductase family signature 1, 2 y 3", y se localizan en el extremo N-terminal, en la porción central y el extremo C-terminal de la proteína, respectivamente.

* La distancia es una medida de la relación filogenética entre dos organismos, donde se asigna 0 a un organismo igual a otro (misma especie) y se asigna 1 a dos organismos que no presentan características en común.

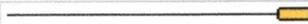
Aldo/keto reductase, conserved site		
PS00062		ALDOKETO_REDUCTASE_2
PS00063		ALDOKETO_REDUCTASE_3
PS00798		ALDOKETO_REDUCTASE_1

Figura 4: Motivos de secuencia conservados en Aldo/Ceto Reductasas. Se muestran los sitios conservados 1, 2 y 3 propios de la familia de las Aldo/Ceto Reductasas descritos en ScanProsite. El sitio conservado 3 posee el posible sitio activo en estas proteínas.

En ambas secuencias candidatas, el primero de los motivos de secuencia conservados (que presenta una precisión* del 100%) se puede encontrar entre los residuos 37 y 54 (PS00798). Entre los residuos 145 y 162, se encuentra el segundo motivo conservado (PS00062, con una precisión* del 97,06%) y el tercero (PS00063, con una precisión* del 66,67%) se encuentra entre los residuos 259 y 274. Algunos autores (Bohren y cols, 1989; Schade y cols, 1990) han sugerido que los aminoácidos de los patrones conservados 1 y 3 estarían involucrados en la unión a NADPH. Además, existe evidencia de que la modificación (química o por mutagénesis sitio-dirigida) del residuo de lisina en la secuencia IPKS (ubicada al inicio del tercer patrón conservado) afecta la afinidad por NADPH y las propiedades catalíticas de la enzima (Bohren y cols, 1991), por lo que este motivo se considera el posible sitio activo de esta familia de proteínas.

En la Figura 5 se puede observar que la secuencia IPKS se encuentra altamente conservada tanto en las sorbitol 6-fosfato deshidrogenasas como en las secuencias de At2g21250 y At2g21260. Éstas, sin embargo, presentan una sustitución S₂₆₂>T del tipo conservado, que también se encuentra en la secuencia de *Z. mays*. Esta figura

* La precisión indica la incidencia de falsos positivos: A mayor porcentaje de precisión, menor proporción de falsos positivos.

comparar las secuencias candidatas entre sí, se observa que At2g21250 presenta mayor porcentaje de identidad con las secuencias de S6PDH (sección 5.1.2). Además, según datos entregados por TAIR (www.arabidopsis.org), At2g21250 presenta una región promotora de mayor extensión y un mayor número de líneas mutantes insercionales disponibles, las cuales serán útiles para determinar su función *in vivo*, mediante el uso de plantas con menores niveles de expresión de este gen (datos no mostrados). Debido a estas características, se seleccionó At2g21250 para realizar este seminario de título y se le denominó *AtS6PDH*. Considerando el alto porcentaje de identidad nucleotídica entre At2g21250 y At2g21260, se diseñaron los partidores S6XbaF, S6SalR y S6SalR2 (Tabla II), específicos para amplificar At2g21250 incorporando las regiones 5'UTR y 3'UTR (menos conservadas entre At2g21250 y At2g21260). Se probó su efectividad amplificando el gen desde DNA genómico de hojas de *A. thaliana* (secciones 4.4 - 4.6), obteniéndose una banda de 2000 pb de acuerdo a lo esperado (datos no mostrados):

5.2. Expresión *in silico* e *in vivo* de *AtS6PDH*.

Para descartar la posibilidad que *AtS6PDH* constituya un pseudogen, se analizó *in silico* e *in vivo* su patrón de expresión a lo largo del desarrollo de la planta. Para los análisis *in silico*, se utilizó el recurso Arabidopsis eFP Browser (sección 4.3.1). Éste crea representaciones pictográficas del patrón de expresión de un gen de interés en *A. thaliana* a partir de datos de microarreglos (Affymetrix ATH1 array) obtenidos por Schmid y cols (2005) y datos del AtGenExpress Consortium Data (<http://igrt0.psc.riken.jp/AtGenExpressJPN/>).

Los datos indican que *AtS6PDH* se expresa durante todo el ciclo de vida de la planta y en la mayoría de sus órganos (Figura 6). Se puede observar que los mayores niveles de expresión (indicados en color rojo) se encuentran en semillas en un estado intermedio de desarrollo, seguida por los meristemas apicales vegetativos y en transición hacia la floración. Los cotiledones, semillas embebidas por 24 hrs y hojas rosetas (antes y después de la transición hacia la floración), aunque a menor nivel, también expresan *AtS6PDH* por sobre el promedio. Menores niveles de expresión se ven en hojas caulinares, flores, raíces, hojas senescentes y los meristemas apicales de flores. Los menores niveles de expresión se pueden observar en polen y semillas secas y maduras.

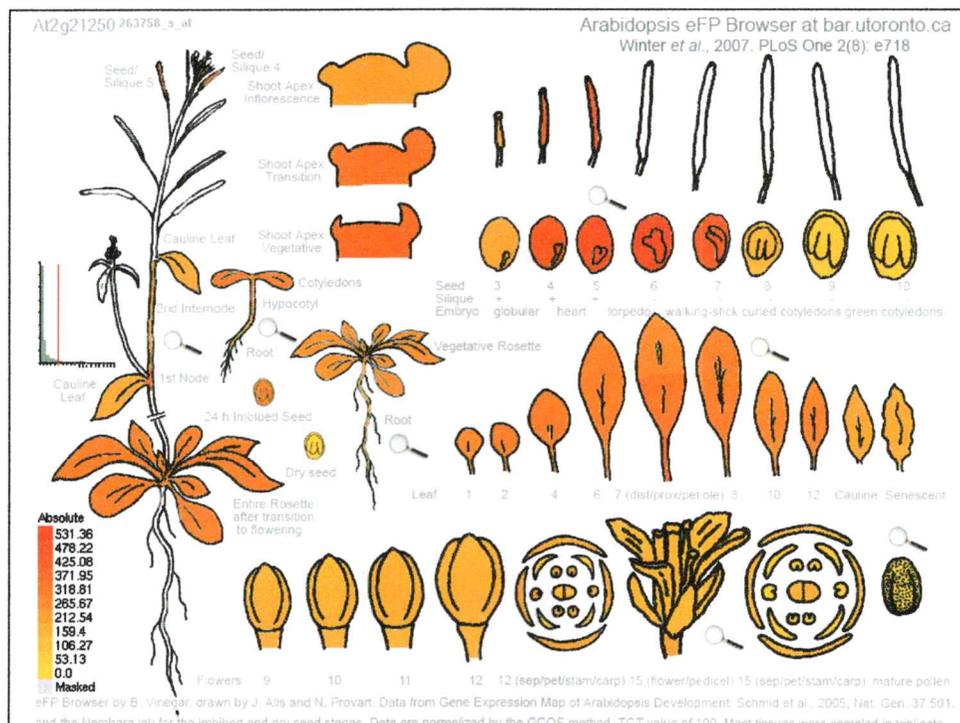


Figura 6: Expresión *in silico* de *AtS6PDH*. Se indica con un patrón de colores los niveles de expresión para cada órgano, con amarillo para el valor mínimo (5,63 en la semilla seca) y rojo para el valor máximo, correspondiente a 531,36 en el estadio 6 de la semilla. Obtenido desde Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

Para corroborar estos datos experimentalmente, se determinó la expresión de *AtS6PDH in vivo*, mediante RT-PCR de RNA extraído desde tallos, hojas rosetas, hojas caulinares y flores (sección 4.7), utilizando los partidores S6XbaF y S6SalR2 (Tabla II; sección 4.8). El resultado, donde se esperaba una banda de 1000 pb (Figura 7.A), muestra que efectivamente se expresa *AtS6PDH in vivo* y que este mRNA está presente en todos los órganos analizados. Como control de calidad del RNA, se amplificó un gen de expresión constitutiva (*GAPA*; sección 4.5.2; Figura 7.B). Se demostró la ausencia de contaminación por DNA genómico en las muestras utilizadas realizando el RT-PCR sin transcriptasa reversa como control negativo. Además, se debe considerar, que las bandas amplificadas a partir de DNA genómico contienen intrones que aumentan su tamaño en 100 pb (*GAPA*) o 1000 pb (*AtS6PDH*), volviéndolas fácilmente identificables.

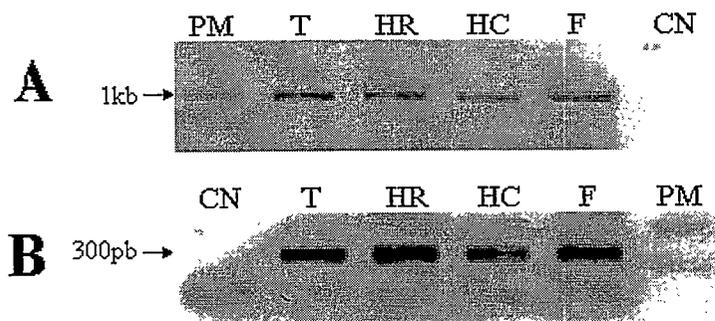


Figura 7: Expresión *in vivo* de *AtS6PDH*. (A) Reacción de RT-PCR para amplificar el cDNA de *AtS6PDH*, de 993pb. (B) Reacción de RT-PCR para amplificar el cDNA de *GAPA*, de 300 pb (control de calidad del cDNA). **PM:** Marcador de peso molecular. **T:** Tallo. **HR:** Hoja Roseta. **HC:** Hoja Caulinar **F:** Flor. **CN:** Control negativo, reacción realizada sin RT en todas las muestras.

5.3. Clonación de *AtS6PDH* en el vector pCR8.

Uno de los objetivos del seminario de título es determinar la localización subcelular de *AtS6PDH*. Para cumplir con ello, es necesario clonarlo en un vector de entrada que permita luego transferir el fragmento a vectores adecuados. Para clonar *AtS6PDH* en el vector de entrada pCR8, se realizaron tres reacciones de RT utilizando como molde cDNA de hojas (sección 4.8.2) hecho a partir de los partidores oligoAp, S6SaIR y S6SaIR2 y luego PCR con partidores S6XbaF y S6SaIR. Se obtuvo la banda esperada (1 kb) en todas las muestras, aunque la intensidad de ésta fue mucho mayor al usar S6SaIR2 (Figura 8). Si bien se observan bandas inespecíficas de menor tamaño, fue posible separarlas fácilmente de la banda de 1 kb por electroforesis (sección 4.5.2).

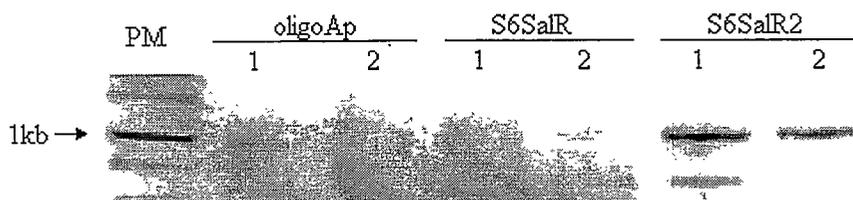


Figura 8: RT-PCR de *AtS6PDH*. Se utilizaron como molde 6 muestras de cDNA de hojas hecho con los partidores oligoAp, S6SaIR y S6SaIR2 (2 muestras de cada uno, carriles "1" y "2") y luego PCR con los partidores S6XbaF y S6SaIR. **PM:** Marcador de peso molecular.

Se purificó la banda de 1 kb y se clonó en el vector pCR8, para luego transformar *E. coli* por electroporación (sección 4.9). Las colonias resistentes a espectinomicina obtenidas fueron analizadas por PCR de colonias (sección 4.9.5) y luego digestión enzimática del DNA plasmidial con las endonucleasas BstEII y NcoI (sección 4.11.2).

De los 12 clones analizados, 5 eran portadores de pCR8-*AtS6PDH* (mediante PCR; colonias B, 1, 2, 3, y 10, datos no mostrados) de los cuales sólo 2 (clones B y 3) poseían el inserto en sentido (Figura 9). La orientación en sentido en este vector es

esencial para la clonación posterior en vectores Gateway® como pMDC84 y pMDC43.

Para comprobar la fidelidad de la secuencia clonada, se secuenció el fragmento *AtS6PDH* presente en pCR8-*AtS6PDH* (clones B y 3) y se comparó con la secuencia disponible en TAIR (sección 4.11.3). En el clon B se obtuvo un 100% de identidad nucleotídica con el cDNA de *AtS6PDH*, mientras que en el clon 3 la identidad nucleotídica fue del 99%, presentándose una sustitución en el codón de término por cisteína, probablemente debido a un mal apareamiento de los partidores.

Estos resultados permiten la clonación de *AtS6PDH* en vectores con diversas características, agregando, por ejemplo, GFP como proteína de fusión C-terminal (clon 3) y N-terminal (clon B) para determinar su localización subcelular (sección 5.4).

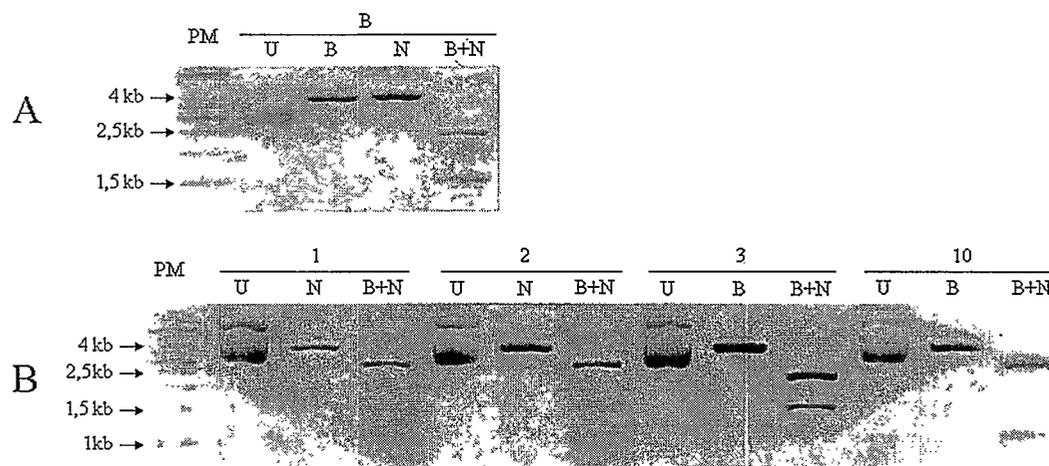


Figura 9: Digestión de pCR8-*AtS6PDH* con *BstEII* y *NcoI*. (A) Colonia B. (B) Colonias 1, 2, 3 y 10. El vector, de 3800 pb, contiene sitios de *NcoI* y *BstEII* a 273 pb y 1748 pb desde el codón de inicio del cDNA de *AtS6PDH*, respectivamente. La doble digestión libera un fragmento de ~1500 pb (inserto en sentido) o de ~1000 pb (inserto en anti-sentido). **PM**: marcador de peso molecular. **U**: vector sin digerir. **N**: digestión con *NcoI*. **B**: digestión con *BstEII*. **B+N**: doble digestión con *BstEII* y *NcoI*.

5.4. Determinación de la localización subcelular de *AtS6PDH*.

En cotiledones de manzana, se ha determinado experimentalmente que la S6PDH se encuentra tanto en el citosol como en las membranas tilacoidales de los cloroplastos (Yamaki 1981, Bantog y cols, 2000). En este Seminario de Título, se utilizaron dos abordajes para determinar la localización subcelular de *AtS6PDH* de *Arabidopsis*; análisis *in silico* y análisis *in vivo*.

5.4.1 Análisis *in silico*.

Se determinó la localización subcelular predicha de *AtS6PDH* utilizando la base de datos SUBAII (sección 4.3.1), que recopila datos de diferentes algoritmos predictores. La mayoría de ellos indican una localización citosólica y descartan la localización en mitocondrias, retículo endoplasmático (RE) e incluso cloroplastos (Tabla III).

Tabla III: Localización subcelular predicha de *AtS6PDH*. Se indican los resultados de los algoritmos recopilados por el servidor SUBAII. **SP:** Péptido señal. **mTP:** Péptido de señalización mitocondrial. **cTP:** Péptido de transporte a cloroplasto.

Algoritmo	Descripción	Resultado	Detalles
WoLFPSORT	Localización subcelular en eucariontes	Citosol	Citosol 8.0 ¹ , Núcleo 4.0 ¹ , Cloroplasto 2.0 ¹
LOCtree	Localización subcelular para proteínas no-transmembrana	Citosol	-
SubLoc	Localización subcelular en eucariontes	Citosol	Precisión esperada 94%
Predotar	Señales de destinación N-terminal	no contiene SP, mTP ni cTP	Mitocondrial 0.01; Plastidio 0.02; RE 0.11; Otro 0.86
iPSORT	Señales de destinación N-terminal	no contiene SP, mTP ni cTP	-
TargetP	Localización subcelular en plantas	no contiene SP, mTP ni cTP	cTP 0.078 ² ; mTP 0.134 ² ; SP 0.337 ² ; Otro 0.709 ²
MitoPred	Proteínas mitocondriales	No-mitocondrial	-
Mitoprot2	Proteínas mitocondriales	No mitocondrial	-

¹: Los valores se refieren directamente al número de secuencias en la base de datos que se asemejan a la secuencia objetivo y que se ubican en el compartimento sub-celular mencionado

²: Los valores se refieren a un puntaje arbitrario que entrega el método (valor máximo, 1; valor mínimo, 0)

5.4.2 Análisis *in vivo*.

Una vez realizado el análisis *in silico*, se determinó la localización subcelular de *AtS6PDH in vivo*, pues aunque el análisis anterior indica que *AtS6PDH* es una proteína citosólica, la literatura (Yamaki 1981, Bantog y cols, 2000) sugiere que podría encontrarse también en cloroplastos.

Con este propósito, se realizó una reacción de recombinación (sección 4.12.1) para transferir el cDNA de *AtS6PDH* (sección 5.3) desde el vector pCR8-*AtS6PDH* a los vectores pMDC84 y pMDC43. Éstos permiten la expresión de la proteína en plantas agregando GFP C-terminal o N-terminal (respectivamente) como proteína de fusión. La construcción de ambos vectores se debe a que, si bien los péptidos de destinación a cloroplasto se encuentran en el extremo N-terminal de la proteína, Tissier y cols. (2002) han demostrado que en algunas proteínas de membrana tilacoidal, el extremo C-terminal puede jugar un rol en la estabilización de su estructura.

5.4.2.1 Clonación de *AtS6PDH* en pMDC84 y análisis funcional de pMDC84-*AtS6PDH*.

El vector pMDC84 agrega GFP a *AtS6PDH* como fusión C-terminal, por lo tanto se utilizó el clon 3 de pCR8-*AtS6PDH*, que no presenta el codón de término, para realizar la reacción de recombinación (sección 4.12.1). Luego, se transformó *E. coli* con el vector pMDC84-*AtS6PDH* (sección 4.12.2). Las colonias obtenidas fueron analizadas por PCR de colonias (sección 4.9.5) y digestión enzimática de las minipreparaciones (sección 4.10, Figura 10) con las endonucleasas HindIII y NcoI (sección 4.13.1).

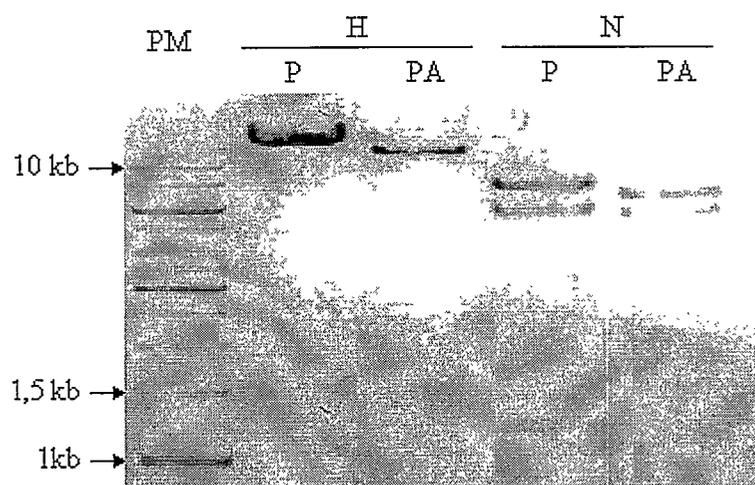


Figura 10: Digestión de pMDC84 y pMDC84-AtS6PDH con HindIII y NcoI. pMDC84 contiene 1 sitio de restricción HindIII y AtS6PDH contiene otro, por lo que esta digestión libera un fragmento de ~1300pb si el vector presenta el inserto y una linearización si no lo presenta. La digestión con NcoI libera un fragmento de 500 pb si el inserto está en anti-sentido, de 1000 pb si está en sentido y de 1100 pb si el inserto no está presente. **PM:** marcador de peso molecular. **P:** vector sin inserto. **PA:** vector con *AtS6PDH*. **H:** vectores digeridos con HindIII. **N:** vectores digeridos NcoI.

Por PCR, las 5 colonias analizadas poseían *AtS6PDH* (datos no mostrados). La digestión (Figura 10) confirmó la presencia y orientación correcta del fragmento en el vector. En la digestión con NcoI, se libera un fragmento no esperado de gran tamaño (~5 kb), probablemente debido a una mutación del vector. Sin embargo, de acuerdo a su tamaño, ésta se encontraría en una zona no-codificante del vector, fuera de la zona entre los bordes L y R, por lo que no se debería alterar su funcionalidad.

Una vez comprobada la presencia y orientación correcta de *AtS6PDH* en pMDC84-AtS6PDH, se transformó *A. tumefaciens* (sección 4.14.1). Posteriormente, se utilizaron las colonias transformadas para infiltrar hojas de *N. tabacum* (sección 4.14.2), que 4 días después fueron cosechadas y analizadas por RT-PCR de *AtS6PDH* utilizando RNA extraído de las hojas transformadas (sección 4.15.1, Figura 11) y microscopía de fluorescencia (sección 4.15.2, Figura 12).

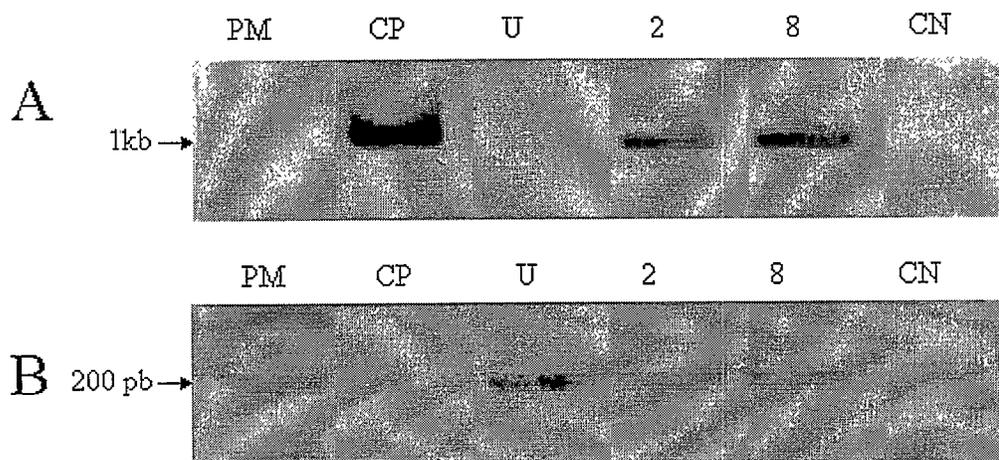


Figura 11: RT-PCR de *AtS6PDH* en tabaco transformado con pMDC84-*AtS6PDH*. (A) RT-PCR de *AtS6PDH*, de ~1000pb. (B) RT-PCR de *18S*, de ~200 pb (control de calidad del cDNA). CP: control positivo (cDNA de flores de *A. thaliana*, sección 5.2). U: tabaco transformado con *A. tumefaciens* silvestre. 2: tabaco transformado con *AtS6PDH*-GFP (colonia 2) 8: tabaco transformado con *AtS6PDH*-GFP (colonia 8). CN: control negativo, reacción realizada sin RT para todas las muestras.

Los resultados del RT-PCR (Figura 11) confirman la expresión de *AtS6PDH* exclusivamente en las hojas transformadas con pMDC84-*AtS6PDH*. Como control de calidad del RNA, se amplificó un gen de expresión constitutiva (*18S*; sección 4.5.2; Figura 11.B). Se demostró la ausencia de contaminación por DNA genómico en las muestras utilizadas realizando el RT-PCR sin transcriptasa reversa como control negativo. Al demostrar que el vector es funcional a nivel transcripcional, se procedió a observar la presencia y distribución de fluorescencia de *AtS6PDH*-GFP utilizando microscopía de epifluorescencia. La fluorescencia observada (Figura 12B) descarta una localización en compartimientos que presentan un patrón de fluorescencia discreta de fácil reconocimiento, como RE, núcleo, cloroplastos, mitocondrias, aparato de Golgi, lisosomas o vacuolas.

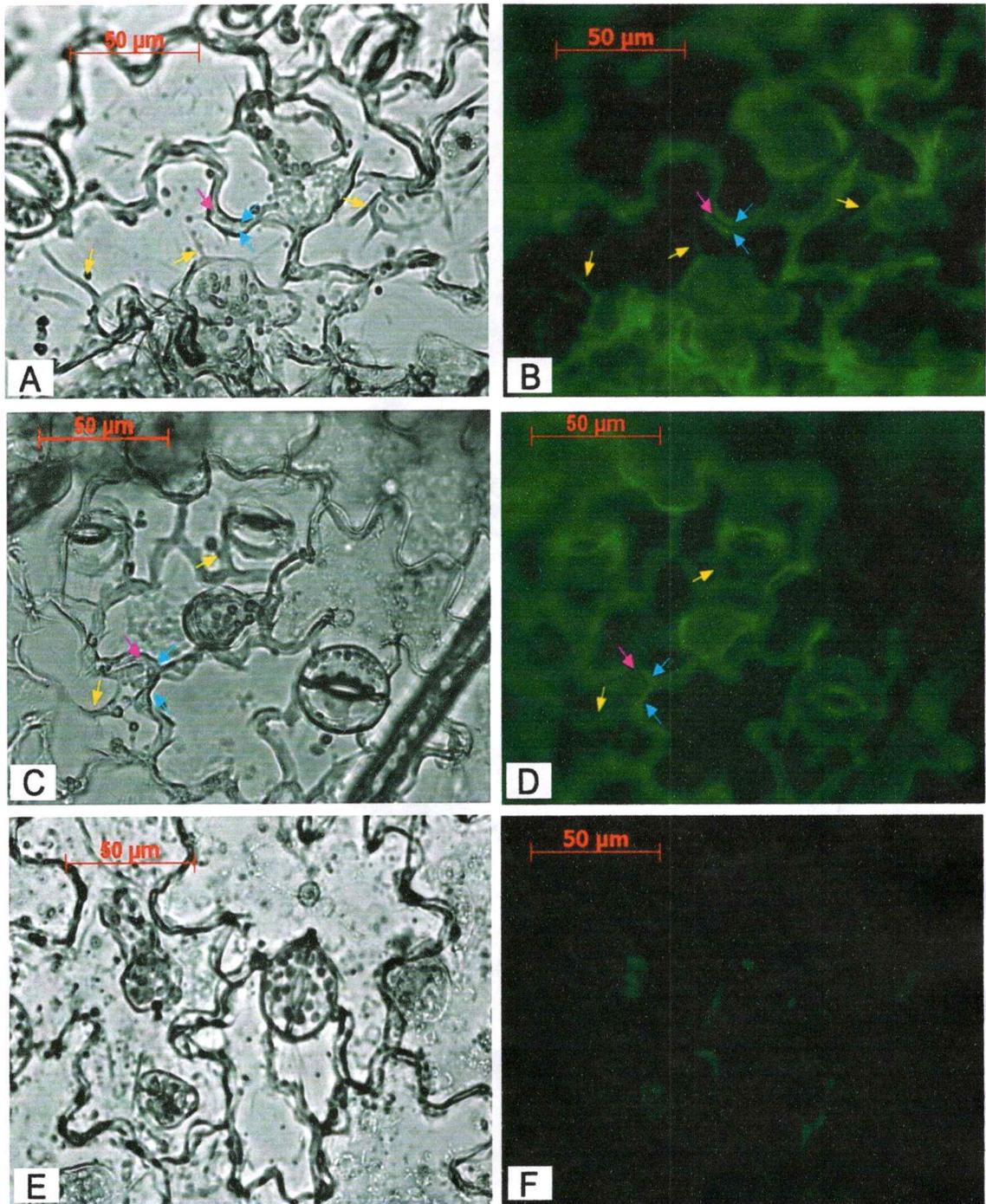


Figura 12: Fluorescencia de AtS6PDH-GFP. (A) Células epidermales de tabaco expresando AtS6PDH-GFP, campo claro (B) Células epidermales de tabaco expresando AtS6PDH-GFP, fluorescencia. (C) Células expresando GFP soluble, campo claro (D) Células expresando GFP soluble, fluorescencia (E) Control Negativo: células transformadas con *A. tumefaciens* silvestres, campo claro (F) Control Negativo: Autofluorescencia de células transformadas con *A. tumefaciens* silvestres. Las flechas azules indican fluorescencia citosólica (desplazada al borde celular a causa de la vacuola). Las flechas rosadas señalan la pared celular y las flechas amarillas, los hilos transvacuolares o pliegues del citosol.

En las células vegetales, las vacuolas ocupan 80-90% del volumen total de la célula, desplazando el citoplasma a los bordes. Para facilitar la comunicación entre zonas distales de la célula, hilos de citosol atraviesan la vacuola (Taiz y Zeiger, 2006). En la Figura 12.B, se observa una localización de este tipo, donde la fluorescencia de AtS6PDH-GFP se encuentra desplazada hacia los bordes de la célula (flechas azules), entre la vacuola y la membrana plasmática, la cual está aplastada contra la pared celular (flecha rosada). Además, se observan varias líneas fluorescentes al interior de las células (flechas amarillas) que probablemente corresponden a hilos transvacuolares o pliegues propios del citoplasma. Estas observaciones descartan que AtS6PDH se encuentre asociada a la pared celular o la membrana plasmática e indican que corresponde a una proteína citosólica. Estas características (fluorescencia desplazada hacia los bordes celulares, separados por la pared celular, con líneas fluorescentes al interior de la célula) también se observan en el control de GFP soluble (Figuras 12.C y 12.D).

5.4.2.2 Clonación de *AtS6PDH* en pMDC43 y análisis funcional de pMDC43-*AtS6PDH*.

El vector pMDC43 agrega GFP a *AtS6PDH* como fusión N-terminal, por lo tanto se utilizó el clon B de pCR8-*AtS6PDH*, que posee el codón de término para realizar la reacción de recombinación (sección 4.12.1) y transferir el cDNA de *AtS6PDH* desde pCR8-*AtS6PDH* al vector pMDC43. Luego, se transformó *E. coli* OneShot® quimiocompetentes con el vector pMDC43-*AtS6PDH*. La digestión con XbaI del vector purificado (Figura 13) muestra las tres bandas esperadas, lo que confirma la presencia y orientación correcta de *AtS6PDH* en pMDC43.

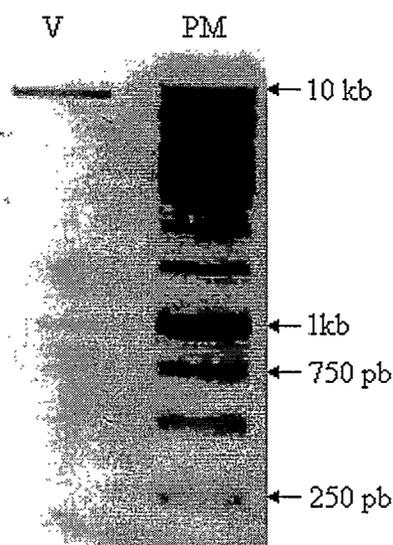


Figura 13: Digestión de pMDC43-AtS6PDH con XbaI. Si presenta el inserto en sentido, al ser digerido con XbaI este vector (de ~12kb) libera 2 bandas de 1000 y 800 pb cada una. **V:** pMDC43-AtS6PDH digerido. **PM:** marcador de peso molecular

Se probó la funcionalidad del vector pMDC43-AtS6PDH transformando transitoriamente hojas de tabaco. Para ello, se transformó *A. tumefaciens* que se utilizó para infiltrar hojas de *N. tabacum* (sección 4.14). Éstas fueron cosechadas y analizadas por RT-PCR (sección 4.15.1, Figura 14.A) y microscopía de fluorescencia (sección 4.15.2, Figura 14.B-E) 4 días después de la infiltración.

El RT-PCR muestra la presencia del mRNA de *AtS6PDH* solamente en las hojas infiltradas con pMDC43-AtS6PDH (Figura 14.A), confirmado que este vector es funcional transcripcionalmente. Como control de calidad del RNA, se amplificó un gen de expresión constitutiva (*18S*; sección 4.5.2, Figura 14.B), y como control de ausencia de DNA genómico contaminante (control negativo) se realizó la reacción de PCR sin transcriptasa reversa.

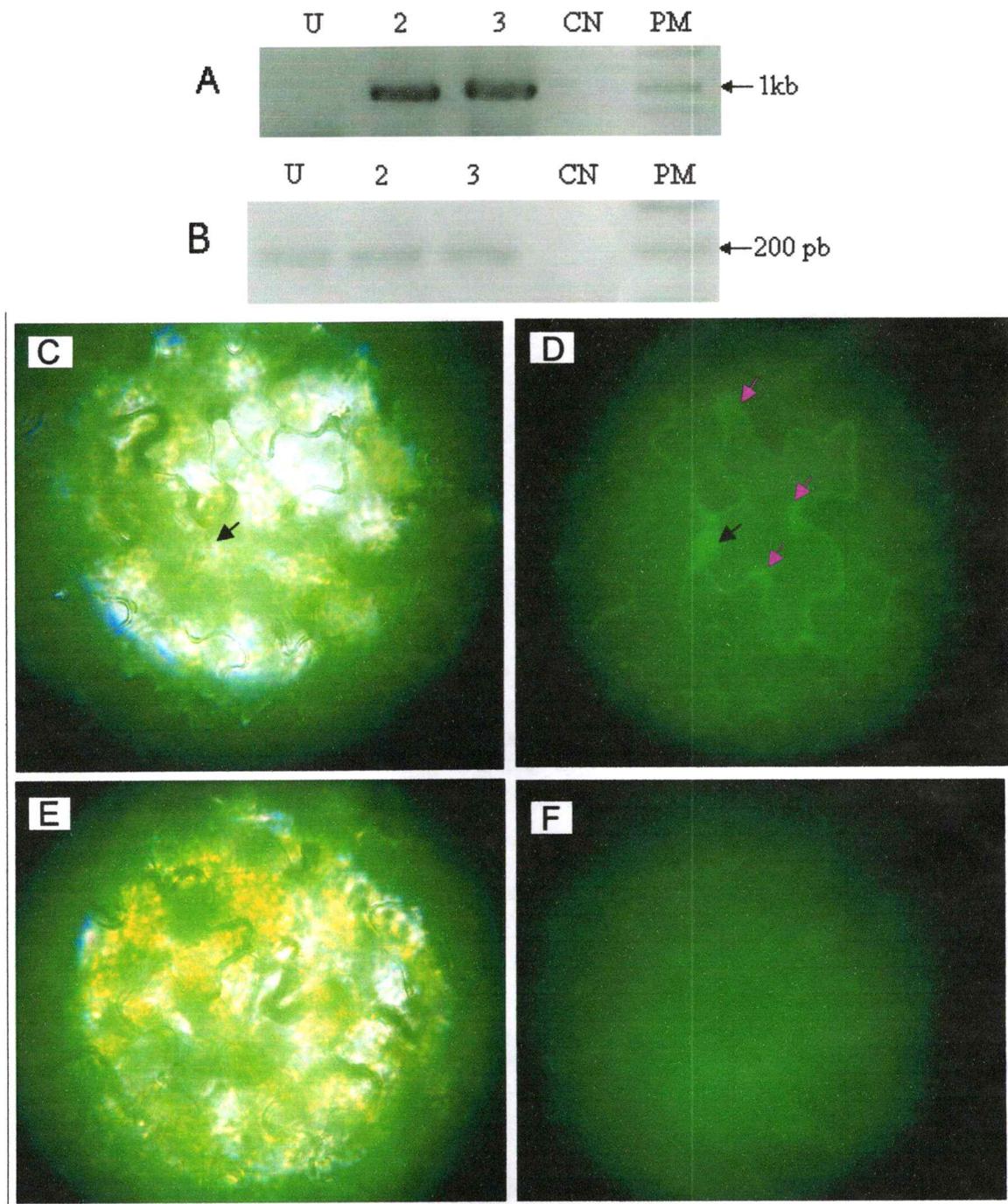


Figura 14: RT-PCR de *AtS6PDH* y visualización de GFP en tabaco transformado con pMDC43-*AtS6PDH*. (A) RT-PCR de *AtS6PDH* desde RNA de tabaco transformado con pMDC43-*AtS6PDH*. (B) RT-PCR de *18S* desde RNA de tabaco transformado con pMDC43-*AtS6PDH*. U: tabaco transformado con *A. tumefaciens* silvestre. 2, 3: tabaco transformado con pMDC43-*AtS6PDH* (colonias 2 y 3). CN: control negativo, reacción realizada sin RT para todas las muestras. PM: Marcador de peso molecular. (C, D) Campo claro (C) y fluorescencia (D) de células epidermales de tabaco transformado con pMDC43-*AtS6PDH*. (E, F) Campo claro (E) y autofluorescencia (F) de células transformadas con *A. tumefaciens* silvestre (control negativo). Se señalan con flechas negras el núcleo y con flechas rosadas el citosol.

En la Figura 14.D, la fluorescencia observada se corresponde con la localización citosólica (flechas rosadas) descrita anteriormente. Sin embargo, en la foto también es posible observar los núcleos celulares (flechas negras). Este patrón de fluorescencia (citoplasmática y en ocasiones nuclear) corresponde al de GFP soluble (no fusionada a otras proteínas) observado por Haseloff y Amos (1995). Posteriores secuenciaciones demostraron que en el vector pMDC43-AtS6PDH se incorporó un codón de término entre *GFP* y *AtS6PDH*, permitiendo la traducción de GFP, pero no del gen de interés. Sin embargo, aunque pMDC43-AtS6PDH no sirve para determinar la localización subcelular de la proteína, sí podría ser empleado como una herramienta para estudiar el papel que juega *AtS6PDH* *in vivo*. Específicamente, de los resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio, al acoplar un gen vegetal del mismo tamaño de *AtS6PDH* (*GONST3*; ~1000 pb) a una secuencia relativamente larga (~700 pb) como la de GFP, el mRNA obtenido presenta mayor estabilidad. En el caso de expresar *GONST3-GFP* en *A. thaliana*, se gatilló SGPT por co-supresión, algo que no ocurrió al expresar *GONST3-His* (de menor estabilidad) en la misma planta (Miranda, 2009). De acuerdo a estos antecedentes, si bien el vector pMDC43-AtS6PDH no resulta funcional para determinar la localización subcelular de *AtS6PDH*, sí constituye un vector adecuado para gatillar SGPT por co-supresión de *AtS6PDH* en plantas. Esto, dado que se determinó que proteínas GFP y transcritos de *AtS6PDH* se acumulan en plantas transformadas transitoriamente (Figura 14), y por lo tanto transcritos largos (~1700 pb) y potencialmente estables de *GFP-AtS6PDH* se expresan a partir de este vector.

6. DISCUSIÓN

En el desarrollo de este seminario de título, se realizó una primera aproximación hacia el estudio de *AtS6PDH* como posible sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa de *A. thaliana*. Esto se realizó a través del análisis *in vivo* e *in silico* de su expresión y la determinación de su localización subcelular, utilizando herramientas bioinformáticas y técnicas de biología molecular. Esta investigación permitió demostrar la expresión *in vivo* de *AtS6PDH* y establecer su localización subcelular citosólica, obteniéndose así indicios importantes sobre su relevancia metabólica y función posible.

La investigación se comenzó con dos secuencias candidatas a S6PDH de *A. thaliana*: At2g21250 y At2g21260. Éstas probablemente corresponden a una duplicación génica, dado el alto porcentaje de identidad nucleotídica entre ambas, su posición adyacente en el genoma y orientación 5'-3' idéntica, y la alta tasa de duplicación génica en el genoma de esta especie: >50% del total de los genes codificados en el cromosoma 2 (donde se encuentran las secuencias candidatas) son duplicados, y muchos se encuentran en tándem (2-8 repeticiones; Lin y cols., 1999).

Para acotar este estudio, y considerando la tasa de duplicación génica y los análisis de expresión *in silico* (donde la expresión de ambas secuencias es idéntica [datos no mostrados]), se realizó el trabajo en sólo una de ellas, At2g21250. Ésta presenta un mayor porcentaje de identidad con secuencias caracterizadas de S6PDH (sección 5.1.2) y un mayor número de líneas mutantes insercionales disponibles para futuros estudios. Aún así, investigaciones posteriores podrían establecer diferencias en actividad, afinidad al sustrato o cofactor, etc. de sus productos génicos.

La robustez del dendrograma obtenido en este trabajo (Figura 3) depende en parte del número de secuencias utilizadas y de la confiabilidad de ellas. Sin embargo, no se encontraron secuencias caracterizadas de *S6PDH* en no-rosáceas o no-plantagináceas, por lo que se incorporó una secuencia de *S6PDH* (Tabla I) de *Z. mays* no caracterizada en el análisis. Aunque esto reduce la confiabilidad del dendrograma, se considera que *At2g21250* es un buen candidato para un *S6PDH* en *A. thaliana* ya que cumple con otras características de estas proteínas. Por ejemplo, el análisis de secuencia señala a *AtS6PDH* como una Aldo/Ceto Reductasa (Figura 4) con alta identidad (>66%) a *S6PDHs* de rosáceas que sí han sido caracterizadas [*M. doméstica* (Negm y Loescher, 1981), *P. persica* (Shakanishi y cols, 1998)], y posee una localización subcelular (citósólica) predicha consistente con la reacción catalizada en otras especies (ver abajo). Cabe señalar además, que si bien existe manitol-1-fosfato (sustrato de *M6PRs*, Aldo/Ceto Reductasas con alta similitud [>60%] a las secuencias analizadas en este trabajo) en *A. thaliana*, la ruta de biosíntesis de este compuesto no ha sido definida y no se conocen vías metabólicas asociadas a la reacción (manosa-6-fosfato \leftrightarrow manitol-1-fosfato). Sin embargo, solamente al realizar estudios bioquímicos, se podría resolver la especificidad de sustratos de *AtS6PDH* y comparar su actividad con las *S6PDHs* ya descritas.

Para clonar *AtS6PDH* y demostrar su patrón de expresión, se optimizó la reacción de PCR para amplificar específicamente *At2g21250*, ya que este método se utilizó además para los análisis de presencia del inserto durante los pasos de clonación. La alta similitud nucleotídica entre *At2g21250* y *At2g21260* (93% identidad

nucleotídica) aumentó la importancia de conseguir especificidad en la amplificación, que se logró modificando la concentración del ión Mg^{+2} , la temperatura de apareamiento de los partidores con el cDNA molde y la secuencia de los partidores. Para aumentar el rendimiento de las reacciones de PCR (Figura 8), fue necesario realizar las reacciones de transcripción reversa con el partidor S6SalR2 y luego el PCR con los partidores S6XbaF y S6SalR. La explicación a esto se encuentra en que mientras el partidor S6SalR2 posee mayor especificidad con la secuencia 3'UTR de *AtS6PDH* (sección 4.3.2), el T_m del partidor S6SalR se asemeja más al de S6XbaF (datos no mostrados), por lo que la reacción de PCR se vuelve más eficiente.

Los resultados de la secuenciación de pCR8-AtS6PDH con los partidores universales M13, confirmaron la identidad del fragmento amplificado en los experimentos de expresión y en los de clonación, demostrando que la banda amplificada en las Figuras 7, 8, 11 y 14 corresponde a At2g21250, comprobando la efectividad de la estrategia de clonación. La secuenciación de este vector también reveló clones con (clon B) y sin (clon 3) codón de término, suceso ocurrido probablemente a causa de un mal apareamiento de los partidores con el cDNA durante la amplificación por PCR. Esta anomalía permitió la construcción de un vector (pMDC43-AtS6PDH) que, si bien no fue adecuado para determinar localización subcelular de AtS6PDH, debería ser capaz de gatillar SGPT por co-supresión en la planta, para así determinar la función *in vivo* de este gen.

El SGPT por co-supresión es un mecanismo que suprime la acumulación de RNA endógeno, viral o transgénico. Al ser detectado un RNA aberrante por la célula

(por ejemplo, RNA sin señal poli-A o cap 5'), una RNA-polimerasa dependiente de RNA lo usa como molde para sintetizar RNA de doble hebra, que es detectado por la ribonucleasa DICER. Ésta lo degrada a siRNA (pequeños RNA de interferencia) de doble hebra, que se incorporan al complejo RISC (RNA-induced silencing complex). Éste separa las hebras y utiliza una de ellas para identificar y unirse al RNA blanco, complementario a la secuencia incorporada a RISC. Finalmente, el RNA reconocido por RISC puede quedar bloqueado para la traducción o ser degradado para formar más siRNA, lo cual amplifica la señal de silenciamiento (Voinnet, 2008). Este mecanismo se aprovecha en la biotecnología vegetal para producir líneas transgénicas con menores niveles de expresión de un blanco específico. La ventaja de este método es que se disminuye la acumulación del producto génico sin eliminarla por completo, lo que evita la aparición de fenotipos letales o inviables que suele ocurrir al interrumpir una secuencia (por ejemplo, por una inserción de un transposón o T-DNA). Por lo tanto, se obtienen líneas con diferentes niveles de silenciamiento, lo que entrega más información que un fenotipo mutante sin expresión.

Las pruebas realizadas en este seminario de título muestran que durante la expresión transitoria de pMDC43-AtS6PDH en tabaco, se expresan transcritos de *AtS6PDH* (Figura 14.A), pero se acumulan solamente proteínas GFP, y no GFP-*AtS6PDH* (Figura 14.D) dado la presencia de un codón de término en marco de lectura entre ambas secuencias codificantes. La alta estabilidad de transcritos de *GFP* fusionados a otro cDNA (*GONST3*) gatilló SGPT en *A. thaliana* transformadas establemente con un vector para expresar *GONST3-GFP*, generando plantas con entre

20-80% los niveles de expresión de *GONST3* comparado con plantas silvestres (Miranda, 2009). Por lo tanto, pMDC43-AtS6PDH debería gatillar SGPT por co-supresión de *AtS6PDH* en *A. thaliana*, permitiendo la creación de líneas mutantes con menores niveles de expresión, ayudando a determinar su papel *in vivo* a través de la caracterización fenotípica de las plantas creadas.

El otro vector construido en este trabajo, pMDC84-AtS6PDH, sí permitió determinar exitosamente la localización subcelular de AtS6PDH. En la digestión enzimática de esta construcción (Figura 10), se presentan bandas no esperadas, indicadoras de una mutación ocurrida en una zona no-codificante del vector. Sin embargo, este cambio no afectó su funcionalidad, lo que se comprobó posteriormente al demostrar la expresión de *AtS6PDH-GFP* en *N. tabacum* transformado transitoriamente con pMDC84-AtS6PDH a través de RT-PCR y microscopía de epifluorescencia. Consistente con las predicciones obtenidas *in silico* (Tabla III), donde 3 algoritmos diferentes sugieren a AtS6PDH como proteína citosólica, AtS6PDH efectivamente se localiza en el citosol (Figura 12). Este resultado es consistente también con la localización subcelular de S6PDH en otras especies rosáceas [*M. domestica* (Yamaki, 1981) y *E. japonica* (Bantog y cols, 2000)]. A diferencia de las especies mencionadas, en este estudio no se detectó presencia de la proteína AtS6PDH-GFP en cloroplastos. Esta diferencia puede deberse a que en Rosáceas, la producción de sorbitol está fuertemente relacionada a la asimilación de carbohidratos de la planta (Yamaki, 1995), lo que no ocurre en *A. thaliana* y otras no-rosáceas, donde la acumulación de sorbitol

sería citosólica y guardaría relación con la tolerancia al estrés (Deguchi y cols., 2004; Kaplan y cols., 2004).

Respecto a la expresión de *AtS6PDH*, se pudo observar que plantas no expuestas a estrés presentan expresión de este gen en la mayoría de sus órganos (tallos, hojas rosetas, hojas caulinares, y flores, Figura 7), sugiriendo un papel en la mantención del estado basal de la célula. Estos resultados se corroboran con la información *in silico* obtenida por datos de microarreglos (Figura 6). Éstos últimos muestran niveles de expresión de *AtS6PDH* cambiantes a lo largo del desarrollo, en particular en semillas. El análisis de la expresión del gen en semillas en desarrollo (donde se produce la expresión más alta según los microarreglos) sería muy interesante debido al efecto osmoprotector del sorbitol. Estudios más detallados, como RT-PCR cuantitativo, hibridación *in situ* o fusiones del promotor de *AtS6PDH* con genes reporteros (por ejemplo β -glucuronidasa, *GUS*) permitirían obtener mayor información sobre la expresión de *AtS6PDH* en tejidos específicos dentro de cada órgano y bajo diferentes condiciones de estrés.

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

En el genoma de *A. thaliana* se encuentran dos ORF cuyas características permiten considerarlas como *S6PDH* potenciales y propias de esta especie. Como investigación preliminar en el estudio de estos genes, en este seminario de título 1) se determinó la expresión *in silico* e *in vivo* de uno de ellos (*AtS6PDH*), 2) se analizó su secuencia y 3) se determinó su localización subcelular. Los resultados obtenidos indicaron que esta secuencia corresponde a una proteína de la familia de las Aldo/Ceto Reductasas, con alta identidad a *S6PDHs* y *M6PRs* y que se expresa en el citosol de diversos órganos (tallos, hojas y flores) durante gran parte del ciclo de vida de esta planta.

Además, se obtuvo un vector adecuado para crear líneas transgénicas con menores niveles de expresión de *AtS6PDH* por SGPT. Una vez creadas, la caracterización fenotípica de estas plantas proveerá de mayores indicios sobre el papel que juega *AtS6PDH* en el metabolismo de *A. thaliana*. Más aún, es posible evaluar el desempeño de estos organismos bajo diversas condiciones de estrés abiótico: estrés salino, por frío, por sequía, por insuficiencia de micronutrientes (boro), presencia de ABA, etc., las cuales se ha observado conducen a cambios en la expresión y actividad de *S6PDH* en otras especies, dado su papel en el metabolismo de sorbitol (Lo Bianco y cols, 2000; Matsumoto, 2008; Deguchi y cols., 2002, Kanayama y cols 2007; Veeranagamallaiah y cols., 2009). Otra posibilidad interesante consiste en estudiar las variaciones en los niveles y distribución de la expresión de este gen en plantas de tipo silvestre y mutante sometidas a las condiciones ya mencionadas.

Una vez conocidas la expresión y localización subcelular de *AtS6PDH*, es indispensable realizar ensayos de actividad con diferentes sustratos para establecer si presenta preferencia hacia la reducción de glucosa-6-fosfato utilizando NADPH y las condiciones en que esta proteína presenta actividad. También sería muy interesante determinar si utiliza manosa-6-fosfato como sustrato y comparar la cinética de ambas reacciones, ya que manitol es otro alcohol de azúcar presente en *A. thaliana* (Fiehn y cols, 2000; Rizhsky y cols, 2004), y M6PR utiliza también NADPH como cofactor y posee el sitio conservado IPKS (Figura 5; Everard y col, 1997).

Considerando además la relación entre la exposición a estrés abiótico y la expresión de *S6PDH* en Rosáceas, junto al aumento de la tolerancia a estrés observada en plantas transformadas para expresar esta enzima (sección 1.2), un tema de estudio a mediano plazo consiste en el análisis del promotor de *AtS6PDH*. Éste puede realizarse por métodos bioinformáticos, explorando la presencia de sitios que regulen en *cis* la expresión de este gen, o bien transformando plantas con vectores que unan el promotor a genes reporteros para examinar su expresión. A más largo plazo, y dependiendo de la actividad y las condiciones en las cuales se expresa *AtS6PDH*, se puede utilizar esta enzima con fines biotecnológicos, para la generación de plantas de interés comercial y con alta tolerancia al estrés: la expresión de una *S6PDH*, potencialmente con bajos niveles de actividad, les permitiría acumular sorbitol para obtener los beneficios (resistencia a estrés abiótico, etc.) pero no las desventajas observadas (disminución del crecimiento, senescencia temprana, etc.) cuando este metabolito se encuentra a altas concentraciones.

8. CONGRESOS

Aguayo M.F., Tang Y-W, **Zamudio M.S.** y Handford M.G. (2009) Sorbitol metabolism in plants. IV Reunión de Biología Vegetal, La Serena, (14-16 octubre 2009). Premio al mejor póster realizado por alumnos de pregrado.

Zamudio, M.S. y Handford, M. (2010). Caracterización de AtS6PDH, una supuesta Sorbitol-6-fosfato Deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana*. XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Termas de Chillán. (28 Septiembre -1 Octubre 2010).

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, I., Lahrer, F., Stewart, G. R. 1979.** Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. *New Phytol.* 82(3): 671-678.
- Bantog, N. A., Yamada, K., Niwa, N., Shiratake, Yamaki, S. 2000.** Gene Expression of NAD⁺-Dependent Sorbitol Dehydrogenase and NADP⁺-Dependent Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase During Development of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 69 (3): 231-236.
- Blevins, D. G. y Lukaszewski, K. M. 1998.** Boron in plant structure and function. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 481-500.
- Bohren, K. M., Bullock, B., Wermuth, B., Gabbay K. H. 1989.** The Aldo-Keto Reductase Superfamily. *J. Biol. Chem.* 264(16): 9547-9551.
- Bohren, K. M., Page, J. L., Shankar, R., Henry, S. P., Gabbay K. H. 1991.** Expression of Human Aldose and Aldehyde Reductases. *J. Biol. Chem.* 266(35): 24031-24037.
- Brown, P. H., Bellaloui, N., Hu, H., Dandekar, A. M. 1999.** Transgenically Enhanced Sorbitol Synthesis Facilitates Phloem Boron Transport and Increases Tolerance to Tobacco to Boron Deficiency. *Plant Physiol.* 119: 17-20.
- Bellalouie, N., Brown, P. H., Dandekar, A. M. 1999.** Manipulation of in Vivo Sorbitol Production Alters Boron Uptake and Transport in Tobacco. *Plant Physiol.* 119: 735-741.
- Cheng, L., Zhou, R., Reidel, E. J., Sharkey, T. D., Dandekar, A. M. 2005.** Antisense inhibition of sorbitol synthesis leads to up-regulation of starch synthesis without altering CO₂ assimilation in apple leaves. *Planta* 220: 767-776.
- Chong, B. F., Bonnett, G. D., Glassop, D., O'Shea, M. G., Brumbley, S. M. 2007.** Growth and metabolism in sugarcane are altered by the creation of a new hexose-phosphate sink. *Plant Biotechnol. J.* 5: 240-253.
- Christie, P. J., Hahn, M., Walbot, V. 1991.** Low-Temperature Accumulation of Alcohol Dehydrogenase-1 mRNA and Protein Activity in Maize and Rice Seedlings. *Plant Physiol.* 95(3): 699-706.
- Curtis, M.D. y Grossniklaus, U. 2003.** A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiol.* 133:462-469.
- Deguchi, M., Watanabe, M., Kanayama. Y. 2002.** Increase in Sorbitol Biosynthesis in Stressed Japanese Pear Leaves. *Acta Hort.*; 587: 512-517.

- Deguchi, M., Koshita, Y., Gao, M., Tao, R., Tetsumura, T., Yamaki, S., Kanayama Y. 2004.** Engineered sorbitol accumulation induces dwarfism in Japanese persimmon. *J. Plant Physiol.* 161: 1177-1184.
- Doyle, J. J. y Doyle. J. L. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Everard, J. D., Cantini, C., Crumet, R., Plummer, J., Loescher W. H. 1997.** Molecular cloning of Mannose 6P reductase and its developmental Expression in Celery. *Plant Physiol.* 11(3): 1427-1435.
- Fiehn, O., Kopka, J., Trethewey, R. N., Willmitzer L. 2000.** Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadruple mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72: 3573-3580
- Gao, M., Tao, R., Miura, K., Dandekar, A. M., Sugiura A. 2001.** Transformation of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Science* 160: 837-845.
- Gibeaut, D. M., Hulett, J., Cramer, G. R., Seeman. J. R. 1997.** Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiol.* 115: 317-319.
- Haritatos, E., Medville, R., Turgeon, R. 2000.** Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 105-111.
- Haseloff, J. y Amos, B. 1995.** GFP in Plants. *Technical Focus*, 11(8): 328-329.
- Hirai., M. 1981.** Purification and characteristics of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from loquat leaves. *Plant Physiol.* 67:221-224.
- Jarillo, J. A., Leyva, A., Salinas, J., Martínez-Zapater, J. M. 1993.** Low Temperature Induces the Accumulation of Alcohol Dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a Chilling-Tolerant Plant. *Plant Physiol.* 101: 833-837.
- Kanamaru, N., Ito, Y., Komori, S., Saito, M., Kato, H., Takahashi, S., Omura, M., Soejima, J., Shiratake, K., Yamada, K., Yamaki, S. 2004.** Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. *Plant Science* 167: 55-61.
- Kanayama, Y., Odanaka, S. 2000.** Biochemistry and Genetic Engineering of sugar Metabolism in Fruit. *Tohoku J. Agricultural Res.* 51(1-2): 7-14.

- Kanayama, Y., Moriguchi, R., Deguchi, M., Kanahama, K., Yamaki, S. 2007.** Effects of Environmental Stresses and Abscisic Acid on Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase Expression in Rosaceae Fruit Trees. *Acta Hort.* 738: 375-382.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N., Sung, D. Y., Guy, C. L. 2004.** Exploring the Temperature-Stress Metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136: 4159-4168.
- Karimi, M., Inzé D., y Depicker, A. 2002.** GATEWAY™ Vectors for *Agrobacterium*-mediated Plant Transformation. *TRENDS in Plant Science*, 7(5): 193-195.
- Kim, H-Y., Ahn, J. H., Choi, J-H., Hwang, B. Choi, D-W., 2007.** Expression and cloning of the full-length cDNA for sorbitol 6-phosphate dehydrogenase and NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from pear. *Scientia Hort.* 112: 406-412.
- Kotchoni, S. O., Gachomo, E. W., Betiku, E., Shonukan, O. O. 2003.** A home-made kit for plasmid-dna miniprep extraction. *Afr. J. Biotechnol.* 2(4): 88-90.
- Lewis, D. H., Smith, D. C. 1967.** Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants I: Distribution, physiology and metabolism. *New Phytol.* 66(2):143-184.
- Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T. P., Benito, M. I., Town, C. D., Fujii, C. Y., Mason, T., Bowman, C. L., Barnstead, M., Feldblyum, T. V., Buell, C. R., Ketchum, K., Lee, J., Ronning, C. M., Koo, H. L., Moffat, K. S., Croning, L. A., Shen, M., Pai, G., Van Aken, S., Umayam, L., Tallon, L. J., Gill, G. E., Adams, M. D., Carrera, A. J., Creasy, T. H., Goodman, H. M., Somerville, C. R., Copenhaver, G. P., Preuss, D., Nierman, W. C., White, O., Eisen, J. A., Salzberg, S. L., Fraser, C. M., Venter. J. C. 1999.** Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 402: 761-769.
- Lo Bianco, R., Rieger, M., Sung S-J. 2000.** Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sink and sources of peach. *Physiologia Plantarum* 108: 71-78.
- Mandujano, P. 2010.** Localización subcelular y caracterización bioquímica de AtSDL, una potencial sorbitol deshidrogenasa. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Matsumoto, T. 2008.** *Phytochemistry Research Progress*. Ed. Nova; Capitulo 4: 75-82.
- Miranda, P. 2009.** Desarrollo de herramientas para el estudio del rol de GONST3, un transportador de nucleótidos-azúcar de *Arabidopsis thaliana*. Universidad de Chile, Santiago. Chile.
- Morais de Sousa, S., Paniago, M.d.G., Arruda, P., Yunes, J. A., 2008.** Sugar levels modulate sorbitol dehydrogenase expression in maize. *Plant Mol. Biol.* 68: 203-213.

- Negm, F. B., Loescher, W. H. 1981.** Characterization and Partial Purification of Aldose-6-phosphate Reductase (Alditol-6-phosphate:NADP 1-Oxidoreductase) from Apple Leaves. *Plant Physiol.* 67:139-142.
- Ohkawa, W., Moriya, S., Kanahama, K., Kanayama, Y. 2008.** Re-Evaluation of Sorbitol Metabolism in Fruit from *Rosaceae* Trees. *Acta Hort.*; 772: 159-166.
- Ohta, K., Moriguchi, R., Kanahama, K., Yamaki, S., Kanayama Y. 2005.** Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non.*Rosaceae* plant. *Phytochemistry* 66: 2822-2828.
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., Sauer N. 2007.** Differential Regulation of Sorbitol and Sucrose Loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiol.* 144: 1029-1038.
- Reidel, E. J., Rennie, E. A., Amiard, V., Cheng, L., Turgeon, R. 2009.** Phloem loading strategies in plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiol.* 149:1601-1608.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler R. 2004.** When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134: 1683-1696
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. T., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, V., Weigel, D. y Lohmann J. U. 2005.** A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature genetics*, 37(5):501-506.
- Schade, S. Z., Early, S. L., Williams, T. R., Kézdy, F. J., Heinrikson, R. L., Grimshaw, C. E., Doughty C. C. 1990.** Sequence Analysis of Bovine Lens Aldose Reductase. *J. Biol. Chem.* 265(7): 3628-3635.
- Slewinisky, T. L., Braun, D. M. 2010.** Current perspectives on the regulation of whole-plant carbohydrate partitioning. *Plant Science* 178: 341-349.
- Shakanishi, K., Kanayama, Y., Mori, H., Yamada, K., Yamaki, S. 1998.** Expression of the Gene for NADP-Dependent Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase in Peach Leaves of Various Developmental Stages. *Plant Cell Physiol.* 39(12): 1372-1374.
- Sheveleva, E. V., Marquez, S., Chmara, W., Zegeer, A., Jensen, R. G., Bohnert. H. J. 1998.** Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase Expression in Transgenic Tobacco. *Plant Physiol.* 117: 831-839.
- Taiz, L., y Zeiger, E. 2006.** *Plant Physiology*, 4a Edición. Capítulo 1:13, Capítulo 6:92. Sinauer Associates

- Teo, G., Suzuki, Y., Uratsu, S., Lampinen, B., Ormonde, N., Hu, W. K., DeJong, T. M., Dandekar, A. M. 2006.** Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *Proceedings* 103(49): 18842-18847.
- Tissier, C., Woolhead, C., Robinson, C. 2002.** Unique structural determinants in the signal peptides of "spontaneously" inserting thylakoid membrane proteins. *European Journal of Biochemistry* 269: 3131-3141.
- Veeranagamallaiiah, G., Ranganayakulu, G. S., Thippeswamy, M., Sivakumar, M., Eswaranarayana Reddy, K., Pandurangaiah, M., Sridevi, V., Sudhakar, C. 2009.** Aldose reductase expression contributes in sorbitol accumulation and 4-hydroxynon-2-enal detoxification in two foxtail millet (*Setaria italica* L.) cultivars with different salt stress tolerance. *Plant Growth Regul.* 59: 137-143.
- Voinnet, O. 2008.** Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *TRENDS in Plant Science.* 13(7): 317-328.
- Watari, J., Kobae, Y., Yamaki, S., Yamada, K., Toyofuku, K., Tabuchi, T., Shiratake, K. 2004.** Identification of Sorbitol Transporters Expressed in Phloem of Apple Source Leaves. *Plant Cell Physiol.* 45(8): 1032-1041.
- Yamaki, S. 1981.** Subcellular localization of Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase in protoplast from apple cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 22(3): 359-367.
- Yamaki, S. 1995.** Physiology and metabolism of fruit development. *Acta Hort.* 398: 109-120.
- Zhou, R., Cheng, L., Dandekar, A. M. 2006.** Down-regulation of sorbitol dehydrogenase and up-regulation of sucrose synthase in shoot tips of the transgenic apple trees with decreased sorbitol synthesis. *J. Exp. Botany* 57(14): 3647-3657.
- Zhou R. y Cheng, L. 2008.** Competitive inhibition of phosphoglucose isomerase of apple leaves by sorbitol 6 phosphate. *Journal of Plant Physiology* 2008; 165: 903-910.

Nombre del sitio	Dirección web	Última visita
AtGenExpress	http://igrt0.psc.riken.jp/AtGenExpressJPN/	19/5/10
BAR	http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi	19/5/10
ClustalW2	(http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)	13/6/10
IDT	http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx	12/5/10
InterProScan	http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/	7/5/10
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/	18/5/10
restrictionmapper	http://www.restrictionmapper.org/	20/5/10
ScanProsite	http://expasy.org/prosite/	7/5/10
SUBA	http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/	19/5/10
TAIR	http://www.arabidopsis.org	7/5/10
TAIR BLAST	http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp,	11/5/10