

Tesis de Posgrado

Estudio de la estructura y regulación de la expresión de los genes Cab en plantas superiores

Fernández, Sandra Viviana

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fernández, Sandra Viviana. (1996). Estudio de la estructura y regulación de la expresión de los genes Cab en plantas superiores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2809_Fernandez.pdf

Cita tipo Chicago:

Fernández, Sandra Viviana. "Estudio de la estructura y regulación de la expresión de los genes Cab en plantas superiores". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2809_Fernandez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

*“ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y REGULACION DE LA EXPRESION DE
LOS GENES Cab EN PLANTAS SUPERIORES”.*

Autor: Sandra Viviana Fernández

Director: Roberto Julio Staneloni

Instituto de Investigaciones Bioquímicas “Luis F. Leloir”, Fundación Campomar
Buenos Aires, Argentina.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.
(ORIENTACION EN CIENCIAS QUIMICAS).

1996

h.2

Esta tesis se la quiero dedicar muy especialmente a la persona que me dió "todo", a la persona que siempre me acompañó, a la persona que me ayudó a sentirme bien cuando me sentí muy mal...

A mi mamá.

A mi papá, que me enseñó que siempre debo mirar hacia adelante.

A Diego, que siempre confió en mi y siempre me ayudó.

A mi abuelo Manuel y a mi abuela Josefina.

A Rosa.

A Flor, mi bebé, mi alegría, todo...

Agradecimientos

- Al Dr. Roberto J. Staneloni quien dirigió este trabajo de tesis.
- Al Consejo Directivo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", por haberme dado la posibilidad de realizar mi tesis y por el apoyo económico que he recibido.
- Al Dr. Jorge Casal de la cátedra de Ecología de la Facultad de Agronomía, UBA, quien realizó los tratamientos luminosos.
- A la Dra. Clara Krisman y al Dr. Héctor Carminatti, por sus consejos y ayuda.
- Al Dr. Israel Algranati, al Dr. Ricardo Bolosiuk y al Dr. Marcelo Dankert.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme las becas de iniciación y perfeccionamiento.
- A mis amigos Carolina Ceriani, Marcelo Rodriguez, Daniel Bassi, Irma Mastronardi, Marina Marzoca, Margarita Villa y Eduardo Guillén. Por todos los momentos compartidos durante estos años y por la gran mano que siempre me dieron cuando los necesité.
- A mi compañero de laboratorio Gustavo Gudesblat que me ayudó muchísimo con los gráficos de esta tesis.
- A mis compañeros Verónica Pascuccelli, Karin Hagelin, Totó, Alejandro Petroni, Fabiana Fernández, Patricia Barderi, Olga Castro, Adrián Vojnov, Ariel Scharlat, Pablo Cerdán, Angeles Zorreguieta, Alejandro Heuck, Federico Katsen, Marta Bravo, Sandra Fanciotti, Santiago Mora García, Tony Uttaro, Alejandro Rabossi, Silvana Merello y Gabriel Briones.
- A Oscar Campetella, a quien muchas veces consulté y siempre tuvo "la posta".
- A quien me enseñó a estudiar "para la vida", mi gran profesor de historia argentina Osvaldo Giorno.
- A mis profesores Ricardo Rizzo y Ethel A. de Almará.
- A Georgina S. de Moure, Mónica Romanello y Aida Kauffman.
- ***"A mis grandes amigos de toda la vida: Alicia Ernie, Alejandro Prezzavento, Rosa Brugna y Nancy Cáceres".***

“Estudio de la estructura y regulación de la expresión de los genes Cab en plantas superiores”.

Resumen

Se aislaron seis genes *Lhc* a partir de una biblioteca genómica de papa (*Solanum tuberosum*). Estos genes codifican polipéptidos que formarían parte de los complejos que captan la luz que luego es utilizada en la fotosíntesis. Estos genes se hallan en tandem y están separados por regiones de 1.3-1.4 kb. Todos poseen la misma orientación 5'→ 3' y cada uno de ellos tiene su propio promotor localizado 5' río arriba de la región de código. Las proteínas deducidas a partir de las secuencias de bases, poseen todos los aminoácidos característicos de las proteínas CAB del PSII, Tipo I, las cuales están codificadas por los genes *Lhcb1*. Por lo tanto los genes aislados fueron denominados: *Lhcb1*1*, *Lhcb1*2*, *Lhcb1*3*, *Lhcb1*4*, *Lhcb1*5* y *Lhcb1*6*. La región codificante de estos genes posee 798 pb excepto el *Lhcb1*6* el cual fue aislado en forma incompleta (411 pb). Estos genes codifican proteínas de 265 aminoácidos, incluyendo el péptido señal. Los genes estudiados poseen un 94-98% de homología en sus secuencias de bases y codifican proteínas que poseen entre un 97.5% a 99.75% de identidad. Las regiones 5' flanqueantes de los seis genes poseen secuencias conservadas y que están presentes en otros genes cuya expresión es regulada por la luz (el fragmento de 62 pb localizado entre las cajas CAAT y TATA contiene tres secuencias GATA).

La expresión de los genes *Lhcb1* en las plantas de papa mostró ser específica de órgano. Diferentes transcritos fueron detectados en las hojas de las plantas mientras que solo uno se detectó en los tallos y no hubo expresión en las raíces. Se determinó el sitio de iniciación de la transcripción para el gen *Lhcb1*2*. El mismo está localizado a 69 nucleótidos río arriba del codón de iniciación de la traducción (codón ATG). Los resultados indicaron que la C en la secuencia CTTCAT constituye el primer nucleótido en el ARNm correspondiente al gen *Lhcb1*2*. La región localizada río arriba del gen *Lhcb1*2* que se extiende hasta

-1300pb fue secuenciada. Esta región contiene un motivo "G" (5'TGGTTGTGTC3') localizado entre las bases -162 a -171 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción. Recientemente fue demostrado que el factor citosólico GBF, el cual se une al motivo "G", se transloca al núcleo en presencia de luz, mientras que en la oscuridad permanece en el citoplasma (Harter *et al*, 1994).

Las funciones regulatorias de la región 5' flanqueante del gen *Lhcb1*2* fueron analizadas en plantas transgénicas de tabaco. En la construcción realizada, la región promotora del gen *Lhcb1*2* dirige la expresión del gen reportero *uidA*, el cual codifica la enzima β -glucuronidasa (GUS). El análisis de las plantas transgénicas reveló que la región 5' flanqueante (-1300 a +10) del gen *Lhcb1*2* es suficiente para conferir una respuesta a la luz a través del fotoreceptor fitocromo así como también una respuesta específica de órgano. Por otra parte, la expresión del gen *uidA* fue detectada en las plántulas transgénicas de tabaco a partir de las 72 hs luego de la germinación de las semillas. Este resultado se correlaciona con el tiempo de maduración de los cloroplastos (Oemüller *et al*, 1986). Además, no se detectó expresión del gen *uidA* cuando las plántulas de tabaco transgénicas fueron cultivadas en presencia de un herbicida que impide el desarrollo de los cloroplastos. Por lo tanto, estos resultados indican que la presencia de cloroplastos maduros es necesaria para la expresión del GUS dirigida por el promotor del gen *Lhcb1*2* aislado de plantas de papa. Se realizaron deleciones de la región promotora las cuales fueron fusionadas al gen *uidA*. De estos experimentos se pudo concluir que la región del promotor comprendida entre las bases -690 a +10 es suficiente para conferir una respuesta específica de órgano así como también una respuesta a la luz a través del fotoreceptor fitocromo.

Palabras claves: proteínas CAB, genes *Lhcb1*, expresión específica de órgano, papa (*Solanum tuberosum*), fitocromo.

Referencias: Harter *et al*, 1994: "Light regulated modification and nuclear translocation of cytosolic G-box binding factors in parsley". *Plant Cell* 6, 545-559.
Oemüller *et al*, 1986: "Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids". *Planta* 168, 482-492.

"Characterization and Regulation of the Expression of the *Solanum tuberosum* *Lhc* genes"

Abstract

A potato (*Solanum tuberosum*) genomic library was used to isolate five full-length genes and part of a sixth one, encoding the apoproteins of a light-harvesting complex (LHC). These genes are arranged in tandem with a spacing of 1.3-1.4 kb between neighboring genes. They present the same orientation and they have their own promoters 5'-upstream of the coding regions. All the *Lhcb1* genes have 798 bp open reading frame coding for a protein of two hundred and sixty-five amino acids, including a transit peptide. The nucleotide homology among the five genes is between 94-98%. The nucleotide sequences showed that they encoded very similar proteins (99.75% to 97.50% identities). The deduced amino acid sequences were homologous to the PSII Type I CAB proteins encoded by the *Lhcb1* genes, so these genes were named *Lhcb1*1*, *Lhcb1*2*, *Lhcb1*3*, *Lhcb1*4*, *Lhcb1*5* and *Lhcb1*6*, respectively. The 5'-flanking regions of the six potato genes shared conserved sequences already detected in other light-responsive genes (62 bp fragment located between the CAAT and TATA boxes containing three GATA motifs).

The expression of *Lhcb1* genes in potato was organ-specific. At least nine different transcripts can be recognized in leaves by the primer extension method. A unique transcript could be detected in stems and not in roots.

The transcription start site for the *Lhcb1*2* gene was determined. It is located 69 nucleotides upstream from the ATG codon. Our results indicated that the C in the sequence CTTCAT would be the first nucleotide in the *Lhcb1*2* mRNA.

The 5' upstream region of *Lhcb1*2* extending from -1300 bp to the cap site was sequenced. This region contained a G-box motif (TGGTTGTGTC) located between -162 and -171 from the transcription start site. It has been recently demonstrated that the translocation of the cytosolic GBFs (G-box binding factor)

to the nucleus is light-regulated (Harter *et al*, 1994). The regulatory function of the 5'-flanking region of the potato *Lhcb1*2* was analyzed in transgenic tobacco plants. The construct used contained the *uidA* gene which was under the control of the potato *Lhcb1*2* promoter. Analysis of transgenic plants revealed that the 5'-flanking region (-1300 to +10, relative to the transcription start site) of the *Lhcb1*2* gene is sufficient to confer a phytochrome response as well as organ-specific expression. In our experiments, the expression of the *uidA* gene was detected in the transgenic tobacco seedlings around 72 h after germination. This result correlates well with the time of maturation of the chloroplasts (Oemüller *et al*, 1986). Furthermore, the expression of *uidA* was not detected when transgenic seedlings were grown in presence of Norflurazon. These results correlates the presence of mature chloroplasts with the GUS expression directed by the *Lhcb1*2* promoter. We have obtained constructs in which the *uidA* gene was under the control of deletions of the 5'-flanking region of potato *Lhcb1*2*. The -690 to +10 flanking region of the *Lhcb1*2* is enough to confer organ-specific and phytochrome-regulated expression on the *uidA* coding sequence.

Key words: CAB proteins, light-harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins of photosystem II, *Lhcb1* genes, potato (*Solanum tuberosum*), phytochrome.

References:

- Harter *et al*, 1994: "Light regulated modification and nuclear translocation of cytosolic G-box binding factors in parsley". *Plant Cell* 6, 545-559.
- Oemüller *et al*, 1986: "Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids". *Planta* 168, 482-492.

ABREVIATURAS.

AcONa: acetato de sodio.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

ADN-T: ADN transferible.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

CAB ("chlorophyll *a/b* binding proteins"): proteínas que se unen a la clorofila *a* y *b*.

Forman parte de las antenas colectoras de luz para la fotosíntesis.

EDTA: ácido etilén diamino tetracético.

GUS: β -glucuronidasa.

kb: kilo bases.

kD: kilo Dalton.

Km: kanamicina.

Km^R: kanamicina resistentes.

Km^S: kanamicina sensibles.

LHC ("light harvesting complex"): complejos colectores de luz.

Lhc: genes que codifican los polipéptidos CAB. Son también llamados genes *Cab*.

Lhcb: genes que codifican proteínas CAB, pertenecientes al LHClI.

mg: miligramos.

ml: mililitros.

mM: milimolar.

μ **g:** microgramos.

μ **l:** microlitros.

μ **M:** micromolar.

MUG: 4-metilumbelifenil β -D-glucurónido.

4-MU: 7-hidroxi- 4-metilcumarina.

nM: nanomolar.

nt: nucleótidos.

pb: pares de bases.

PCR ("Polymerase chain reaction"): reacción de la polimerasa en cadena.

plásmido Ti: plásmido inductor de tumores.

PSI: fotosistema I.

PSII: fotosistema II.

R: rojo.

RC: rojo continuo.

RL: rojo lejano.

RLC: rojo lejano continuo.

SDS: dodecil sulfato de sodio.

St: estandard de peso molecular.

T1: plantas transformadas obtenidas a partir de los discos de hojas de tabaco.

T2: plantas transformadas obtenidas por autofecundación de las plantas T1.

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-1-3-propanodiol.

***uidA*:** gen que codifica la enzima β -glucuronidasa.

X-Gluc: 5- bromo- 4-cloro-3 indolil- β - D- glucurónico.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION.....	1
I - LA LUZ EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS.	
I- 1. Aspectos generales.....	2
I- 2. Los fitocromos.....	5
I- 3. Los receptores de luz azul y ultravioleta.....	6
I- 4. Traducción de la señal luminosa al núcleo de la célula vegetal y regulación de la expresión génica.....	7
II - FOTOSINTESIS.	
II- 1. Aspectos generales de la fotosíntesis.....	10
II- 2. Estructura y función de los fotosistemas I y II.....	12
Estructura del fotosistema II (PSII).....	14
a) Transporte electrónico desde el agua al fotosistema II.....	14
b) Transporte electrónico desde el fotosistema II al fotosistema I.	15
c) Transporte electrónico desde el fotosistema I al NADP ⁺	15
II- 3. Pigmentos que absorben la luz: Clorofilas y carotenoides.....	16
II- 4. Fijación de CO ₂	18
III - PROTEINAS QUE SE UNEN A LA CLOROFILA <u>A</u> y <u>B</u>	
POLIPEPTIDOS CAB.....	19
IV - ANTENAS PERIFERICAS DEL FOTOSISTEMA I Y II.....	20
IV- 1. Antenas periféricas del fotosistema I: LHCI.....	20
IV- 2. Antenas periféricas del fotosistema II: LHCII.....	21
V - ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LOS POLIPEPTIDOS CAB.....	24
VI - GENES <i>Lhc</i>.....	26

MATERIALES Y METODOS.....28

METODOLOGIA DE ACIDOS NUCLEICOS: ADN Y ARN

I- ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN).....	29
I- 1 .Librería genómica.....	29
I- 2 .Identificación de secuencias de ADN por hibridación.....	29
a- Selección de los bacteriófagos recombinantes de interés.....	29
b- Tratamiento de los filtros de nitrocelulosa.....	30
c- Marcación de la sonda de ADN por el método de "random primers".....	30
d- Hibridación de los filtros de nitrocelulosa con la sonda radiactiva.	30
Autorradiografías.	
I- 3 .Purificación del ADN de los bacteriófagos.....	31
I- 4 .Digestiones del ADN con endonucleasas de restricción.....	32
I- 5 .Métodos electroforéticos de ácidos nucleicos.....	32
a- Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida.....	32
b- Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	33
I- 6 .Transferencia a filtros de nitrocelulosa.....	33
I- 7 .Transformación de bacterias con ADN plasmídico.....	34
I- 8 .Purificación de ADN plasmídico.....	35
I- 9 .Secuenciación del ADN:	
a- Desnaturalización del ADN.....	35
b- Hibridación del "primer".....	35
c- Reacciones de secuencia.....	35
d- Gel de secuencia. Autorradiografía.....	36
e- Preparación del plásmido pBluescript simple cadena para reacciones de secuencia.....	36
I- 10. Técnica de PCR. Introducción de un sitio BamHI en la región 5' flanqueante del gen <i>Lhcb1*2</i>	37

II- ACIDO RIBONUCLEICO (ARN).....	38
II- 1. Aislamiento del ARN de plantas de papa.....	38
II- 2. Electroforesis del ARN en geles de agarosa desnaturalizantes.....	39
II- 3. "Primer extension":.....	40
a- Marcación del "primer" con [γ - ³² P] ATP.....	40
b- Reacciones de "primer extension".....	41
III- METODOLOGIA UTILIZADA EN LOS ENSAYOS DE TRANSFORMACION DE PLANTAS.....	42
III- 1. Transformación de <i>E.coli</i> HB101 con plásmidos pBI y sus derivados.....	42
III- 2. Purificación de pBI y plásmidos derivados.....	42
III- 3. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404 con el plásmido pBI.....	42
a- Preparación de las bacterias.....	43
b- Transformación.....	43
III- 4. Transformación de plantas de tabaco a partir de discos de hojas mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
IV- ANALISIS DE LAS PLANTAS DE TABACO TRANSFORMADAS.....	46
IV- 1. Detección de la β -glucuronidasa en las plantas transgénicas.....	46
a- Ensayo fluorométrico.....	46
b- Ensayo histoquímico.....	47
IV- 2. Análisis de las plantas transformadas por "Southern blot".....	47
a) Extracción del ADN de las plantas de tabaco.....	47
b) "Southern blot".....	48
IV- 3. Análisis del ADN de las plantas transformadas por PCR.....	48
IV- 4. Análisis de la progenie T2.....	49

V- TRATAMIENTOS LUMINOSOS.....	50
V- 1. Preparación de las semillas.....	50
V- 2. Condiciones de los tratamientos luminosos para el estudio de la regulación por fitocromo.....	50
V- 3. Condiciones de los tratamientos luminosos realizados para el estudio de la regulación por el receptor de luz azul.....	51
V- 4. Procesamiento de las plántulas.....	51
VI- TRATAMIENTO CON NORFLURAZON.....	52
VII- MEDIOS DE CULTIVO Y BUFERS UTILIZADOS.....	52
VIII- CEPAS BACTERIANAS.....	53
IX- PLASMIDOS COMERCIALES DERIVADOS DE pBI.....	53
OBJETIVOS.....	55
RESULTADOS.....	57
I- ESTRUCTURA DE LOS GENES <i>Lhc</i> DE PAPA.....	58
I- 1. Selección y análisis de los bacteriófagos recombinantes que llevan los genes de interés.....	58
I- 2. Mapa físico del bacteriófago recombinante 41.....	60
II- ANALISIS DE LAS REGIONES DE CODIGO DE LOS GENES <i>Lhc</i> AISLADOS DE PAPA.....	62
II- 1. Análisis de la estructura primaria.....	62

II- 2. Análisis de la estructura secundaria de los polipéptidos deducidos.....	70
a) Péptido de tránsito.....	70
b) Polipéptido maduro.....	71
II- 3. Homología interna de los polipéptidos.....	75
III- ANALISIS DE LAS REGIONES 5' FLANQUEANTES DE LOS GENES <i>Lhc</i> AISLADOS DE PAPA.....	76
IV- ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LOS GENES <i>Lhcb1</i> EN PLANTAS DE PAPA.....	79
IV- 1. Estudio de la expresión de los genes <i>Lhcb1</i> en las hojas de plantas de 60 días.....	79
IV- 2. Expresión de los genes <i>Lhcb1</i> en distintos órganos de plantas de papa de 90 días.....	81
IV- 3. Expresión del gen <i>Lhcb1*2</i> . Determinación del sitio de iniciación de la transcripción.....	83
V- SECUENCIA DE LA REGION QUE SE HALLA LOCALIZADA RIO ARRIBA DE LA ZONA DE CODIGO DEL GEN <i>Lhcb1*2</i>	85
VI- ESTUDIOS DE LA REGULACION DE LA EXPRESION EN PLANTAS DE TABACO TRANSGENICAS. REGION -1300+10 DEL GEN <i>Lhcb1*2</i> FUSIONADO AL GEN REPORTERO DE LA β -GLUCURONIDASA.....	88
VI- 1. Estrategia general.....	88
VI- 2. Fusión de la región -1300+10 del gen <i>Lhcb1*2</i> al gen reportero de la β -glucuronidasa.....	90
VI- 3. Obtención de plantas de tabaco transgénicas para los estudios de regulación de la expresión.....	92
VI- 4. Análisis de las plantas transformadas.....	96
a) Ensayo de la actividad GUS.....	96
b) Análisis por "Southern blot".....	100

c) Análisis por PCR.....	100
VI- 5. Análisis de la herencia de la construcción: promotor -1300+10/GUS en la progenie T2.....	103
VI- 6. Estudio de la expresión específica de órgano del promotor -1300+10/GUS.....	106
VII- SEÑAL DEL CLOROPLASTO PARA LA EXPRESION DE LOS GENES <i>Lhc</i> . ESTUDIOS EN LAS PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO.....	112
VII- 1. Efecto del Norflurazon sobre la expresión del gen <i>Lhcb1*2</i> de papa en las plantas transgénicas de tabaco.....	112
VII- 2. Estudio de la expresión temporal del gen <i>Lhcb1*2</i> de papa a partir de la germinación de las semillas.....	117
VIII- ESTUDIO DE LA EXPRESION INDUCIDA POR LA LUZ EN LAS PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO.....	119
VIII- 1. Expresión mediada por el fotoreceptor fitocromo.....	119
VIII- 2. Estudio de la expresión mediada por el receptor de luz azul.....	124
IX- ESTUDIOS CON EL PROMOTOR DELECCIONADO FUSIONADO AL GEN GUS EN PLANTAS DE TABACO TRANSGENICAS.....	126
IX- 1. Fusión de la región -690+10 del gen <i>Lhcb1*2</i> de papa al gen reportero <i>uidA</i> y transformación de plantas de tabaco.....	126
IX- 2. Actividad GUS de las plantas de tabaco transformadas con el promotor entero ó deleccionado.....	128
IX- 3. Expresión específica de órgano y regulación mediada por el fitocromo.....	131
DISCUSION	139

CONCLUSIONES FINALES.....147

BIBLIOGRAFIA.....151

INTRODUCCION

INTRODUCCION

I- LA LUZ EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS.

I- 1. Aspectos generales.

La luz es el factor del ambiente más importante que interviene en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La radiación incidente no solo es usada como fuente de energía para la fotosíntesis sino que también constituye una señal que utilizan las plantas para optimar su desarrollo en respuesta a las condiciones del medio. El efecto de la luz en el desarrollo es más marcado en las plantas jóvenes que en las plantas adultas. Por ejemplo como se puede ver en la Figura 1A, plantas de seis días cultivadas en presencia de luz muestran un hipocótilo corto y cotiledones abiertos y expandidos. Estas plántulas poseen hojas con cloroplastos fotosintéticamente activos. Este patrón de desarrollo es conocido como fotomorfogénesis. En ausencia de luz, la fotomorfogénesis esta reprimida y las plantas muestran un desarrollo distinto. Como se ve en la Figura 1B, las plántulas crecidas en la oscuridad tienen un hipocótilo largo y cotiledones no desarrollados (pequeños y cerrados). Estas plantas poseen etioplastos y presentan una diferenciación celular tardía. El proceso que sucede en las plantas germinadas en la oscuridad se conoce como etiolación.

Por lo tanto, las plantas superiores están genéticamente dotadas para seguir dos estrategias diferentes de desarrollo dependiendo de las condiciones de luz del ambiente: fotomorfogénesis o "skotomorphogenesis", siendo esta última la estrategia de desarrollo seguida en la oscuridad (Mohr *et al*, 1983; Deng, 1994). El aspecto tan distinto entre las plantas crecidas a la luz y aquéllas desarrolladas en la oscuridad, es consecuencia de la gran diferencia en la expresión génica que presentan ambos tipos de desarrollo.

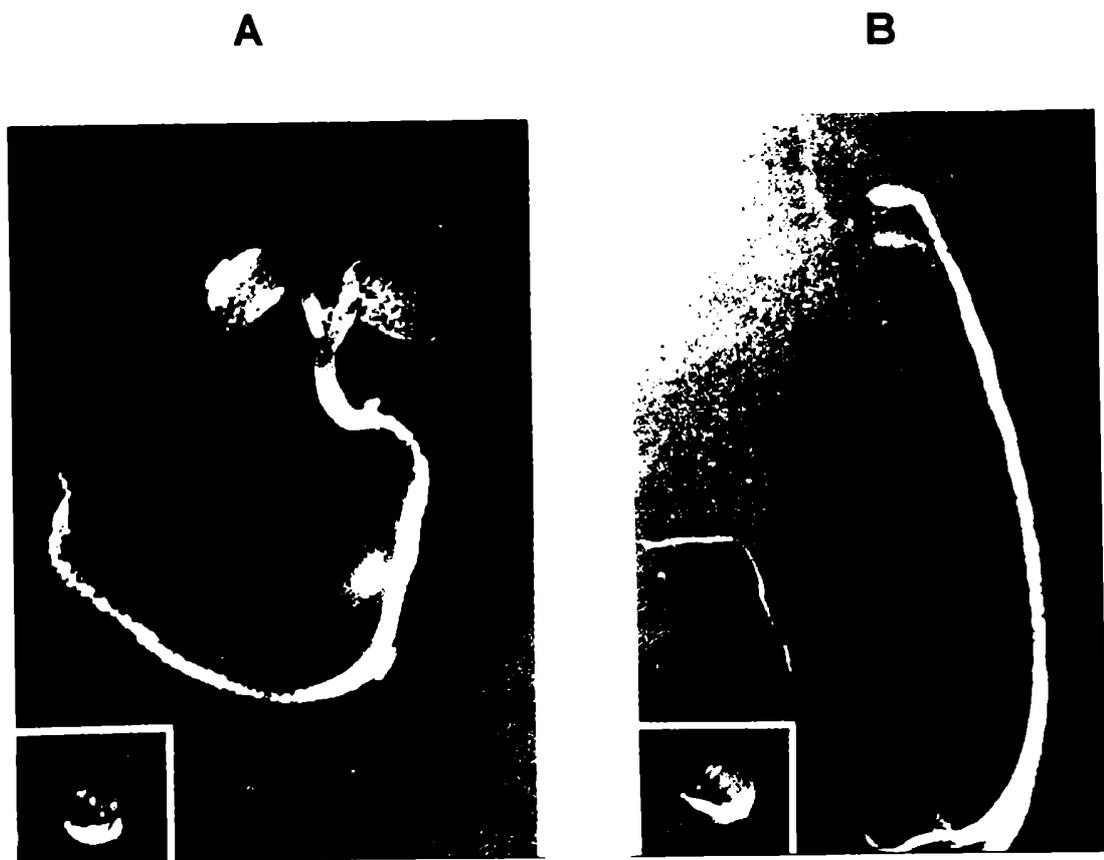


Figura 1. Plántulas de *Arabidopsis* de seis días cultivadas: **A)** en presencia de luz y, **B)** en total oscuridad. Los patrones morfológicos son claramente distintos en los últimos estadios del desarrollo de las plántulas. Abajo, a la izquierda de cada panel se observa que la morfología de las plántulas es casi idéntica hasta las 36 hs a partir de la germinación de las semillas (Deng, 1994).

Al menos tres familias de fotoreceptores median la percepción y traducción de esta señal del ambiente que constituye la luz: los fitocromos que perciben la luz roja (600-700 nm) y el rojo lejano (700-800nm), los receptores de luz azul y UV-A (340-380 nm) y los fotoreceptores UV-B (< 340 nm). Estos fotoreceptores constantemente sensan la luz con respecto a la longitud de onda, intensidad, duración y dirección. Las señales luminosas percibidas y traducidas por los diferentes fotoreceptores regulan en forma coordinada la transcripción de genes específicos (Gilmartin *et al*, 1990). Se observó que la transcripción de algunos genes nucleares, muchos de los cuales están involucrados en la fotosíntesis era inducida en plantas expuestas a la luz. Este es el caso del gen que codifica la pequeña subunidad de rubisco (*rbcS*), el gen que codifica la ferredoxina tipo A (*fedA*), la chalcona sintetasa (*chs*) y la nitrato reductasa (*nia*) (Chory *et al*, 1989). Dentro de este grupo también se hallan los genes *Lhc* o *Cab* que codifican polipéptidos que se unen a la clorofila *a* y *b* y que forman parte de las antenas que captan la luz para la fotosíntesis. Interesados en los efectos de la luz mediados por los distintos fotoreceptores, nosotros estudiamos la estructura y regulación de la expresión de los genes *Lhc* en plantas de papa (*Solanum tuberosum*). Para otros genes como ser el caso del gen que codifica el fitocromo tipo A (*phyA*), la transcripción se reprime al exponer las plantas a la luz. También hay genes codificados en el genoma de los plástidos cuya expresión es inducida por la luz. Este es el caso de la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (*rbcL*) y del gen *psbA* que codifica una proteína de 32 kD que forma parte del fotosistema II.

Se han caracterizado secuencias dentro de los promotores de algunos de estos genes, las cuales estarían relacionadas a la regulación mediada por la luz (Dehesh *et al*, 1990). En el caso del promotor de la pequeña subunidad de rubisco, se pudieron caracterizar y aislar factores proteicos que interactúan con algunas de estas secuencias (Gilmartin *et al*, 1990). Sin embargo poco se conoce acerca de la señal de traducción mediada por estos fotoreceptores, y como los mismos controlan las respuestas de crecimiento y desarrollo regulada a través de la expresión génica.

I- 2. Los fitocromos.

En la década del '50 Borthwick *et al* (1952), observaron que la inducción de la germinación por la luz roja (R) podía ser revertida mediante una breve exposición a luz roja lejana (RL), aplicada esta última inmediatamente después del primer tratamiento. Postularon que dicho comportamiento se debía a la existencia de un fotoreceptor capaz de fotoconvertirse reversiblemente entre dos estados. Posteriormente se descubrieron muchas otras respuestas que presentaban una reversibilidad R/RL similar y la molécula responsable de tal efecto resultó ser el fitocromo. Actualmente se conocen una variedad de efectos de la luz mediados por el fitocromo. Si bien varias de las respuestas mediadas por el fitocromo no presentan reversibilidad R/RL, cuando la misma es demostrada se considera que es un efecto mediado por este fotoreceptor.

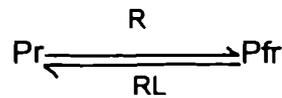
Los fitocromos son los fotoreceptores de las plantas mejor caracterizados. Están localizados en el citoplasma de las células vegetales. Son dímeros compuestos por dos polipéptidos de 125 kD, cada uno de los cuales lleva unido covalentemente en el extremo N-terminal un cromóforo lineal tetrapirrólico, llamado fitocromobilina. La dimerización ocurre a través del extremo C-terminal.

Evidencias bioquímicas indican que habría al menos dos tipos de fitocromos: el tipo I y el II. El tipo I se acumula a niveles altos en plantas desarrolladas en la oscuridad. Por lo tanto, las respuestas del fitocromo tipo I están principalmente involucradas en los procesos de desetiación de plantas etioladas. Este fitocromo se encuentra en una proporción mucho menor en los tejidos verdes, debido a que es lábil a la luz. El fitocromo tipo II es estable a la luz, y se encuentra a niveles bajos tanto en tejidos verdes como en los etiolados.

En las plantas superiores, los fitocromos están codificados por una familia de genes nucleares. En *Arabidopsis* la apoproteína está codificada por cinco genes: *phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyD* y *phyE* (Sharrok *et al*, 1989; Clarck *et al*, 1993). Los tres primeros presentan un 50% de identidad en sus secuencias de aminoácidos. El gen *phyE* es distinto a los demás, en cambio, *phyD* es muy similar a *phyB*. Es posible que las distintas variantes del fitocromo actúen en diferentes lugares o en distintos estadios del desarrollo de las plantas mediando muchas respuestas

reguladas por la luz roja. Recientemente se ha demostrado que los fitocromos tipo I y II están codificados por los genes *phyA* y *phyB* respectivamente (Parks *et al*, 1993; Reed *et al*, 1993).

Los fitocromos existen en dos formas fotoconvertibles: la forma denominada Pr que absorbe luz roja (pico de absorción a 660 nm) y la forma denominada Pfr que absorbe luz roja lejana (pico de absorción a 730 nm). Los fitocromos son sintetizados "*in vivo*" como la forma Pr. Al absorber luz roja, Pr es transformado en Pfr, mientras que la absorción de luz roja lejana por Pfr lo convierte en Pr. Es posible esquematizar la fotoconversión de la siguiente manera:



Es generalmente aceptado que Pfr es la forma biológicamente activa ya que es la responsable de iniciar una cascada de señales que llevan finalmente a las respuestas en el desarrollo. No se sabe cómo los cambios conformacionales inducidos por la luz en la molécula de fitocromo es traducida a los componentes celulares. Las diferencias espectrales entre Pr y Pfr se deben a diferencias del cromóforo (isómero 15 E y 15 Z, respectivamente). Ni la apoproteína, ni el cromóforo solos muestran funciones fisiológicas fotoreversibles. Los cambios producidos en la conformación del cromóforo, producen cambios conformacionales en la apoproteína que a su vez interacciona con algún componente celular.

Entre los procesos regulados por el fitocromo se encuentran la germinación, la floración, la desetiolación, etc. La inhibición de la elongación del hipocótilo es parte del proceso de desetiolación.

I- 3. Los receptores de luz azul y ultravioleta.

La luz azul juega un rol muy importante en la expresión de distintos genes. Muy poco se conoce acerca del receptor (o receptores) de luz azul y de la ruta de traducción de la señal. Los receptores de luz azul median efectos tales como el

fototropismo, la elongación del hipocótilo y la apertura de los estomas (Kaufman, 1993). Se demostró que mutaciones en el locus *hy4* en *Arabidopsis* afectan específicamente la sensibilidad a la luz azul, lo cual se pone de manifiesto mediante la inhibición de la elongación del hipocótilo. El locus *hy4* codifica una proteína soluble de 681 aminoácidos, la cual podría ser un potencial receptor de luz azul (Ahmad *et al*, 1993). Esta proteína contiene dos regiones características para la unión de cromóforos que absorben luz azul (flavinas).

Otros estudios han demostrado que en una gran variedad de plantas, existe una proteína de la membrana plasmática de 120 kD que es específicamente fosforilada ante una breve exposición a luz azul (Kaufman, 1993). Esta proteína podría constituir otro receptor de luz azul o bien, podría formar parte de la cadena de traducción de la señal luminosa responsable del fototropismo de las plantas.

La señal de traducción de la luz azul es probablemente compleja puesto que son raras las respuestas que se deben exclusivamente a la luz azul. Son más comunes las respuestas a la luz azul que involucran una coacción del receptor azul y el fitocromo (Oelmüller *et al*, 1985). Se piensa que el receptor de luz azul establece una respuesta a través de Pfr, modulando el rango de su respuesta.

Poco se conoce acerca de los receptores de luz ultravioleta, aunque las evidencias sugieren la existencia de al menos dos: UV-A y UV-B.

I- 4. Traducción de la señal luminosa al núcleo de la célula vegetal y regulación de la expresión génica.

La percepción de la señal luminosa por los fotoreceptores activaría una vía de señales que llevan a cambios en la expresión de ciertos genes. La existencia de múltiples familias de fotoreceptores sugiere que el proceso de traducción de la señal luminosa es complejo. El hecho de que mutaciones de fotoreceptores específicos produzcan fenotipos distintos, sugiere que debe haber pasos específicos en el camino de traducción de las señales. Por otra parte, algunos procesos tales como el desarrollo de las plántulas, requiere la acción de múltiples fotoreceptores.

Se sabe que el fitocromo fotoactivado no se transloca al núcleo para unirse a los promotores de los genes "target". Existen intermediarios que transmiten la información desde este fotoreceptor hasta el genoma. Estudios recientes han indicado que las proteínas G, el sistema Ca^{2+} -calmodulina y la guanosina 5'-fosfato cíclica (GMPc) mediarían las respuestas inducidas por el fitocromo (Bowler *et al*, 1994a; Neuhaus *et al*, 1993). Se ha sugerido que el fitocromo activaría una o más proteínas G triméricas, las cuales estimulan aumentos celulares de GMPc y Ca^{2+} , lo cual activaría otros componentes que inducen los cambios en la expresión génica (Bowler *et al*, 1994a; Millar *et al*, 1994). La Figura 2 muestra un esquema de cómo se traduciría la señal luminosa a través del fitocromo.

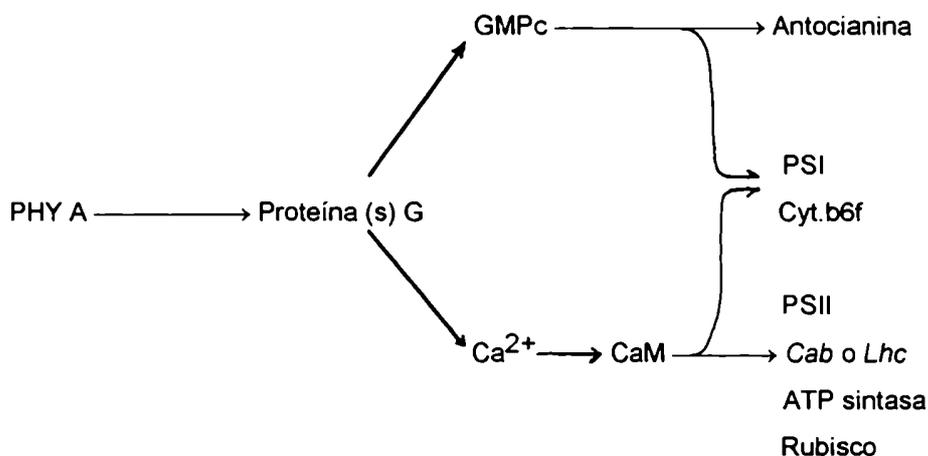


Figura 2. Modelo de las rutas de traducción de las señales del fitocromo (Bowler *et al*, 1994a). PHY A: fitocromo A, CaM:calmodulina, PSI: fotosistema I, PSII: fotosistema II.

En este modelo, Pfr activa una o más proteínas G triméricas. Luego, la cascada de señales se divide. En un caso el aumento de Ca^{2+} citosólico activa la calmodulina (CaM), lo cual resultaría en la activación de quinasas y fosfatasa que transmitirían la señal al núcleo. Esta señal induce la transcripción de genes estructurales del fotosistema II (PSII), de los genes *Lhc* o *Cab*, del gen que codifica la ATP sintasa y

del gen que codifica la pequeña subunidad de rubisco. En una segunda rama la guanilato ciclasa es activada, lo que lleva a aumentos en los niveles de GMPc. El GMPc actuaría a través de quinasas para activar los genes involucrados en la biosíntesis de antocianina. En algún punto las señales de las dos ramas convergen para estimular la expresión de genes que codifican componentes del fotosistema I (PSI) y componentes del complejo citocromo b6f. El resultado es la inducción de genes que responden a la luz roja, la formación de cloroplastos y la producción de antocianina.

No está claro cómo la señal se traduce desde el fitocromo que es un fotoreceptor soluble citoplasmático, a las proteínas G las cuales se hallan normalmente asociadas a la membrana plasmática. Por otra parte puesto que todos los componentes son citoplasmáticos, tampoco está claro cómo la señal se traduce al núcleo para regular la expresión de estos genes. Hay evidencias que sugieren que en la cadena de traducción mediada por el fitocromo ocurrirían eventos de fosforilación de proteínas. Recientemente se comprobó que un factor proteico denominado GBF ("G-box binding factor"), el cual se une a los llamados motivos "G" que se hallan en los promotores de muchos genes regulados por la luz, se transloca al núcleo en presencia de luz. En células que se hallan en la oscuridad GBF permanece en el citoplasma. La translocación al núcleo de GBF es el resultado de la fosforilación de ese factor, proceso inducido por la luz (Harter *et al*, 1994).

Estudios genéticos indican que las rutas de señales de traducción del fitocromo y de la luz azul convergen en intermediarios comunes (Chory, 1993). Diversos resultados han sugerido que las proteínas G triméricas también están involucradas en la expresión de genes modulada por la luz azul (Kaufman, 1993). Se vio que la actividad GTPasa podía ser específicamente modulada por la luz azul en preparaciones de membrana plasmática. Una proteína G trimérica, presente en la membrana sería la responsable de esta actividad GTPasa. Aunque estas evidencias apoyan la participación de las proteínas G en las señales del fitocromo y de la luz azul, no se sabe si serían las mismas o distintas proteínas las que

estarían involucradas. La cadena de traducción de la luz azul sería compleja y tendría puntos en común con la del fitocromo.

Los genes *Lhc* o *Cab* cuya estructura y regulación de la expresión he estudiado, codifican proteínas que se unen a la clorofila a, clorofila b y carotenos formando parte del sistema que capta la luz para la fotosíntesis. Por lo tanto, en el siguiente capítulo de esta "Introducción", se hace una breve descripción del proceso de la fotosíntesis.

II - FOTOSÍNTESIS.

II- 1. Aspectos generales de la fotosíntesis.

En la fotosíntesis se pueden distinguir dos etapas: una reacción dependiente de la luz (etapa fotoquímica) y una reacción oscura (ciclo de Benson-Calvin). En la etapa fotoquímica, la luz es convertida en energía química dando como resultado la formación de ATP y NADPH. Posteriormente, los productos generados son utilizados en la síntesis de azúcares de seis carbonos (almidón y sacarosa) a partir de CO₂ y H₂O. Todas las reacciones que involucran la formación de NADPH, ATP y almidón ocurren en el cloroplasto. La etapa fotoquímica se produce en las membranas tilacoides de los cloroplastos mientras que la fijación de CO₂ y formación de almidón se producen en el estroma del cloroplasto. Las enzimas que forman sacarosa a partir de moléculas precursoras de tres carbonos se encuentran en el citosol de la célula vegetal.

Durante la fotosíntesis, la luz es atrapada por 200 a 300 moléculas de clorofila las cuales transfieren la energía luminosa absorbida a un par especial de clorofilas que se hallan en el centro de reacción. Estos pares especiales de clorofilas del fotosistema I y II son los principales dadores de electrones que manejan la conversión de la luz en energía química, a ser convertida en NADPH y ATP. Las

moléculas de clorofila que captan la luz y que transmiten esta energía al centro de reacción forman parte de los **sistemas colectores de luz** o **antenas**. De esta manera, los fotones absorbidos por muchas clorofilas son dirigidos hacia el centro de reacción donde se transformarán en energía química. El resultado inmediato de la absorción de la luz es una separación de cargas a través de la membrana tilacoide: un electrón es transportado a un aceptor de electrones sobre la superficie de la membrana tilacoide que esta en contacto con el estroma, dejando una carga positiva sobre el dador de electrones localizado en la superficie luminal de la membrana. De este modo, la energía luminosa (fotón) se convierte en energía química porque se produce una molécula de un oxidante (dador electrónico oxidado) y una molécula de un receptor (aceptor electrónico reducido).

El transporte de electrones desde el agua al NADP^+ requiere de la participación de tres complejos multiproteicos que atraviesan la membrana tilacoide: el fotosistema II (PSII), el complejo citocromo b/f y el fotosistema I (PSI). Estos complejos están ligados uno con otro a través de la movilidad lateral de la plastoquinona (PQ) y plastocianina (PC). Como lo esquematiza la Figura 3, la absorción de la luz por el fotosistema II (PSII) hace que los electrones se muevan hacia una molécula aceptora sobre la superficie de la membrana tilacoide que mira hacia el estroma. El dador de electrones positivamente cargado saca electrones del H_2O para formar O_2 y protones, los cuales se acumulan en el lumen tilacoide. Luego los electrones se mueven a través de una serie de transportadores hacia dadores de electrones sobre la superficie luminal de los tilacoides de un segundo centro de reacción, el fotosistema I (PSI). Durante este movimiento, protones adicionales son bombeados a través de la membrana tilacoide hacia el lumen. El PSI usa la energía luminosa absorbida para transferir los electrones a un aceptor sobre la superficie del estroma. Luego los electrones son transferidos al último aceptor de electrones, el NADP^+ , para formar NADPH. Los protones acumulados en el lumen tilacoide resultantes del transporte de electrones, crean un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana tilacoide. Esta fuerza motriz de protones es la fuente de energía para la producción de ATP. Los protones se mueven a través del complejo CF_0CF_1 produciendo la formación de ATP a partir de ADP y Pi.

Por lo tanto el proceso de la fotosíntesis puede ser subdividido en tres estadios, cada uno de los cuales se produce en un área definida del cloroplasto:

1) La absorción de la energía luminosa es el primer paso esencial en la fotosíntesis. La luz es atrapada por la clorofila y utilizada para remover electrones y protones del H_2O para formar O_2 . Luego los electrones subsecuentemente son transferidos a través de la membrana tilacoide al último aceptor de electrones, el $NADP^+$, formando en el estroma el compuesto reducido, NADPH. El movimiento de electrones esta acoplado al transporte de protones a través de la membrana desde el estroma al lumen tilacoide. Todas estas reacciones son catalizadas por proteínas localizadas en la membrana tilacoide.

2) Los protones se mueven desde el lumen tilacoide hacia el estroma a través del complejo CF_0CF_1 que acopla el movimiento de electrones a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i .

3) El ATP y NADPH fijan CO_2 y generan azúcares de seis carbonos.

II- 2. Estructura y función de los fotosistemas I y II.

Los dos fotosistemas en los cloroplastos absorben luz de diferentes longitudes de onda y ambos son esenciales para la fotosíntesis. El PSI absorbe luz de 700 nm o menos, mientras que el PSII absorbe luz de longitud de onda más corta (< 680 nm). Por otra parte ambos fotosistemas poseen distinta localización dentro de la membrana tilacoide de los cloroplastos. El 75-80% del PSII se encuentra en las regiones apiladas de los tilacoides (granatilacoides), mientras que el PSI se localiza preferentemente en las membranas tilacoides no apiladas (estromatilacoides). El citocromo b/f que es usado para transferir los electrones entre los dos fotosistemas se encuentra en ambas zonas de la membrana (Figura 3).

Cada fotosistema posee varios cientos de moléculas de clorofila. Sin embargo, solo dos moléculas de clorofila a de los centros de reacción, llamadas P_{680} en el PSII y P_{700} en el PSI respectivamente, son capaces de sufrir la transferencia de electrones provocada por la luz en cada complejo. Estas moléculas de clorofila a

están unidas a proteínas integrales de membrana junto con las cuales constituyen los centros de reacción.

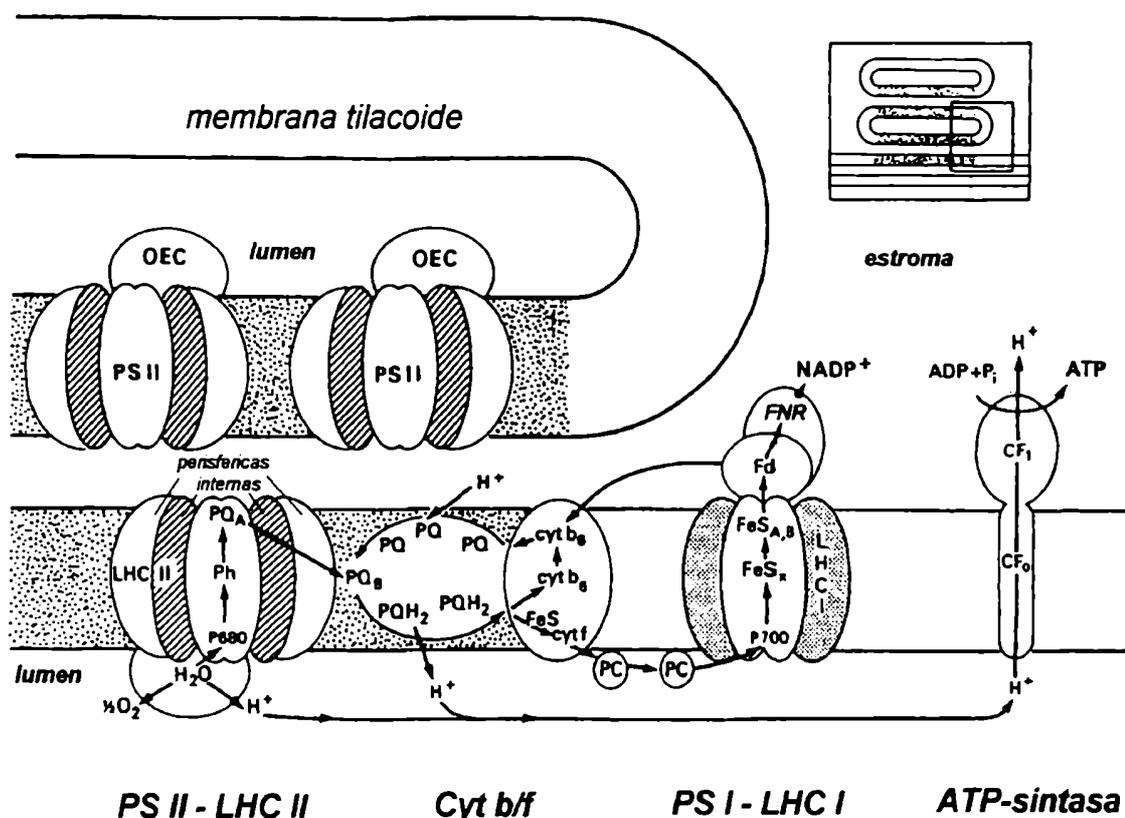


Figura 3. Organización de los componentes de la membrana tilacoide que participan en la captación de la luz para la fotosíntesis y en la transferencia de electrones. También se muestra la ATP sintasa que interviene en la translocación de protones. El fotosistema I (PSI) y la ATP sintasa están localizados en las regiones no apiladas de la membrana tilacoide, mientras que la mayor parte de los complejos del fotosistema II (PSII) y sus antenas colectoras de luz (LHCII) se hallan en las regiones apiladas de los tilacoides. Los complejos citocromo b/f ($cyt\ b_6$, $cyt\ f$) se distribuyen al azar. Las flechas representan el flujo de electrones y el transporte de protones. P680: centro de reacción del PSII; P700: centro de reacción del PSI; Ph: feofitina; PQ_A y PQ_B : quinonas; PQ: plastoquinona; PC: plastocianina; Fd: ferredoxina; FNR: ferredoxin-NADP reductasa; OEC: complejo productor de oxígeno (Anderson *et al*, 1988).

Una estructura llamada **complejo colector de luz** o **LHC** ("light-harvesting complex") forma parte de cada fotosistema y la función principal del mismo es capturar la energía luminosa y transferirla al PSI o PSII.

Estructura del fotosistema II (PSII):

El fotosistema II es una estructura de transmembrana de más de 10 polipéptidos que interviene en la transferencia de electrones, conducida por la luz, desde el agua a la plastoquinona. El fotosistema II consiste del centro de reacción, los complejos colectores de luz ó LHC ("Light Harvesting Complexes"), y un complejo productor de oxígeno. El centro de reacción consta de las proteínas: D1, D2 y del citocromo b559. D1 y D2 unen en conjunto al menos cuatro clorofilas a, dos feofitinas, dos quinonas y un hierro. La primera separación de cargas en el PSII es mediada por un dímero de clorofila. Las otras clorofilas asociadas a D1 y D2 sirven como antenas para captar la luz y facilitar la transferencia de electrones. Además de los complejos colectores de luz ó LHC, cuya estructura se detallará posteriormente, el PSII posee una antena interna formada por varias moléculas de clorofila a unidas a las proteínas CP43 y CP47. La antena interna como su nombre lo indica, se halla localizada más cerca del centro de reacción que el LHC. Aunque no se conoce el rol fisiológico de CP43 y CP47 existen evidencias que sugieren que ambas proteínas son necesarias para que se forme el PSII (Bennoun *et al*, 1986).

a) Transporte electrónico desde el agua al fotosistema II.

La absorción de luz de longitud de onda menor de 680 nm por el PSII genera la pérdida de un electrón de las moléculas de clorofila a del centro de reacción P₆₈₀. Como lo esquematiza la Figura 3, el electrón es transportado hacia la superficie de la membrana tilacoide que mira hacia el estroma a través de una feofitina, una quinona (Q_A) y un átomo de Fe hacia el último aceptor de electrones, otra quinona (Q_B). Los electrones para la reducción de P₆₈₀ son obtenidos a partir de una molécula de H₂O por medio del complejo generador de oxígeno localizado en la

superficie luminal de la membrana tilacoide. Los electrones del H_2O son transferidos al centro de reacción P_{680} a través del residuo de tirosina 161 del polipéptido D1 (Z), regenerando así la clorofila reducida en el lumen tilacoide. Los electrones separados de P_{680} son transportados al último aceptor, la plastoquinona (PQ) que se encuentra en la membrana tilacoide del lado del estroma.

b) Transporte electrónico desde el fotosistema II al fotosistema I.

Los electrones liberados del PSII rápidamente se combinan con una molécula de PQ y con dos protones del estroma, para producir la hidroquinona reducida (PQH_2) (Figura 3). Luego, los electrones de la PQH_2 son transferidos al complejo citocromo b/f. Por cada electrón transportado de la PQH_2 al complejo citocromo b/f, dos protones son transportados por la PQH_2 desde el estroma hacia el lumen tilacoide. Desde el complejo citocromo b/f, los electrones se mueven al transportador plastocianina (PC). La plastocianina es una proteína periférica que es soluble en el lumen de los tilacoides. Con su electrón, la PC difunde en el lumen tilacoide desde el complejo citocromo b/f al PSI. De este modo, transportadores de electrones móviles (tales como la PQ y PC) son usados para transferir los electrones entre los PSII y PSI puesto que estos fotosistemas no están uniformemente distribuidos en las membranas tilacoides.

c) Transporte electrónico desde el fotosistema I al $NADP^+$.

El fotosistema I es un complejo de membrana compuesto de por lo menos 13 polipéptidos. La luz es capturada por el complejo colector de luz llamado LHCI y luego los fotones se dirigen al centro de reacción. El centro de reacción P_{700} esta formado por las proteínas PSIA y PSIB asociadas a un par de moléculas de clorofila a . La absorción de un fotón lleva a la remoción de un electrón de la clorofila del centro de reacción del PSI. La clorofila oxidada puede ser reducida por un electrón del PSII a través de la PC (Figura 3). El electrón activado es movido hacia la superficie del estroma de la membrana tilacoide, donde es aceptado por la ferredoxina (Fd). Varios transportadores de electrones intervienen entre P_{700} y la ferredoxina. Los electrones junto con un protón pueden ser transferidos a través

del transportador de electrones FNR (ferredoxin-NADP reductasa) al NADP^+ para formar una molécula reducida NADPH. Este proceso es denominado flujo lineal de electrones.

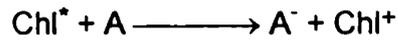
Por lo tanto, el PSI transfiere electrones al NADP^+ , formando NADPH. El PSII remueve electrones del H_2O , mientras que el complejo citocromo b/f transfiere electrones desde el PSII al PSI.

II- 3. Pigmentos que absorben la luz : Clorofilas y carotenoides.

Clorofilas:

La clorofila a es el principal pigmento involucrado en la fotosíntesis y se encuentra en todos los eucariotes fotosintéticos y en las cianobacterias. La clorofila es una molécula asimétrica que posee una región hidrofílica con cuatro anillos pirrólicos (designados I a IV), unidos entre sí formando una porfirina con un átomo de magnesio en el centro (Figura 4A). El anillo IV está esterificado con una larga cadena hidrofóbica (fitol). La clorofila a tiene un grupo metilo en la posición 3. Las plantas superiores y las algas poseen también clorofila b, la cual tiene un grupo aldehído en lugar del grupo metilo. La clorofila b es un pigmento que absorbe diferentes longitudes de onda que las absorbidas por la clorofila a.

Cuando la clorofila es irradiada con luz de longitud de onda 650-700 nm absorbe la energía luminosa y un electrón de la molécula es momentáneamente elevado a un orbital con un nivel energético superior. Se dice que la clorofila está excitada. La diferencia de energía entre los dos orbitales es precisamente la energía del fotón absorbido. Cuando esta energía es liberada la molécula retorna a su estado original no excitado. La transferencia de energía entre las clorofilas que forman parte de los *sistemas colectores de luz* o *antenas*, ocurre por interacciones electromagnéticas y es muy rápida, siendo del orden de picosegundos. Sin embargo en las clorofilas localizadas en el centro de reacción, el electrón en el orbital de mayor energía es transferido a un aceptor (A), formando un aceptor negativamente cargado (A^-) y una clorofila positivamente cargada:



El aceptor A^- , con su electrón extra de alta energía, es un agente reductor potente capaz de transferir el electrón a otras moléculas. La Chl^+ es un potente oxidante que puede remover electrones de otras moléculas para regenerar la clorofila original. En las plantas, la fuerza oxidante de cuatro moléculas de Chl^+ es usada, por medio de intermediarios, para remover cuatro electrones del H_2O y formar O_2 .

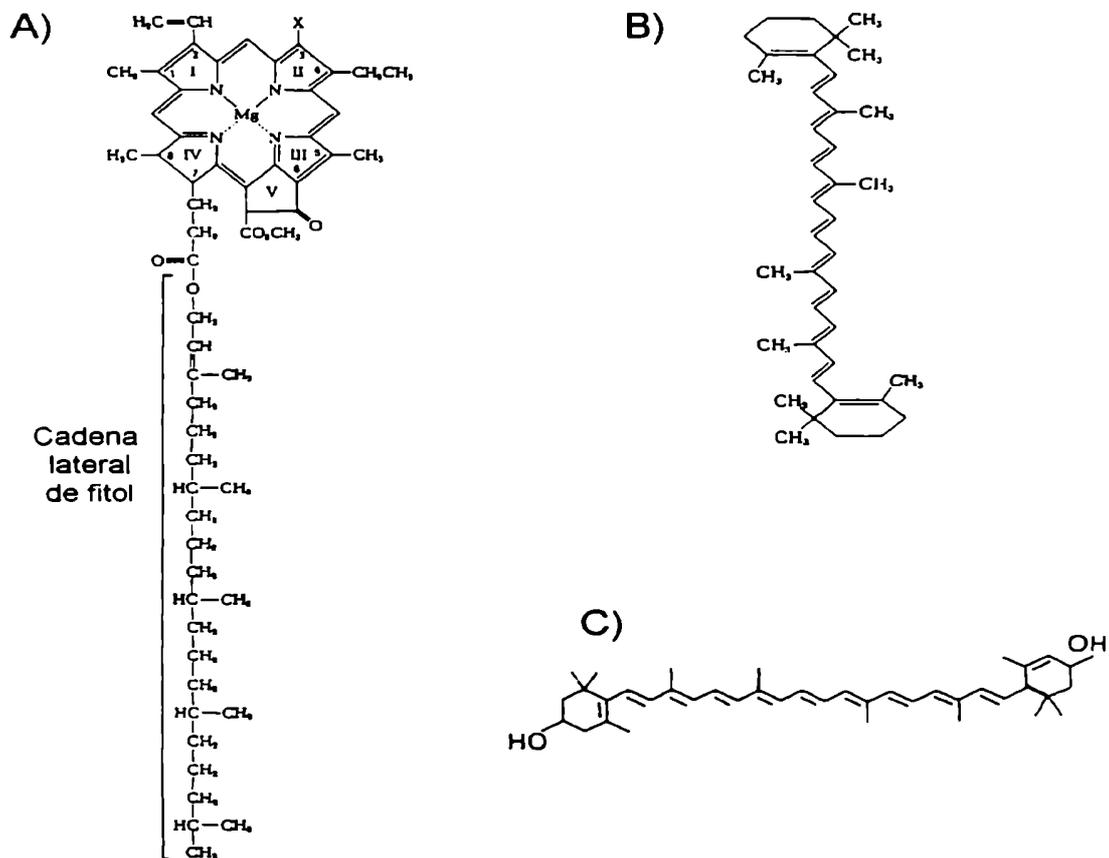


Figura 4. A) Estructura de la clorofila. En la clorofila a, X= -CH₃; en la clorofila b, X= -CHO. B) Estructura del β-caroteno. C) Estructura de la luteína.

Carotenoides:

Otros pigmentos importantes en la fotosíntesis son los carotenoides. Estos absorben longitudes de onda correspondientes a la región azul del espectro (400 a 600 nm). Los carotenoides son poliisoprenoides que poseen dobles enlaces conjugados. Cada extremo de la molécula contiene un anillo de ciclohexeno sustituido insaturado. Existen dos clases principales de pigmentos carotenoides en los cloroplastos: los carotenos que son hidrocarburos isoprenoides y no contienen oxígeno, y las xantófilas, que son muy semejantes en su estructura pero contienen oxígeno en sus anillos terminales. La estructura del β -caroteno, el caroteno más abundante, y de la luteína, que es una xantófila se muestran en la Figura 4B y 4C respectivamente. Estos y otros pigmentos localizados en la membrana tilacoide vierten la energía absorbida a la clorofila *a* y extienden así el rango de luz que puede ser absorbido y usado en la fotosíntesis.

Además de la función de colectar la luz, los carotenoides son esenciales en el proceso de fotoprotección. En su ausencia las plantas sufren severos daños fotooxidativos. El mecanismo más probable de fotoprotección es el de "quenching" por los carotenoides de los tripletes de clorofila que de otra forma llevarían a la generación de singletes de oxígeno que pueden reaccionar con lípidos, proteínas y otras macromoléculas, causando un daño celular irreparable.

II- 4. Fijación de CO₂.

La enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (rubisco) fija el CO₂ a la ribulosa-1,5-bifosfato (azúcar de cinco carbonos) para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Esta reacción ocurre en el estroma de los cloroplastos. La fijación de seis moléculas de CO₂ y la formación de dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato requiere que se consuman 18 ATP y 12 NADPH generados durante la etapa fotoquímica de la fotosíntesis. El gliceraldehído-3-fosfato es transportado desde el cloroplasto al citosol donde ocurren los pasos finales que llevan a la formación de sacarosa. Parte del gliceraldehído-3-fosfato queda en el estroma del cloroplasto y a partir de este se regenera ribulosa-1,5-bifosfato.

La enzima rubisco es muy abundante en los cloroplastos, constituyendo el 50% de la proteína total de esta organela. Esta enzima esta formada por dos subunidades: una subunidad grande codificada por el genoma del cloroplasto (*rbcL*), y una subunidad pequeña codificada por el DNA nuclear (*rbcS*). Estudios del gen *rbcS* mostraron que su expresión es regulada por la luz a través del fitocromo y del receptor de luz azul. También se observó que su expresión es específica de tejido (Gilmartin *et al*, 1990).

III- PROTEINAS QUE SE UNEN A LA CLOROFILA A Y B: POLIPEPTIDOS CAB.

Las proteínas que se unen a la clorofila a y b se denominan **CAB** ("Chlorophyll a/b binding proteins"). Los polipéptidos CAB forman parte de los complejos colectores de luz conocidos como **LHC** ("Light Harvesting Complexes"). Estos complejos rodean los centros de reacción del PSI y PSII, conociéndose pues como **LHCI** y **LHCII** respectivamente. Debido a que estos sistemas colectores de luz están algo más alejados de los centros de reacción que lo que lo están las antenas internas, se los conoce como **antenas periféricas**.

Los polipéptidos CAB constituyen una gran familia, poseen tamaño similar y muchos comigran en geles de poliacrilamida. Las masas moleculares aparentes (absoluta y relativa) son dependientes de la especie de planta usada. Como todos los polipéptidos CAB tienen homología de secuencia, anticuerpos contra cualquiera de ellos típicamente muestra reacción cruzada con otros miembros de la familia.

Los polipéptidos CAB son sintetizados en ribosomas libres en el citoplasma, importados al cloroplasto e insertados en la membrana tilacoide. La translocación esta mediada por el extremo N-terminal de los polipéptidos, el péptido de tránsito, el cual es clivado durante el pasaje hacia el interior del cloroplasto por una

peptidasa presente en el estroma. Posteriormente se insertan en la membrana tilacoide (Yuan *et al*, 1993; Hoffman *et al*, 1994).

Los polipéptidos CAB, a diferencia de las proteínas que solo unen clorofila *a*, no unen β -caroteno sino que unen otro tipo de carotenoides, siendo los principales la luteína y neoxantina.

Estos polipéptidos están codificados en el núcleo y los genes que los codifican son conocidos como *Lhc* ó *Cab* (Green *et al*, 1991; Jansson, 1994). Según la nueva nomenclatura los genes *Lhc* que codifican los polipéptidos relacionados con el LHCI, son denominados ***Lhca***. Los genes que codifican polipéptidos que forman parte del LHCII, son denominados ***Lhcb***. Esta nueva nomenclatura va seguida de un número, el cual indicaría el "tipo" de polipéptido CAB codificado por dicho gen.

IV- ANTENAS PERIFERICAS DEL FOTOSISTEMA I Y II.

IV- 1. Antenas periféricas del fotosistema I: LHCI.

Alrededor de 200 moléculas de clorofila están asociadas al PSI, de las cuales 90 se encuentran en el centro de reacción y 120 estarían asociadas a la antena periférica de este fotosistema, conocida como LHCI ("Light harvesting complex I"). El LHCI contiene clorofila *a* y *b*, la cual representa cerca de un 20% del total de la clorofila de las membranas tilacoides (Thornber *et al*, 1993). Se pueden distinguir dos subpoblaciones de complejos colectores de luz del PSI, que fluorescen a distintas longitudes de onda lo que sugiere que tienen diferente organización de las clorofilas: el LHCI-680 (ó LHCIa) y el LHCI-730 (ó LHCIb). Si bien los roles de LHCI-680 y LHCI-730 no están claros, parece que LHCI-680 es esencial para la transferencia de energía desde el LHCII al centro de reacción del PSI (Bassi *et al*, 1987b). El complejo LHCI-680 posee dos tipos de polipéptidos CAB, codificados por los genes *Lhca2* y *Lhca3* (Ikeuchi *et al*, 1991; Knoetzel *et al*, 1992). El complejo

LHCI-730 está constituido por dos polipéptidos CAB de aproximadamente 20 kD, codificados por los genes *Lhca1* y *Lhca4* (Knoetzel *et al*, 1992; Anandan *et al*, 1993). Las cuatro apoproteínas del LHCI codificadas por los genes *Lhca1*, *Lhca2*, *Lhca3* y *Lhca4* están presentes en igual estequiometría (Ikeuchi *et al*, 1991).

El modelo de la organización del LHCI dentro del PSI consistiría de dos trímeros LHCI-680 y dos trímeros LHCI-730 rodeando el centro de reacción. Hay evidencias que sugieren que el complejo LHCI-680 es un homotrímero. Los cuatro trímeros tendrían 12 moléculas de apoproteínas y unirían aproximadamente entre 8 a 10 moléculas de clorofilas por apoproteína.

IV- 2. Antenas periféricas del fotosistema II: LHCII.

Cuatro complejos colectores de luz asociados con el PSII han sido caracterizados hasta hoy: el subcomplejo LHCIIb, que es el más abundante, y tres antenas menores: CP29, CP26 y CP24 (este orden refleja la movilidad relativa de las proteínas, desde la más lenta a la más rápida en la mayoría de los sistemas de geles) (Camm *et al*, 1983; Dunahay *et al*, 1986; White *et al*, 1987). Estos complejos formados por distintos polipéptidos CAB unidos a la clorofila a y b poseen diferentes localizaciones y funciones. Es difícil de obtener una descripción bioquímica correcta de la estructura y composición "*in situ*" del múltiple complejo colector de luz asociado al PSII. Esto se debe a que al solubilizar las membranas tilacoides se alteran las interacciones no covalentes proteína-pigmentos. Además ha sido difícil de purificar cada uno de ellos a homogeneidad debido a que poseen características similares. Las distintas antenas poseen una composición de pigmentos diferentes ya que cada una contiene diferentes cantidades de clorofila a, clorofila b, neoxantina, violaxantina y luteína.

LHCIIb ("Light-harvesting complex IIb"):

Es la principal antena colectora de luz del fotosistema II, por lo que muchas veces es denominada simplemente LHCII. Une aproximadamente el 42% de la clorofila total presente en las membranas tilacoides y cerca del 68% de la clorofila del

fotosistema II. Controla la distribución de energía entre los fotosistemas I y II y juega además un rol importante en el apilamiento de los tilacoides para formar las granas. Este complejo es un agregado de unidades trímeras proteína-pigmentos, cada uno de los cuales está compuesto de tres tipos de proteínas CAB de estructura primaria ligeramente diferentes. Estas apoproteínas denominadas tipo I, tipo II y tipo III, poseen PM similares y están presentes en desigual estequiometría (8: 2: 1). Las apoproteínas tipo I, II y III están codificadas por los genes *Lhcb1*, *Lhcb2* y *Lhcb3* respectivamente (Peter *et al*, 1991b). Durante mi trabajo de tesis he estudiado la estructura y regulación de la expresión de los genes *Lhcb1* en plantas de papa (*Solanum tuberosum*).

El LHCIIb es extremadamente heterogéneo y está compuesto de dos principales subpoblaciones: una más interna fuertemente unida al centro de reacción del PSII formada por los polipéptidos CAB codificados por *Lhcb1* y *Lhcb3*, y una subpoblación más periférica, móvil formada por los polipéptidos codificados por los genes *Lhcb1* y *Lhcb2* (Jansson *et al*, 1990a; Sigrist *et al*, 1994). La subpoblación periférica del LHCII es la que varía el tamaño de la antena del fotosistema II en respuesta a cambios en las condiciones de luz y temperatura. Esta subpoblación es capaz de responder a un exceso de luz separándose del núcleo del PSII y migrando a las regiones no apiladas de la membrana tilacoide donde está más cerca del PSI. La fosforilación reversible de los polipéptidos CAB que forman parte de esta subpoblación LHCIIb periférica, regula así la distribución de la energía de excitación entre los dos fotosistemas. Por otra parte, se ha demostrado que bajo condiciones de baja irradiancia, se produce un aumento en el tamaño de la antena del PSII, principalmente debido a un aumento en la subpoblación periférica.

Antenas menores del fotosistema II:

Los otros tres complejos colectores de luz (CP29, CP26 y CP24) contienen cada uno cerca del 3% de la clorofila total de los tilacoides. El complejo colector de luz CP29 presenta un solo tipo de polipéptido CAB, el cual está codificado por el gen *Lhcb4* (Morishige *et al*, 1992). CP26 posee un polipéptido CAB de aproximadamente 29 kD, codificado por el gen *Lhcb5* (Peter *et al*, 1991a). CP24

posee un polipéptido CAB de aproximadamente 21 kD, codificado por el gen *Lhcb6* (Dainese *et al*, 1991; Peter *et al*, 1991b). Estos complejos han sido aislados al solubilizar la membrana tilacoide como complejos pigmento-proteína monoméricos. Se cree que estos complejos están más cerca del centro de reacción del PSII que lo que lo están los trimeros LHCIIb y que su función es la de conectar el LHCIIb al centro de reacción (Harrison *et al*, 1992; Thornber *et al*, 1993). CP24 junto con LHCIIb es removido del centro de reacción del PSII y de CP29, por lo tanto probablemente se halla localizado más hacia la periferia del PSII.

Uno de los modelos de organización del sistema de antenas considera que el centro de reacción del PSII se halla como dímero (Peter *et al*, 1991c) (Figura 5).

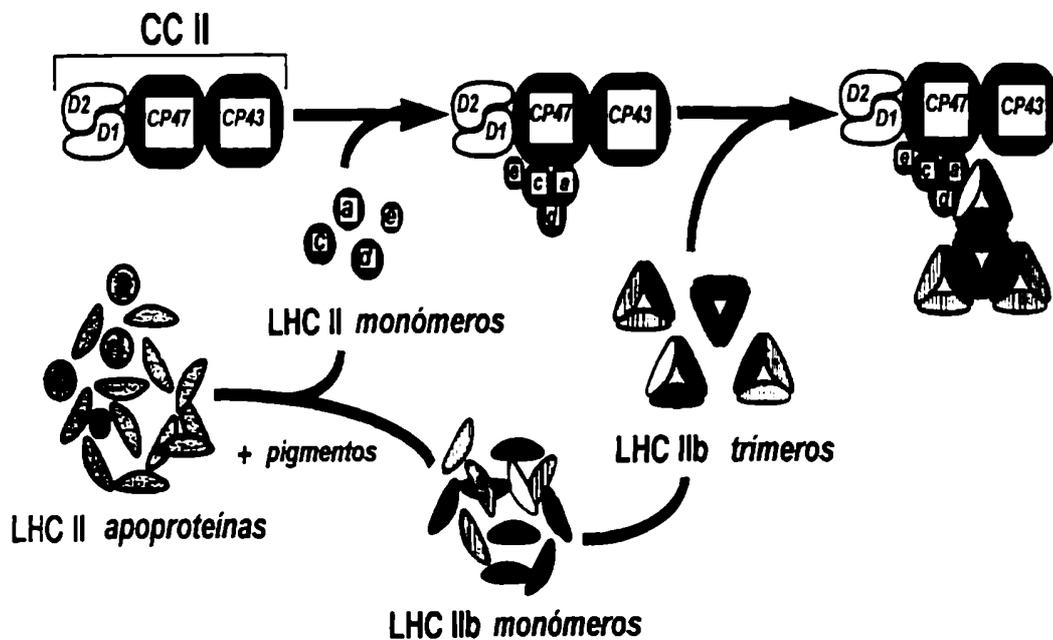


Figura 5. Ensamblaje del complejo colector de luz del fotosistema II. El LHCII se ensambla en forma secuencial. Los círculos representan las antenas menores; a: LHCIIa ó CP29; c: LHCIIc ó CP26; d: LHCII d ó CP24; e: LHCIIe. Los óvalos representan los componentes de la antena principal LHCIIb:

- polipéptido tipo I del LHCIIb, codificado por el gen *Lhcb1*;
- ▨ polipéptido tipo II del LHCIIb, codificado por el gen *Lhcb2*;
- polipéptido tipo III del LHCIIb, codificado por el gen *Lhcb3*.

CCII ("core complex") representa el núcleo del fotosistema II, el cual estaría formado por las proteínas D1, D2, CP43 y CP47 (Dreyfuss *et al*, 1994).

Según este modelo las antenas menores CP29, CP26 y CP24, estarían muy cerca del centro de reacción y las mismas se unirían a un subcomplejo del LHCIIb formado por un polipéptido CAB codificado por el gen *Lhcb3* y dos polipéptidos CAB codificados por el gen *Lhcb1*. Los trímeros formados por los polipéptidos codificados por los genes *Lhcb1* y *Lhcb2* estarían más alejados del centro de reacción (Peter *et al*, 1991b; Bassi *et al*, 1992).

Las antenas menores junto con los polipéptidos CAB tipo I y tipo III forman un complejo multiproteico ("conector") que es necesario para conducir la energía de excitación desde la parte principal del LHCIIb (polipéptidos tipo I y II que existen como subunidades triméricas) al núcleo del fotosistema II (Thornber *et al*, 1993). Este modelo estima que habría doce subunidades de proteínas CAB-pigmentos por cada P680. En la Figura 5 se muestra el modelo propuesto para el ensamblaje del sistema de antenas del fotosistema II. Primero las apoproteínas CAB de los complejos colectores de luz (LHCs) se ensamblan con los pigmentos para formar complejos monoméricos. Posteriormente se unen al núcleo del PSII. El LHCII se ensambla de manera secuencial, ya que primero se unen al núcleo del PSII las antenas menores (CP29, CP26 y CP24) y luego se une el LHCIIb. Los monómeros proteínas CAB-pigmentos son intermediarios en el ensamblaje del LHCIIb.

V- ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LOS POLIPEPTIDOS CAB.

Como se dijo anteriormente, los polipéptidos CAB constituyen una gran familia. Algunas regiones de los distintos polipéptidos CAB son casi idénticas en secuencia, mientras que otras parecen haber evolucionado más rápidamente. Todos los polipéptidos CAB tienen cuatro regiones hidrofóbicas de α -hélice que atraviesan la membrana tilacoide, con el extremo N-terminal hacia el estroma y el C-terminal hacia el lumen tilacoide (Figura 6).

En todos los polipéptidos CAB, las α -hélices A y B, y los fragmentos que las preceden son más conservados (Pichersky *et al*, 1990a). Los distintos polipéptidos

CAB son más divergentes en la hélice transmembrana C, así como también muestran mayores diferencias entre ellos en la región N-terminal de la proteína, la cual constituye el péptido señal.

Recientemente ha sido determinada la estructura del complejo LHCIIb usando cristalografía electrónica de cristales de dos dimensiones a 3.4 Å de resolución (Kuhlbrandt, 1994). Cada polipéptido CAB que forma parte de este complejo, uniría un mínimo de 12 clorofilas (probablemente 7 Chl *a* y 5 Chl *b*) y dos xantófilas. El polipéptido posee tres α -hélices transmembranas, denominadas A, B y C y una hélice anfipática sobre la superficie de la membrana, llamada α -hélice D.

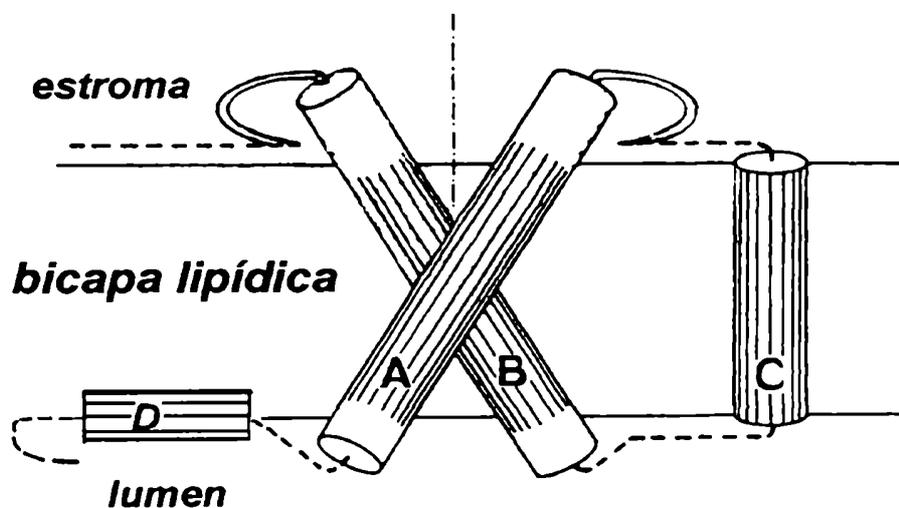


Figura 6. Topografía propuesta del polipéptido CAB en la membrana tilacoide. Las regiones de α -hélices transmembranas A, B, C y D se muestran rayadas. El orden de las cuatro hélices en la secuencia del polipéptido es: B, C, A y D, comenzando desde el extremo N-terminal (Kuhlbrandt *et al*, 1991; 1994).

El 36% del polipéptido forma hélices transmembrana, mientras que el resto está expuesto sobre la superficie de la membrana que mira al lumen o al estroma. Hay

dos luteínas unidas por monómero situadas a ambos lados de las hélices A y B, equidistantes de ambas superficies de la membrana. Los otros carotenoides asociados, principalmente neoxantina, están presentes en cantidades subestequiométricas y parecen estar localizados en la periferia del complejo (Bassi *et al*, 1993).

Las clorofilas están unidas al polipéptido, por coordinación del átomo de magnesio central, con aminoácidos polares o con los carbonilos de la cadena principal del polipéptido en el interior hidrofóbico del complejo. Habría tres moléculas de clorofila a ubicadas a un lado de la hélice B y otras tres, a un lado de la hélice A y dispuestas en forma simétrica.

Los monómeros polipéptido-pigmentos se encuentran asociados en la membrana tilacoide formando trímeros y oligómeros. Se estima que doce monómeros están asociados con cada centro de reacción del PSII (Dainese *et al*, 1991; Peter *et al*, 1991b).

VI- GENES *Lhc*.

Existen al menos 10 tipos distintos de polipéptidos CAB en angiospermas (Jansson, 1994) y gimnospermas (Jansson *et al*, 1991). Según la nueva nomenclatura propuesta los genes que codifican los polipéptidos CAB del fotosistema I y II son llamados *Lhca* y *Lhcb* respectivamente (Jansson. *et al*, 1992).

Resumiendo, cuatro tipos distintos de proteínas CAB han sido identificadas en el LHCI: *Lhca1*, *Lhca2*, *Lhca3* y *Lhca4*. Por otra parte, tres tipos de polipéptidos CAB forman parte del complejo principal LHCIIb y sus genes son designados: *Lhcb1*, *Lhcb2* y *Lhcb3* (correspondientes a los polipéptidos Tipo I, Tipo II y Tipo III del LHCII). Los genes *Lhcb4*, *Lhcb5* y *Lhcb6* codifican los polipéptidos que forman parte de las antenas menores del fotosistema II: CP29, CP26 y CP24.

El juego completo de genes *Lhc* han sido aislados y caracterizados en solo una especie: tomate (Pichersky *et al*, 1985, 1987, 1988, 1989, 1990a). Los diez tipos distintos de polipéptidos CAB son substancialmente divergentes (60-70%). Los polipéptidos codificados por los genes *Lhcb1* y *Lhcb2* son los más parecidos dentro de toda la familia: poseen 85% de identidad, aunque el péptido de tránsito solo muestra 50% de identidad (Chitnis *et al*, 1988). A nivel de nucleótidos los genes *Lhcb1* y *Lhcb2* difieren significativamente ya que poseen 70-75% de homología. La región flanqueante 5' y 3' de los correspondientes ARNm son bastante distintas, sugiriendo que la expresión de estos genes debe ser regulada en forma diferente.

La proteína codificada por los genes *Lhcb1* es la principal proteína CAB y es probablemente la proteína más abundante de membrana. Los genes *Lhcb1* han sido aislados en varias especies de plantas (Jansson *et al*, 1992). El número de genes *Lhcb1* en angiospermas parece ser mucho mayor que para otros genes *Lhc*, con un número que va desde cinco en *Arabidopsis thaliana* (McGrath *et al*, 1992) hasta 16 en petunia (Dunsmuir, 1985). En contraste, los genes que codifican los otros polipéptidos CAB están presentes en una o dos copias.

Los genes *Lhcb2* codifican el segundo polipéptido CAB más abundante. Este polipéptido es encontrado en cantidades equivalentes a una tercera parte del codificado por el gen *Lhcb1*.

Además de ser regulados por la luz, la actividad transcripcional de los genes *Lhc* esta sujeta a control diurno (Piechulla, 1993). Los niveles de los correspondientes ARNm fluctúan durante el ciclo diurno, alcanzando el punto más bajo en la mitad de la noche y el nivel más alto en la tarde temprana. Esta fluctuación periódica esta aparentemente controlada por un reloj circadiano endógeno (Johnson *et al*, 1995).

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

METODOLOGIA DE ACIDOS NUCLEICOS: ADN Y ARN.

I- ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN).

I- 1. Librería genómica.

La biblioteca genómica de papa (*Solanum tuberosum* cv. *Dèsirée*) fue donada por el Dr. L. Willmitzer del Institut für Genbiologische Forschung Berlin GmbH (Rosahl *et al*, 1986). Esta biblioteca fue obtenida a partir de callos haploides y se construyó en el vector EMBL3, derivado del fago λ .

I- 2. Identificación de secuencias de ADN por hibridación:

a- Selección de los bacteriófagos recombinantes de interés.

Para propagar los bacteriófagos recombinantes se usó la cepa de *E.coli* LE392. Esta cepa es lisogénica para el fago P2, lo cual permite que los bacteriófagos recombinantes puedan replicar. La cepa bacteriana fue cultivada en LB con maltosa 0.2% y $MgSO_4$ 10 mM hasta que alcanzó una $OD_{650} = 0.5$ (2.5×10^8 células/ ml). El $MgSO_4$ es necesario para que las bacterias expresen los receptores del bacteriófago. Las bacterias fueron precipitadas por centrifugación y resuspendidas en $MgSO_4$ 10 mM. Posteriormente, se mezclaron con los bacteriófagos recombinantes en una relación de un fago por bacteria, se agregó agar 0.8% a 50°C, se mezcló rápidamente y se volcó sobre placas con medio LB agar. Estas placas fueron incubadas durante 10 hs a 37°C. Los bacteriófagos recombinantes fueron analizados por hibridación en placa utilizando un fragmento interno del gen *Lhcb1*3* de tabaco (Castresana *et al*, 1987). Para ello, las placas con los bacteriófagos se incubaron 1 h a 4°C antes de ser procesadas. Se colocó sobre el agar un filtro de nitrocelulosa. La nitrocelulosa se marcó en forma

asimétrica perforándola con una aguja y se dejó en contacto con las placas de lisis hasta que estuvo completamente húmeda. Se transfirieron las marcas a la base de la cápsula de Petri.

b- Tratamiento de los filtros de nitrocelulosa.

Los filtros de nitrocelulosa fueron tratados según lo descrito por Sambrook *et al* (1989) durante 30 seg con una solución de NaCl 1.5 M - NaOH 0.5 M para desnaturalizar el ADN, luego 5 min en una solución de NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M, pH=8 para su neutralización. Posteriormente, se lavaron en SSC 2X (SSC 20X: NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M, pH=7), se secaron a temperatura ambiente, se calentaron 2 hs a 80°C y se hibridaron con la sonda radiactiva. Las condiciones de hibridación de los filtros se describirá posteriormente. Luego se expusieron con películas autoradiográficas. Se transfirieron las marcas asimétricas de los filtros de nitrocelulosa a la autoradiografía. Para localizar los bacteriófagos recombinantes positivos, las marcas de la autoradiografía se alinearon con las de la placa de Petri.

c- Marcación de la sonda de ADN por el método de "random primers".

La sonda empleada fue marcada radiactivamente con dCTP [α -³²P], según el método de Feinberg *et al* (1983). Se utilizaron 64 ng de ADN y la sonda fue usada para la hibridación a una concentración final de 10⁶ dpm/ml (Benton *et al*, 1977). Para eliminar los nucleótidos no incorporados se pasó la mezcla de reacción a través de una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia) de 9 x 90 mm, equilibrada con bufer TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH=8). Se desnaturalizó la sonda por calentamiento a 100°C durante 5 min y se utilizó para la hibridación.

d- Hibridación de los filtros de nitrocelulosa con la sonda radiactiva. Autoradiografías.

Los filtros de nitrocelulosa provenientes de la transferencia fueron prehibridados durante 2 hs a 65°C en una solución de SSC 6X, Denhart 5X [Denhart 100X: Ficoll

2% (p/v), polivinilpirrolidona 2% (p/v), albúmina sérica bovina 2% (p/v)], SDS 0.1% (p/v), EDTA 1 mM y ADN de esperma de salmón a una concentración final de 50 µg/ml. La hibridación se llevó a cabo agregando a la mezcla anterior la sonda radiactiva, previamente desnaturalizada. Se incubó toda la noche a 65°C con agitación suave. Las condiciones de lavado fueron: dos lavados en una solución de SSC 6X y SDS 0.1% a 60°C, durante 30 min cada uno; luego dos lavados en SSC 6X a 60°C, durante 30 min.

Las autoradiografías se realizaron exponiendo los filtros con películas Kodak X-Omat S y pantallas intensificadoras por diferentes períodos a -70°C.

Esta técnica se utilizó para la identificación de secuencias homólogas a una sonda determinada (Southern, 1975).

I- 3. Purificación del ADN de los bacteriófagos.

Los bacteriófagos recombinantes que dieron señal positiva con la sonda correspondiente al gen *Lhcb1*3* de tabaco, fueron propagados en *E.coli* LE392 en presencia de MgSO₄ 10 mM (aproximadamente diez fagos por bacteria) y se cultivaron a 37°C con constante agitación, durante 6 hs. Luego de la lisis de las bacterias, los restos celulares fueron removidos por centrifugación. El sobrenadante fue tratado con PEG 6000 durante toda la noche a 8°C para precipitar los bacteriófagos. Se centrifugó y el precipitado fue resuspendido en bufer SM (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5%, MgCl₂ 1mM). Se trató con RNasa (10 µg/µl) y DNasa (1 mg/ml) durante 1 h a 37°C con el objeto de eliminar el ARN y ADN bacterianos. Para lisar los bacteriófagos se agregó una solución a concentración final de: SDS 0.5%, EDTA 20 mM y Proteinasa K 50 µg/ml, incubándose a 60°C durante 1 h. Se hizo una extracción con 1 vol de fenol:cloroformo (1:1), otra extracción con 1 vol de cloroformo y se precipitó el ADN presente en la fase acuosa agregándole 0.1 vol de AcONa 3 M, pH=7 y 2 vol de etanol 95%.

I- 4. Digestiones del ADN con endonucleasas de restricción.

Los componentes de la reacción fueron: el ADN en cuestión, la enzima de restricción elegida, un bufer apto para ella y agua destilada (Sambrook *et al*, 1989). Las digestiones se realizaron usando como sustrato ADN genómico, ADN plasmídico o un producto de PCR, según el caso. Los tiempos de digestión dependieron de cada ensayo en particular. Se utilizaron cinco unidades de enzima por μg de ADN.

I- 5. Métodos electroforéticos de ácidos nucleicos:

a- Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida.

Los fragmentos de ADN fueron separados en geles de agarosa horizontales de distintos porcentajes, de acuerdo a su tamaño: geles 0.8% para fragmentos de 10 a 0.8 kb, geles 1.2% para fragmentos de 0.8 a 0.4 kb y geles 2% para fragmentos de 0.4 a 0.1 kb (Sambrook *et al*, 1989). Las condiciones de corrida fueron 4-5 V/cm durante 2-3 hs. A cada muestra se le agregó 0.1 vol de bufer de siembra compuesto por glicerol 30%, EDTA 20 mM y azul de bromofenol 0.25% (p/v). Se utilizó para la electroforesis bufer TBE 1X (Tris-borato 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2.5 mM, pH=8.3). Al preparar el gel de agarosa, se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El ADN fue visualizado por la fluorescencia inducida por la luz UV en el bromuro de etidio intercalado entre las bases del ADN. Los geles se fotografiaron por transiluminación con luz UV.

El análisis de fragmentos pequeños muchas veces se realizó en geles verticales de poliacrilamida 5%, debido a que estos geles permiten una muy buena resolución de fragmentos de 300 a 70 pb. En este caso los geles fueron teñidos con bromuro de etidio luego de la electroforesis.

Se utilizaron como marcadores de peso molecular, ADN del fago λ digerido con HindIII o bien ADN del fago ϕX174 digerido con HaellI.

b- Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Con el objeto de separar fragmentos de ADN para luego subclonarlos, se realizó una electroforesis horizontal en un gel de agarosa del ADN de interés cortado con la enzima de restricción correspondiente. Luego de cortar del gel la banda que se deseaba subclonar, visualizándola con luz UV, se procedió a extraer el ADN congelando y descongelando el bloque de agarosa. Para ello se colocó el bloque dentro de un tubo eppendorf, el cual se sumergió en N₂ líquido 1 min. Se centrifugó durante 15 min a 15800g y se separó la fase acuosa. La agarosa que quedó en el tubo se volvió a congelar, repitiéndose el procedimiento anterior tres veces. La última vez se agregó 100 µl de bufer TE antes de volver a congelar. Los distintos sobrenadantes se juntaron y se precipitó el ADN. Este método se usó cuando se deseaba separar fragmentos previamente corridos en agarosa 0.8% o bien de menor porcentaje. En el caso de fragmentos más pequeños separados por medio de geles de agarosa de mayor porcentaje, se usó agarosa de bajo punto de fusión y el método de extracción del ADN que se utilizó es el descrito por Sambrook *et al* (1989).

I- 6. Transferencia a filtros de nitrocelulosa.

Luego de la electroforesis, los geles de agarosa fueron fotografiados y sometidos a tratamiento alcalino durante 45 min, con agitación, en una solución de NaOH 0.5 N - NaCl 1.5 M para desnaturalizar el ADN. Luego se neutralizó en una solución de Tris-HCl 0.5 M, pH=7.5 y NaCl 1.5 M, durante 30 min a temperatura ambiente y con constante agitación. El gel se colocó invertido sobre un papel de filtro Whatman 3 MM en contacto con el bufer de transferencia SSC 10X. Sobre el gel se colocó el filtro de nitrocelulosa, previamente embebido en SSC 2X, y sobre éste dos hojas de Whatman 3 MM también embebidas en SSC 2X. A continuación se colocaron varias capas de papel absorbente y un peso de 0.5 kg. Se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Se lavó el filtro en SSC 2X y se calentó a 80°C durante 2 hs (Southern, 1975).

I- 7. Transformación de bacterias con ADN plasmídico.

Se transformaron bacterias *E.coli* HB101 competentes con el plásmido pUC19 que llevaba el fragmento de ADN de interés. Se utilizó el método de transformación basado en el uso de cloruro de calcio para aquellos plásmidos que llevaban insertos de 3 kb o menos (Sambrook *et al*, 1989). Para plásmidos con insertos mayores se utilizó el método de electrotransformación de bacterias (Sambrook *et al*, 1989). Las bacterias fueron preparadas según las indicaciones de cada método.

I- 8. Purificación de ADN plasmídico.

A partir de colonias aisladas, se realizó un cultivo en medio LB líquido con una concentración final de ampicilina de 100 µg/ml. Se incubó a 37°C durante toda la noche con agitación vigorosa. El plásmido pUC19 lleva un gen que le confiere resistencia a ampicilina a la bacteria que lo posee. Posteriormente, las bacterias fueron precipitadas por centrifugación y se trataron con una solución de EDTA 20 mM, NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH=8. Se agregó una solución de NaOH 0.2 N y SDS 1%, y posteriormente se agregó 0.1 vol de AcONa 3 M, pH=4.8. Se centrifugó para precipitar el ADN cromosómico. El sobrenadante que contiene el ADN plasmídico, se trató con 1 vol de fenol ácido, pH=4 y se centrifugó para separar las fases. Luego, la fase acuosa se trató con 1 vol de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (Weickert *et al*, 1989). El plásmido se precipitó, llevando la fase acuosa a 0.3 M final con AcONa 3 M, pH=7 y agregando 2 vol de etanol 95%. Una vez que el ADN fue resuspendido en bufer TE, se trató con RNasa 50 µg/ml durante 30 min a 37°C.

Cuando el plásmido fue utilizado en reacciones de secuencia, se hizo un paso más de purificación a través de una columna de 12 cm x 8 mm de Sepharose-CL4B (Pharmacia), eluyendo con bufer TE NaCl 100 mM y recogiendo alicuotas de 80-100 µl. Para determinar en que tubos había eluido el plásmido, se corrió 0.1 vol de cada fracción en un gel de agarosa 0.7%. Este DNA es de calidad gradiente de CICs o mejor.

I- 9. Secuenciación del ADN:

Los clones de pUC19, se secuenciaron siguiendo básicamente el método de terminación de cadena descrito por Sanger *et al* (1975, 1977, 1978) con las modificaciones introducidas por Unit States Biochemical (USB). Se utilizó como fuente de reactivos la versión 2.0 del "DNA Sequencing Kit: Sequenase".

a- Desnaturalización del ADN.

Se tomaron entre 2 y 5 µg de ADN plasmídico, el cual fue desnaturalizado durante 5 min a temperatura ambiente por el agregado de una solución de NaOH 0.2 M y EDTA 0.2 mM. Luego el ADN fue precipitado por el agregado de 0.1 vol de AcONa 3 M, pH=5 y 2 vol de etanol 95%. Se controló que el pH final fuera entre 5-5.5 y se dejó 15 min a -70°C. Se centrifugó a 15800g, durante 15 min.

b- Hibridación del "primer".

Se resuspendió el ADN desnaturalizado en 7 µl de agua bidestilada estéril, se agregó inmediatamente 12 ng de "primer" (12 ng en 1 µl) y 2 µl de bufer de "annealing" 5X (Tris-HCl 200 mM, pH=7.5, MgCl 100 mM y NaCl 250 mM). Se mezcló cuidadosamente y se incubó a 65°C, 2 min. Luego se lo dejó durante 40-50 min a temperatura ambiente.

c- Reacciones de secuencia.

Después de la hibridación del "primer" con el plásmido, se realizó la reacción de marcado. Para ello, a la reacción de "annealing" se le agregó 5 µCi de dATP [α -³⁵S] (500 Ci/mmol), los dNTPs fríos (dTTP, dGTP y dCTP), DTT y Sequenase V2 de USB. Se mezcló cuidadosamente y se incubó entre 2-5 min a temperatura ambiente.

Por otra parte, se marcaron cuatro tubos con los rótulos: G, A, T, C. Se les agregó a cada uno 2.5 µl de la correspondiente mezcla de terminación (cada una con el correspondiente ddNTP) y éstos tubos fueron preincubados a 37°C durante 5 min.

Cuando la reacción de marcado se completó, se transfirieron 3.5 μ l de la misma a los tubos con las mezclas de terminación y se incubó a 48°C durante 13 min.

Antes de sembrar se agregó bufer de siembra (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y xylene cyanol 0.05%) y se calentaron las mezclas a 75°-80°C durante 5 min.

d- Gel de secuencia. Autoradiografía.

Los productos de las reacciones fueron analizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% - urea 7 M. Se corrió a 65-80 W y posteriormente el gel fue transferido a un papel Whatman 3MM y se secó a 80°C durante 2 hs. Las autoradiografías se realizaron exponiendo el gel con películas Kodak X-Omat AR, a temperatura ambiente durante 17-24 hs.

e- Preparación de pBluescript simple cadena para reacciones de secuencia.

El plásmido doble cadena pBluescript KS⁺ que lleva el inserto de interés, fue usado para transformar *E.coli* DH5 α F'IQ. Las bacterias fueron transformadas usando el método de transformación basado en el uso de cloruro de calcio. El pBluescript lleva un gen que le confiere resistencia a ampicilina. Por otra parte, las bacterias *E.coli* DH5 α F'IQ son resistentes a kanamicina. Por lo tanto, las bacterias transformadas fueron seleccionadas en LB agar con una concentración final de 100 μ g/ml de kanamicina y 200 μ g/ml de ampicilina. Se tomó una colonia aislada, la cual se sembró en 4 ml de LB líquido con los antibióticos kanamicina y ampicilina a las concentraciones finales antes indicadas. Se cultivó durante toda la noche a 37°C, con agitación. Al día siguiente, se tomó 1 ml de éste cultivo y se sembró en 10 ml de medio TY 2X con los antibióticos antes mencionados (TY 2X: 16 g de Bactotripton, 10 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl para 1 l de medio, pH=7.2-7.4). Se incubó 1 h a 37°C con agitación y luego, se agregó el fago "helper" R408 incubándose 6-7 hs a 37°C para permitir la replicación del fago. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado dos veces durante 15 min a 8000g para precipitar las bacterias lisadas. Se tomó el sobrenadante teniendo cuidado de no

arrastrar el precipitado. Se le agregó PEG 20% (p/v) y NaCl 2.5 M para precipitar los fagos. Se mezcló con agitación vigorosa, se dejó 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a 12000g. El precipitado viral se secó bien y se resuspendió en bufer TES (TES 1X: Tris-HCl 20mM, pH=7.5, NaCl 10mM y EDTA 0.1mM). Se hicieron varias extracciones con 1 vol de fenol:cloroformo (1:1), hasta que no se formó interfase, y luego se hizo una extracción con 1 vol de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se precipitó el ADN viral llevando la fase acuosa a 0.3 M con AcONa 3 M, pH=5 y agregando 2 vol de etanol 95%. Se centrifugó y se resuspendió el precipitado en agua bidestilada. Este ADN fue utilizado para secuenciar. El protocolo de la reacción de secuencia que se siguió es el descrito anteriormente (I-9: a, b, c), salvo que no se realizó el paso de desnaturalización ya que este ADN es simple cadena.

I- 10. Técnica de PCR.

Introducción de un sitio BamHI en la región 5'flanqueante del gen *Lhcb1*2*.

Esta reacción de PCR se realizó a partir de un derivado del plásmido pUC19 que llevaba la región 5' flanqueante comprendida entre los sitios de HindIII y PvuII del gen *Lhcb1*2*. En la reacción de PCR se utilizó el siguiente bufer: Tris-HCl 10 mM, pH=8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM y gelatina 0.001% (p/v), al cual se le agregaron 0.20 mM de cada uno de los dNTPs, 2.5 unidades de Taq DNA Polimerasa, 100 ng de cada "primer" y 20 ng plásmido. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 µl. Se utilizó un oligonucleótido específico complementario a la región -11 a +18 con respecto del sitio de iniciación de la transcripción, al cual se le introdujo un sitio para la enzima de restricción BamHI. El otro oligonucleótido utilizado fue el "primer" comercial "reverse 1201" (Gibco BRL), complementario al "linker" de pUC19. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización del ADN: 5 min a 94°C y luego, 35 ciclos de: 30 seg de desnaturalización a 94°C, 30 seg de renaturalización a 55° y 45 seg de extensión a 72°C. Luego se completó la extensión durante 5 min a 72°C. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Primer -11 a +18: 5' GAAGGCT^{BamHI}GGATCCGATGAAGTTACAAGG 3'

Primer reverse 1201: 5' AACAGCTATGACCATG 3'

Luego de la amplificación, al producto de PCR se le hizo una extracción con 1 vol de fenol, otra extracción con 1 vol de fenol: cloroformo (1:1) y una tercera extracción con 1 vol de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Posteriormente, el ADN fue cortado con las enzimas HindIII y BamHI y el producto de esta digestión se corrió en un gel de agarosa 0.8%. Se extrajo la banda de interés según se detalló anteriormente. El fragmento de 1.3 kb HindIII/BamHI se clonó en el plásmido pBI101.2. Los extremos de esta construcción en pBI fueron secuenciados para corroborar que el promotor estaba en fase con el gen de la β -glucuronidasa.

II- ACIDO RIBONUCLEICO (ARN).

II- 1. Aislamiento del ARN de plantas de papa.

El ARN fue aislado a partir de plantas de papa (*Solanum tuberosum* cv *Désirée*). Se usó el reactivo TRIzol™ (Gibco, BRL) y se siguió el protocolo recomendado por los fabricantes, el cual se basa en el método de aislamiento de Chomczynski *et al* (1987). El TRIzol es básicamente una solución monofásica de fenol- isotiocianato de guanidina.

Se partió de 1 g de material, el cual fue sumergido en N₂ líquido y homogeneizado usando un mortero. Se agregó TRIzol (1 ml de TRIzol por 0.1 g de tejido) y se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C. El precipitado fue descartado y el sobrenadante se dejó 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se agregó cloroformo en una relación de 0.2 ml por cada ml de TRIzol utilizado, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12000 g durante 15 min para separar las distintas fases. Se extrajo la

fase acuosa y se precipitó el ARN presente en ella con 1 vol de isopropanol. El precipitado fue resuspendido en agua autoclavada, previamente tratada con dietil pirocarbonato 0.1% (v/v).

Se calculó la concentración de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm ($1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de ARN). También se midió absorbancia a 280 nm y se calculó la relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$, lo cual es un índice de la pureza de la preparación (lo ideal es que esta relación alcance el orden 2). Para comprobar cual era el estado del ARN aislado, se corrió una alícuota (40-50 μg) en un gel de agarosa desnaturizante según se detallará posteriormente. El estado del ARN se determinó a través de la fluorescencia del bromuro de etidio intercalado entre las bases del ARN ribosomal. Se dividió la muestra de ARN obtenida en alícuotas, las cuales fueron guardadas a -70°C .

Se realizaron dos preparaciones de ARN, una a partir de hojas de plantas de papa de 60 días y otra a partir de plantas de 90 días. En la primera preparación se usó el reactivo TRIzol obteniéndose una muy buena calidad del ARN aislado y un buen rendimiento, aproximadamente 1 mg de ARN total a partir de 1 g de hojas. Cuando se extrajo ARN de plantas de 90 días no se usó TRIzol, sino que se preparó el reactivo en el laboratorio. En este caso, el ARN obtenido estaba algo degradado por lo cual, en las reacciones de "primer extension" se obtuvieron bandas dobles. En este caso, al partir de 1 g de hojas, se obtuvo 500 μg de ARN; cuando se partió de 1 g de tallos se obtuvo 84 μg de ARN y en el caso de partir de la misma cantidad de raíces, se obtuvo 132 μg de ARN.

Todo el material usado para aislar el ARN fue autoclavado dos veces a 1 at, durante 20 min cada vez. El material de vidrio fue homeado a 180°C durante toda la noche. Se tomaron todas las precauciones para evitar la contaminación con RNasas, manipulando el material con cuidado y usando guantes.

II- 2. Electroforesis del ARN en geles de agarosa desnaturizantes.

Una alícuota del ARN total obtenido fue corrido en un gel desnaturizante de agarosa 1.4%. Para preparar este gel se mezcló 1.4 g de agarosa con 10 ml de bufer MOPS 10X (ácido morfolinpropanosulfónico 0.2 M, AcONa 0.05 M , pH=7 y

EDTA 0.01 M) y 75 ml de agua. Se calentó hasta disolver la agarosa y la mezcla se mantuvo a 65°C. Luego se agregó 16 ml de formaldehído (40% v/v). A la muestra de ARN a sembrar, se le agregó 1 vol de formamida, bufer MOPS 1X final y formaldehído 6% (v/v). También se agregó 0.1 vol de bufer de siembra libre de RNasas, compuesto por azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanol 0.25%, Ficoll 400 15% y bromuro de etidio 0.1% (p/v). La muestra fue calentada a 65°C, durante 5 min y se dejó en hielo hasta el momento de sembrarla en el gel de agarosa.

Para correr el ARN se usó una cuba de electroforesis libre de RNasas, reservada exclusivamente para trabajar con ARN. Se usó como bufer de corrida MOPS 1X.

II- 3. "Primer extension":

La técnica de "primer extension" es comúnmente aplicada para identificar el extremo 5' de un determinado ARN mensajero (ARNm). Básicamente, consiste en incubar el "primer" marcado radiactivamente con el ARN extraído, en presencia de transcriptasa reversa. Esta enzima extiende el oligonucleótido que hibridó con su ARNm correspondiente y genera así un ADN copia (ADNc). La transcriptasa reversa termina de sintetizar el ADNc cuando alcanza el extremo 5' del ARNm usado como templado. El producto de la reacción de "primer extension" se corre en un gel de secuencia de poliacrilamida 6% - urea 7 M, junto con los productos de una reacción de secuencia realizada con el mismo "primer".

El oligonucleótido empleado en la reacción de "primer extension" no debe localizarse más allá de 100 nucleótidos del extremo 5' de su correspondiente ARNm y debe tener más de 15 bases complementarias con el mismo.

El protocolo seguido para las reacciones de "primer extension" fue el indicado por Tolmasky *et al* (1993).

a- Marcación del "primer" con ATP [γ -³²P]:

Debido a que los oligonucleótidos comerciales son sintetizados sin el grupo fosfato en el extremo 5', los mismos son fácilmente marcados radiactivamente por la

transferencia del γ - ^{32}P desde el ATP [γ - ^{32}P] usando la enzima "T4 polynucleotide kinase".

Aproximadamente 1 ng de "primer" fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con 150 μCi de ATP [γ - ^{32}P], usando 10 unidades de "T4 polynucleotide kinase" (Biolabs), en un volumen final de 50 μl . Se incubó durante 3 hs a 37°C. Luego el oligonucleótido marcado fue precipitado por el agregado de 0.5 vol de acetato de amonio 6 M y 2 vol de etanol 95%, seguido por centrifugación. El precipitado se lavó con etanol 70%, se resuspendió en agua tratada con dietil pirocarbonato 0.1% (v/v) y se determinó la cantidad de c.p.m.

b- Reacción de "primer extension".

Aproximadamente 50 μg de ARN total fueron incubados con 100000 c.p.m. del "primer" marcado radiactivamente, durante 10 min a 65°C. Posteriormente, se agregó RNasin que es un inhibidor de RNasas, y se incubó a 45°C durante 30 min. Se agregaron los dNTPs y la transcriptasa reversa (MMLV Reverse Transcriptase, Gibco), y se incubó durante 1 h a 45°C. Se hizo una extracción con 1 vol de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitaron los ácidos nucleicos de la fase acuosa con el agregado de 0.1 vol de AcONa 3 M, pH=7 y 2 vol de etanol 95%. Luego de centrifugar, el precipitado se lavó con etanol 70% y se secó al aire, resuspendiéndose luego en 5 μl de una solución de RNasa (2mg/ml). Se agregó el mismo bufer de siembra que el utilizado en las reacciones de secuencia.

Antes de sembrar en el gel de secuencia, el producto de la reacción de "primer extension" fue calentado a 75°-80°C durante 5 min, al igual que las reacciones de secuencia, para desnaturalizar el ADN.

Los oligonucleótidos usados en los distintos experimentos realizados fueron el "primer 1" ó el "primer 2" según se detalla en cada caso.

"Primer 1": 5'GGAAGAAAGAGCCATTGT3' 3'

"Primer 2": 5'GATTAAGAGAAAAGTGTGA 3'

III- METODOLOGIA UTILIZADA EN LOS ENSAYOS DE TRANSFORMACION DE PLANTAS.

III- 1. Transformación de *E.coli* HB101 con plásmidos pBI y sus derivados.

El pBI es un plásmido de bajo número de copias y que posee alrededor de 11 kb. Este plásmido contiene un origen de replicación que funciona tanto en *E.coli* como en *Agrobacterium*, por lo tanto, las mezclas de ligada con las construcciones realizadas en pBI fueron utilizadas para transformar la cepa de *E.coli* HB101. Para transformar estas bacterias se utilizó el método de electroporación. Las bacterias transformadas con pBI se seleccionaron en agar LB con una concentración final de kanamicina de 100 µg/ml.

III- 2. Purificación de pBI y plásmidos derivados.

Se tomó una colonia aislada de *E.coli* HB101 transformada con el plásmido derivado de pBI y se la sembró en 4 ml de LB con kanamicina a concentración final de 100 µg/ml, incubándose toda la noche a 37°C con agitación. Se sembró 1 ml de éste cultivo en 400 ml de medio fresco con el antibiótico y se incubó a 37°C toda la noche. Se purificó el ADN plasmídico según se detalló anteriormente (I-8).

III- 3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 con el plásmido pBI.

El plásmido pBI es un vector binario. Por lo tanto, para transferir a la planta el fragmento de ADN que se halla entre sus repeticiones directas, necesita las funciones de virulencia (*vir*) aportadas en *trans* por la cepa de *Agrobacterium* receptora. Se eligió para transformar con los derivados de pBI la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, la cual posee las funciones *vir* y además posee resistencia a rifampicina y a estreptomycinina.

Para la transformación se utilizó el protocolo descrito por Höfgen *et al* (1988). Este método se describe a continuación.

a) Preparación de las bacterias.

Se sembró *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 en 2 ml de LB con una concentración final de 100 µg/ml de rifampicina y 100 µg/ml de estreptomicina, incubándose durante toda la noche a 28°C, con agitación. Al día siguiente, las bacterias se sembraron en 200 ml de LB con los antibióticos antes indicados y se incubó a 28°C, con agitación, hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.5 a 550 nm. Se centrifugó durante 10 min a 4000 g y el precipitado se resuspendió en 200 ml de agua estéril, volviéndose a centrifugar para precipitar las bacterias. El precipitado se resuspendió en 1 ml de glicerol 10% y se fraccionó. Estas bacterias fueron guardadas a -70°C.

b) Transformación.

Se mezcló en un tubo eppendorf 50 µl de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 preparadas según se detalló anteriormente, con 5 µg del derivado de pBI (5 µg de ADN en un volumen no mayor de 3 µl) y 50 µl de LB. El tubo fue sumergido en N₂ líquido durante 5 min, y luego se lo incubó a 37°C durante 25 min; este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente estas bacterias se sembraron en 15 ml de LB sin antibióticos, incubándose a 28°C durante toda la noche sin agitación. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo y se resuspendió en 1 ml de LB con una concentración final de 100 µg/ml de rifampicina, 100 µg/ml de estreptomicina y 100µg/ml de kanamicina. Se sembraron 70 µl en placas LB agar con los antibióticos antes mencionados, para seleccionar las bacterias que llevan los derivados del plásmido pBI. Estas placas se incubaron durante tres días a 28°C.

III- 4. Transformación de plantas de tabaco a partir de discos de hojas mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que llevaban los plásmidos de interés derivados de pBI, fueron utilizadas para transformar *Nicotiana tabacum* cv.

Pètit Havana. Se utilizó el método de transformación a partir de discos de hojas de Horsch *et al* (1985), el cual se describe brevemente.

Se tomó un inóculo de las bacterias (*Agrobacterium tumefaciens* LBA 44044 que lleva el plásmido derivado de pBI) y se las sembró en 50 ml de LB con una concentración final de rifampicina 100 µg/ml, estreptomicina 100 µg/ml y kanamicina 100 µg/ml. Se incubó a 28°C con agitación durante 24 hs. Al día siguiente, la suspensión bacteriana se centrifugó durante 5 min a 3000 g. El precipitado fue resuspendido en 50 ml de LB sin antibióticos y se midió la densidad óptica a 600 nm. Para la infección es conveniente que la densidad óptica a 600 nm del cultivo, tenga un valor aproximado de 0.1 ($0.1 OD_{600}=10^8$ células/ml). El cultivo de bacterias fue fraccionado en cajas de Petri estériles.

Se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. *Pètit Havana*) micropropagadas en medio MSS (Murashige-Skoog con sacarosa, ver Tabla 1) (Murashige *et al*, 1962). Las plantas se cultivaron en un cuarto a 22°C, bajo un fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs de oscuridad. Para el ensayo de transformación, se eligieron plantas jóvenes, las cuales tenían buen aspecto general y con hojas totalmente verdes. Se trabajó en esterilidad, en el flujo laminar. Se escogieron hojas grandes y turgentes a las cuales se les quitó la nervadura mediante dos cortes paralelos a la misma. Los cortes se hicieron de un solo trazo, utilizando un bisturí. Para evitar la desecación de la hoja se trabajó sobre una caja de Petri estéril que contenía unos mililitros de medio MSS líquido. Se cortaron ambas mitades de la hoja en cuadrados de 0.5 cm de lado o en discos de 1 cm de diámetro. Estos explantos fueron colocados, con el envés de la hoja hacia arriba, en las cajas de Petri que contenían las bacterias resuspendidas en LB. Se dejaron las hojas en contacto con *Agrobacterium* durante 30 min a 22°C, con agitación suave y con baja intensidad de luz. Luego los explantos se secaron, apoyándolos sobre papel de filtro estéril, y eliminando así el exceso de bacterias. Los explantos fueron colocados, con el envés de la hoja hacia arriba, en medio MSS agar con una concentración final de BAP (6-benzilaminopurina) 0.5 mg/l y NAA (ácido naftilacético) 0.05 mg/l. Se dejaron en este medio durante 24 hs, colocándose en una

cámara de cultivo con fotoperíodo 16 hs luz-8 hs de oscuridad y a 22°C. Al día siguiente, los explantos fueron transferidos a medio de selección: MSS agar con una concentración final de BAP 0.5 mg/ml, NAA 0.05 mg/ml, cefotaxine 500 mg/l y kanamicina 100 mg/l. Cada semana, los explantos fueron transferidos a medio selectivo fresco. Cuando se diferenciaron brotes de 0.5 cm de alto, se los separó del explanto inicial con bisturí y se los transfirió a medio de enraizamiento: MSS agar con una concentración final de cefotaxine 500 mg/l y kanamicina 100 mg/l. La cefotaxine es un bacteriostático y por lo tanto su efecto es evitar la proliferación no deseada de *Agrobacterium*, mientras que la kanamicina se usa para seleccionar los brotes transformados.

Tabla 1: Composición del medio MSS agar (Murashige-Skoog con sacarosa).

Macroelementos

NH ₄ NO ₃	1650 mg/l
KNO ₃	1900 mg/l
KH ₂ PO ₄	170 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg/l
MgSO ₄ (anhidro)	180.7 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	440 mg/l

Microelementos

H ₃ BO ₃	6.2 mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6 mg/l
KI	0.83 mg/l
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.25 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025 mg/l

Fe-EDTA:	
EDTA.2H ₂ O	37.3 mg/l
FeSO ₄ .2H ₂ O	27.8 mg/l

Vitaminas MS (500x):	
Piridoxina	250 mg/l
Tiamina	50 mg/l
Acido nicotínico	250 mg/l

Sacarosa	20 g/l
Agar (Difco)	8 g/l

pH= 5.8

IV- ANALISIS DE LAS PLANTAS DE TABACO TRANSFORMADAS.

IV- 1. Detección de la β -glucuronidasa en las plantas transgénicas.

a- Ensayo fluorométrico.

La actividad β -glucuronidasa de las plantas transformadas se determinó mediante el ensayo fluorométrico descrito por Jefferson (1987a). Se preparó un extracto proteico de las plantas de tabaco. Se partió de 5-10 mg de tejido, al cual se le agregó 50 μ l de bufer de extracción: bufer fosfato 50 mM, pH=7, β -mercaptoetanol 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.1% y Tritón X-100 0.1% (v/v). Se homogeneizó el tejido en un tubo de plástico con émbolo, marca Kontes. Se centrifugó 15 min a 4°C a 15800g y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Este extracto se guardó a -70°C hasta realizarse el ensayo fluorométrico. Para determinar la actividad β -glucuronidasa del extracto se incubaron 500 μ l de bufer de ensayo (MUG 1 mM en bufer de extracción) a 37°C, durante unos min. Se agregaron 10 μ l del extracto

proteico de la planta, mezclándose inmediatamente con agitación vigorosa, y se volvió a incubar a 37°C. A distintos tiempos (0, 15, 30 y 45 min) se tomó una alícuota de 100 µl y se mezcló con 2.4 ml de Na₂CO₃ 0.2 M, para detener la reacción. La concentración de 4-MU se determinó por espectrofluorometría (λ_{ex} = 365nm; λ_{em} = 455 nm). Se prepararon soluciones de 4-MU 1 µM, 500 nM y 100 nM para realizar la curva de calibración.

La concentración de proteínas de los extractos se determinó por el método de Lowry (1951).

b- Ensayo histoquímico.

Se incubó una sección del tejido a analizar, durante 30 min, en una solución de paraformaldehído 2% (p/v) en bufer fosfato de sodio 100mM, pH=7 y EDTA 1 mM. El material se enjuagó con bufer fosfato de sodio 100mM, pH=7 y se colocó en una solución de X-Gluc 2 mM en bufer fosfato de sodio 50 mM, pH=7 y Tritón X-100 0.5% (v/v). Se infiltró vacío durante 30 seg (aproximadamente 20 mbar) y se incubó durante 1-2 días a 37°C, controlando la tinción de tiempo en tiempo. El tejido se enjuagó con agua para detener la reacción. Se extrajo la clorofila con etanol 70% para poder así visualizar el color azul enmascarado por el verde de la clorofila. El material teñido se guardó en etanol absoluto durante varios meses a 4°C.

IV- 2. Análisis de las plantas transformadas por "Southern blot".

a) Extracción del ADN de las plantas de tabaco.

El método de extracción del ADN usado para PCR como así también para "Southern blot" fue el descrito por Thomson *et al* (1993).

Se pulverizó el tejido en un mortero, con N₂ líquido. Se agregó 1 ml de bufer CTAB [bromuro de cetiltrimetilamonio 2% (p/v), Tris-HCl 100 mM, pH=8, NaCl 1.4 M y EDTA 20 mM) por gramo de tejido fresco. Se calentó a 55°C durante 1 h, se centrifugó a 2000 g, 10 min. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se agregó 1 vol de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclándose por inversión. La muestra

se centrifugó a 2000 g, 10 min y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Se midió el volumen con una pipeta y se agregó 0.1 vol de acetato de amonio 7.5 M y 2 vol de etanol absoluto. Se centrifugó a 12000 g, durante 30 min para precipitar el ADN. El precipitado fue lavado con etanol 75%, se secó y se resuspendió en bufer TE. Se midió la densidad óptica a 260 nm para calcular la concentración del ADN obtenido (1 OD₂₆₀=50 µg/ml de ADN).

b) "Southern blot".

Se cortaron 20 µg de ADN con 40 unidades de HindIII en un volumen final de 100 µl durante toda la noche a 37°C. Se precipitó el ADN agregando 0.1 vol de AcONa 3 M, pH=7 y 2 vol de etanol 95%. Se lavó el precipitado con etanol 70% y se resuspendió en 25 µl de TE. Se agregó RNAsa 30 µg /µl y se incubó 30 min a 37°C.

Se corrió el ADN en un gel de agarosa 0.8% durante 18 hs a 30 V (15 mA). Una vez finalizada la corrida se desnaturalizó el ADN y se lo transfirió a nitrocelulosa según se detalló anteriormente (I-6). Un fragmento de 544 bases del gen GUS fue utilizado como sonda. Este fragmento fue obtenido mediante amplificación por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Primer 53: 5' GTA GAA ACC CCA ACC CGT G 3'

Primer 54: 5' TCG TCC ACC CAG GTG TTC G 3'

Los oligonucleótidos 53 y 54 son complementarios a la región de código del gen *uidA*. El "primer 53" hibrida entre las bases 13-31 río abajo del sitio de iniciación de la traducción (codón ATG), mientras que el "primer 54" hibrida entre las bases 540 y 559.

El fragmento utilizado como sonda se marcó por "random primers".

IV- 3. Análisis del ADN de las plantas transformadas por PCR.

Se utilizó un bufer compuesto por: Tris-HCl 20 mM, pH=8.4 y KCl 50 mM, al cual se agregó MgCl₂ 4.5 mM, 0.20 mM de cada uno de los dNTPs, 10 ng de cada

oligonucleótido, 20 ng de ADN y 2.5 unidades de Taq DNA Polimerasa. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l. Se utilizó el "primer 53" y "primer 54" cuyas secuencias fueron detalladas anteriormente. Las condiciones en las que se realizó la reacción fueron las siguientes: desnaturalización del ADN durante 5 min a 94°C y luego 35 ciclos de: 60 seg a 94°C para la desnaturalización, 90 seg a 69°C para la renaturalización y 120 seg de extensión a 72°C. Terminados los ciclos se completó la extensión durante 5 min a 72°C.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1.5 %.

IV- 4. Análisis de la progenie T2.

Las semillas de las plantas transgénicas fueron obtenidas por autofecundación, tapando las inflorescencias con bolsas de papel antes de la floración. Las semillas se esterilizaron con hipoclorito de sodio 10% durante 5 min, luego se enjuagaron con agua estéril y se secaron sobre papel de filtro. Las mismas fueron sembradas en medio MSS agar con una concentración final de 100 μ g/ml de kanamicina y se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs de oscuridad, a 22°C. Después de cuatro semanas, se determinó el número de plantas resistentes y sensibles al antibiótico. Se realizó la prueba de ji-cuadrado, siendo $X^2 = (f - f_e)^2 / f_e$ donde f : frecuencias observadas y f_e : frecuencias esperadas (Sokal *et al*, 1980). Las relaciones de los fenotipos esperados para inserciones que segregan independientemente son: para una inserción, 3 verdes:1 blanca; para dos inserciones, 15 verdes:1 blanca; para tres inserciones, 63 verdes: 1 blanca (Tomes *et al*, 1990).

V- TRATAMIENTOS LUMINOSOS.

V- 1. Preparación de las semillas.

Las semillas fueron colocadas en cajas de plástico transparente donde se las sometió a distintos tratamientos luminosos. Se utilizaron cajas de 4 cm x 3.5 cm, las cuales se enjuagaron con etanol 95% y se dejaron secar. En cada una se colocaron tres papeles de filtro estériles, los cuales se humedecieron con agua estéril (800 μ l). En cada caja se colocaron 25 semillas. Las cajas fueron bien cerradas y selladas con "Parafilm" para mantener un ambiente húmedo. Para inducir la germinación se colocaron las semillas en luz blanca continua durante 16 hs. Luego se mantuvieron en oscuridad a 22°C, hasta el día quinto en el que se realizaron los distintos tratamientos luminosos. Las plántulas de 5 días poseen hipocótilo largo y cotiledones aún no separados. Estas plantas etioladas fueron sometidas a distintos tratamientos luminosos, los cuales se indican en "Resultados". Después de realizar los tratamientos, las plántulas se dejaron en oscuridad un día y luego fueron procesadas como se indica posteriormente (V-4).

V- 2. Condiciones de los tratamientos luminosos para el estudio de la regulación por fitocromo.

En el caso de plántulas tratadas con:

- a) luz roja continua (RC): indica que se utilizó luz de $\lambda=660$ nm y de una intensidad de 30 μ mol. m^{-2} . s^{-1} . Se irradió durante 48 hs.
- b) luz roja lejana continua (RLC): se utilizó una $\lambda=730$ nm, 70 μ mol. m^{-2} . s^{-1} . Se irradió durante 48 hs.
- c) pulsos de luz roja (R): indica que se irradió durante 5 minutos con luz de una $\lambda=660$ nm y de una intensidad de 35 μ mol. m^{-2} . s^{-1} .
- d) pulsos de rojo lejano (RL): indica que se irradió durante 5 minutos con una luz de $\lambda=730$ nm y 42 μ mol. m^{-2} . s^{-1} .

e) Pulsos de rojo seguidos por pulsos de rojo lejano (R/RL): 5 min de luz roja ($\lambda=660$ nm, $35 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) seguidos inmediatamente de 5 min de luz roja lejana ($\lambda=730$, $42 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

f) Luz blanca continua (W): luz blanca $80 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, durante los días que se indican.

g) Oscuridad (D): permanecieron siempre en oscuridad.

Todos los tratamientos luminosos fueron realizados en el departamento de Ecología de la Facultad de Agronomía, UBA, por el Dr. Jorge Casal (1995; Casal *et al*, 1991)

V- 3. Condiciones de los tratamientos luminosos realizados para el estudio de la regulación por el receptor de luz azul.

Plantas etioladas fueron tratadas con luz blanca de $200 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y $400 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivamente. Otro grupo de plantas fue tratado con luz naranja de $300 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. En ambos casos los tratamientos fueron realizados al sexto día, y las plántulas fueron expuestas durante 3 hs a luz blanca o naranja de las intensidades indicadas.

V- 4. Procesamiento de las plántulas.

Se preparó el extracto proteico de las plántulas para determinar su actividad GUS mediante el ensayo fluorométrico. Para ello, todas las plántulas provenientes de una cajita, fueron recogidas con una pinza y transferidas a un tubo de plástico con émbolo, marca Kontes. Se agregó a cada tubo $50 \mu\text{l}$ de bufer de extracción (bufer fosfato 50 mM, $\text{pH}=7$, β -mercaptoetanol 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.1% y Tritón X100 0.1%) y se homogeneizó. Luego los tubos fueron colocados en hielo. Todo esto fue realizado en un ambiente oscuro y con una lámpara verde de baja intensidad (Nagy *et al*, 1988). Se centrifugó a 15800 g durante 15 min a 4°C , y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Se determinó la actividad GUS mediante el ensayo fluorométrico según se detalló anteriormente (IV-1,a).

VI- TRATAMIENTO CON NORFLURAZON.

Las semillas de las plantas de tabaco transformadas fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio 10% durante 5 min, se enjuagaron con agua estéril y se secaron sobre papel de filtro. Estas semillas fueron sembradas en medio agar MSS con una concentración final de Norflurazon 5 μ M (Norflurazon: 4-cloro-5-(metilamino)-2-[3(trifluorometil)fenil]-(2H)piridazinona). La germinación fue inducida exponiendo las semillas a luz blanca continua durante 16 hs. Luego se mantuvieron en un ambiente con un fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs de oscuridad, a 22°C. Se realizó la tinción histoquímica para la detección de la β -glucuronidasa en los días que se indican en cada caso.

VII- MEDIOS DE CULTIVO Y BUFERS UTILIZADOS.

- LB (Luria broth): 10 g de Bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl en 1 l de agua destilada.
- LB agar: Al medio descrito anteriormente se le agregó 15 g de agar por cada litro de medio de cultivo.
- SM: 5.8 g de NaCl, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 ml de Tris- HCl 1M, pH= 7.5 y 0.2% de gelatina.

Todos los medios antes descritos se esterilizaron en autoclave 15 minutos a 1.5 atm.

Bufere fosfato utilizado en los ensayos para detección de la β -glucuronidasa:

Bufere fosfato 250 mM, pH=7: Se mezclaron 19.5 ml de NaH_2PO_4 0.5M con 30.5 ml de Na_2HPO_4 0.5 M y se llevó a 100 ml finales con el agregado de H_2O bidestilada.

VIII- CEPAS BACTERIANAS.

E.coli LE392: *supE44 supF58 hsdR514 galK2 galT22 lacY1 metB1 trpR55,*

E.coli HB101 (Boyer *et al*, 1969): *supE44 hsdS20 (r_B⁻,m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 (Smr) xyl- mtl-1 supE44,*

E.coli DH5 α : *supE44 Δ lacU169(ϕ 80 lacZ Δ M15) hdsR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Agrobacterium tumefaciens LBA4404: esta cepa de *Agrobacterium tumefaciens* lleva las funciones de virulencia que facilitan la transferencia del T-ADN de los vectores binarios a las plantas. Esta cepa es resistente a estreptomicina.

IX- PLASMIDOS COMERCIALES DERIVADOS DE pBI.

Plásmido pBI101.2: Este es un plásmido comercial que deriva del vector binario pBIN19 de *Agrobacterium tumefaciens* (Jefferson *et al*, 1987b; Bevan, 1984). En este plásmido el gen *uidA* no posee promotor (Figura 7). Río arriba de esta región que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS) se halla el "polilinker". El fragmento Sst1-EcoRI de 260 pb que se halla río abajo del gen *uidA*, contiene la secuencia terminadora del gen de la nopalina sintetasa proveniente de un plásmido Ti de *Agrobacterium* (Bevan *et al*, 1983). El vector pBI101.2 es un plásmido de bajo número de copias, y confiere a las bacterias y plásmidos resistencia a kanamicina.

Plásmido pBI121: Este vector comercial es un derivado de pBI101, en el cual se clonó río arriba del gen que codifica la β -glucuronidasa, un fragmento de 800 pb

que contiene el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (Figura 8)(Jefferson *et al*, 1987b).

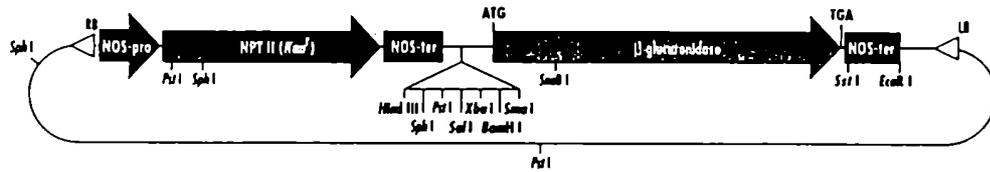


Figura 7. Plásmido pBI101.2. En este plásmido, la β-glucuronidasa (GUS) codificada por el gen *uidA*, no posee promotor. NOS-ter: secuencia terminadora del gen de la nopalina sintetasa; NOS-Pro: secuencia promotora del gen de la nopalina sintetasa; NPTII: región de código de la nopalina fosfotransferasa, enzima que confiere resistencia a kanamicina; RB: borde derecho; LB: borde izquierdo.

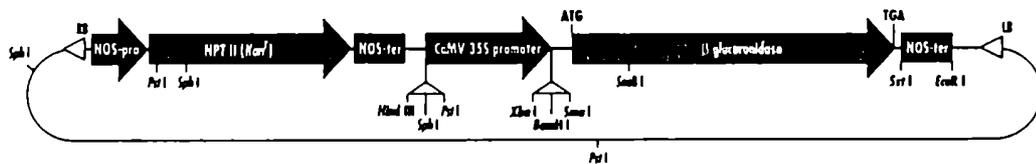


Figura 8. Plásmido pBI121. En este vector binario el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV) dirige la expresión de la β-glucuronidasa (GUS). NOS-ter: secuencia terminadora del gen de la nopalina sintetasa; NOS-Pro: secuencia promotora del gen de la nopalina sintetasa; NPTII: región de código de la nopalina fosfotransferasa, enzima que confiere resistencia a kanamicina; RB: borde derecho; LB: borde izquierdo.

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis fue aislar y caracterizar los genes *Lhc* en plantas de papa (*Solanum tuberosum*), dado que hasta la iniciación de este trabajo no se habían estudiado estos genes en esta especie. Una vez caracterizados, se continuo con el estudio de la regulación de la expresión de estos genes a nivel transcripcional. Se sabía que la transcripción de los genes *Lhc* en otras especies de plantas, era regulada por la luz y que la misma era específica de tejido. Mediante experimentos de "primer extension" y utilizando ARN aislado de diferentes partes de las plantas de papa estudié la especificidad de órgano. Por otra parte, en plantas de tabaco transformadas con el promotor de uno de los genes *Lhc* de papa fusionado a un gen reportero, analicé la regulación de la expresión por la luz así como también la especificidad de órgano.

RESULTADOS

RESULTADOS.

I - ESTRUCTURA DE LOS GENES *Lhc* DE PAPA.

I- 1. Selección y análisis de los bacteriófagos recombinantes que llevan los genes de interés.

Con el objetivo de estudiar la estructura y regulación de la expresión de los genes *Lhc* en plantas de papa, comenzamos aislando éstos genes a partir de la biblioteca genómica de *Solanum tuberosum* AMD5793 (Rosahl *et al*, 1986). Esta genoteca obtenida a partir de callos haploides, esta construída en el vector EMBL3, que es un derivado del bacteriófago λ . Se utilizó como sonda un fragmento de ADN correspondiente a las primeras 620 pb de la región de código del gen *Lhcb1*3* de *Nicotiana plumbaginifolia* (tabaco), el cual codifica un polipéptido perteneciente al LHCIIb, Tipo I (Castresana *et al*, 1987). Diez y seis bacteriófagos que daban hibridación positiva con la sonda fueron aislados, de los cuales se eligieron seis para analizar en mayor detalle. Estos bacteriófagos fueron propagados en *E.coli* LE392 y se aisló el ADN de los mismos. Estos ADNs (ADN 11, 41, 72, 81, 161 y 192) fueron tratados con la enzima Sal I, la cual posee sitios de corte en los "polylinkers" liberando así los brazos del bacteriófago EMBL3 del fragmento de ADN de la planta . Los productos de digestión de la enzima Sal I fueron corridos en un gel de agarosa 0.7%. Posteriormente, las muestras fueron desnaturalizadas, transferidas a nitrocelulosa e hibridadas con la sonda radiactiva de tabaco antes descripta (Figura 9).

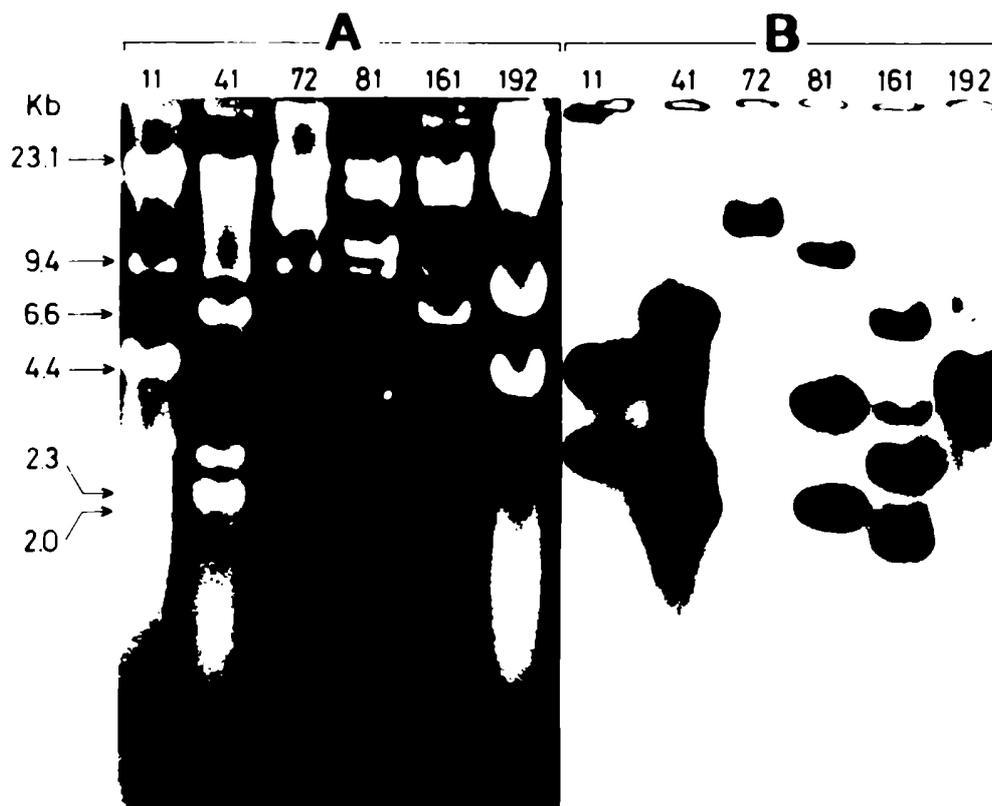


Figura 9. Análisis de los bacteriófagos recombinantes positivos. **A:** Los ADNs de los bacteriófagos 11, 41, 72, 81, 161 y 192 fueron digeridos con *Sall* y corridos en un gel de agarosa 0.7%. **B:** Las muestras fueron desnaturalizadas, transferidas a nitrocelulosa e hibridadas con el fragmento de 620 pb del gen *Lhcb1*3* de tabaco (Castresana *et al*, 1987).

Como puede observarse en la Figura 9A, los distintos bacteriófagos presentan diferentes patrones de corrida. Algunos fragmentos liberados tienen el mismo tamaño, mientras que otros presentan diversos polimorfismos. En la Figura 9B se observa una variación en la intensidad de los fragmentos del ADN de papa hibridados con la sonda. Esto puede explicarse por la presencia de secuencias

divergentes o la presencia de diferente número de genes en los fragmentos. Nuestros resultados favorecen la última posibilidad pero no descartan la primera. Como era de esperar, los fragmentos de 19 kb y 9 kb correspondientes a los brazos del bacteriófago EMBL3 no hibridaron.

Se eligió para continuar el estudio el bacteriófago recombinante 41 por ser el que presentó mayor número de bandas que hibridaban con la sonda de tabaco. El ADN de este bacteriófago contiene un inserto de 14.3 kb y produjo luego de la digestión con Sal I cuatro fragmentos de distinto tamaño: 6.7 kb, 3 kb, 2.4 kb y 2.2 kb los cuales hibridaron con la sonda radiactiva (Figura 9A y 9B, segunda calle). Con la idea de subclonar estos fragmentos, el ADN del bacteriófago 41 cortado con la enzima Sal I, se corrió en un gel de agarosa 0.7%. Se extrajeron los cuatro fragmentos de ADN de la agarosa y los mismos fueron subclonados en el sitio de Sal I del plásmido pUC19. El plásmido pUC19 tiene 2.7 kb y posee un gen de resistencia a ampicilina. Luego de incubar con la enzima T4 ligasa, se transformaron las bacterias *E.coli* HB101, las cuales fueron cultivadas en agar LB con una concentración final de 100 µg/ml de ampicilina. Con las colonias obtenidas se hicieron minipreparaciones del plásmido y se seleccionaron como posibles recombinantes aquéllas cuyos plásmidos poseían tamaños superiores a 2.7 kb. Se cortaron éstos plásmidos con Sal I y se seleccionaron aquéllas bacterias cuyos plásmidos liberaron los fragmentos buscados: 6.7 kb, 3 kb, 2.4 kb y 2.2 kb.

I- 2. Mapa físico del bacteriófago recombinante 41.

El ADN del bacteriófago recombinante 41 fue digerido con distintas enzimas de restricción. También se hicieron digestiones simples y dobles a partir de los fragmentos subclonados en pUC19. Los productos de estas digestiones se corrieron en geles de agarosa 0.7%. Los distintos geles fueron transferidos a nitrocelulosa e hibridados con la sonda de tabaco. Del análisis de los fragmentos liberados en cada caso, se desprende el mapa físico del bacteriófago recombinante 41 que se muestra en la Figura 10.

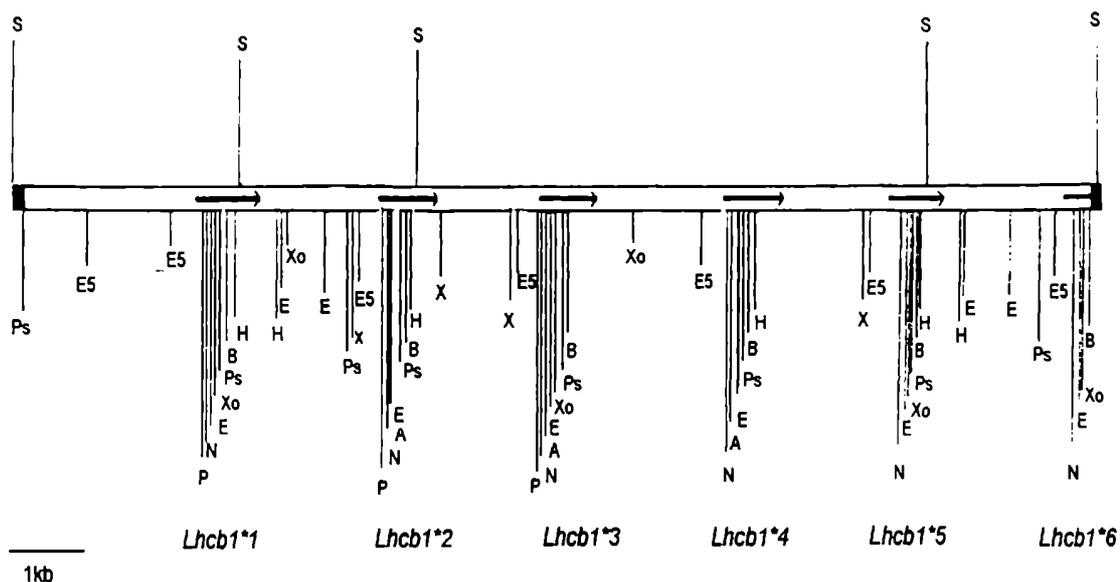


Figura 10. Mapa físico del bacteriófago recombinante 41. Se muestra el sitio de corte de distintas enzimas: *Apal* (A), *BamHI* (B), *EcoRI* (E), *EcoRV* (E₅), *KpnI* (K), *NcoI* (N), *PstI* (Ps), *PvuII* (P), *Sall* (S), *XbaI* (X), *XhoI* (Xo). Las flechas indican las regiones de código de los seis genes. Las zonas sombreadas a ambos costados forman parte de los "polylinkers" del bacteriófago EMBL3.

La organización de los genes *Lhc* contenidos en el bacteriófago se determinó por análisis del mapa físico y se confirmó por secuenciación.

El fragmento genómico de 14.3 kb contiene un "cluster" de seis genes los cuales fueron denominados: *Lhcb1*1*, *Lhcb1*2*, *Lhcb1*3*, *Lhcb1*4*, *Lhcb1*5* y *Lhcb1*6*. En la Figura 10 se muestra la localización y dirección 5'→ 3' de la región de código de los seis genes. Como puede observarse, todos poseen la misma orientación siendo la distancia entre las distintas regiones de código de aproximadamente 1.4 kb. Cada uno de los genes aislados posee su propio promotor localizado 5' río arriba de la región de código.

En la Figura 10 se observa que los sitios de restricción para NcoI, EcoRI, XhoI, PstI, BamHI y HindIII presentan un patrón conservado que se repite en tandem seis veces dentro del fragmento de ADN de papa aislado y el mismo coincide con las regiones de código de los genes. Los cortes por las enzimas de restricción son menos frecuentes en las regiones intergénicas que en las zonas de código.

II - ANALISIS DE LAS REGIONES DE CODIGO DE LOS GENES *Lhc* AISLADOS DE PAPA .

II- 1. Análisis de la estructura primaria.

Los seis genes: *Lhcb1*1*, *Lhcb1*2*, *Lhcb1*3*, *Lhcb1*4*, *Lhcb1*5* y *Lhcb1*6* fueron secuenciados. En la Figura 11, se muestran alineadas las secuencias de nucleótidos de las regiones de código de los distintos genes *Lhc* aislados de papa. Cada uno de estos genes posee 798 pb desde el codón de iniciación al de finalización de la traducción, excepto el *Lhcb1*6* el cual fue aislado en forma incompleta (411 pb). Estos genes no poseen intrones. También se secuenciaron alrededor de 100 bases del extremo 3' no codificante.

Figura 11

60

ATG GCA GCT GCT ACA ATG GCT CTT TCT TCC CCT TCT TTT GCT GGA CAG GCA GTG AAA CTT	1*2
... ..CC	1*1
... ..AC	1*3
... ..T... ..C	1*4
... ..T... ..GCC	1*5
... ..T.CGC	1*6

120

TCA CCA TCT GCC TCA GAA ATT TCT GGA AAT GGA AGG ATC ACT ATG AGA AAG GCT GTC GCC	1*2
... ..C ..GCAA	1*1
... ..C A... ..A	1*3
... ..A... ..C A... ..G ..A ..G ..A	1*4
... ..CCC	1*5
... ..CC A...	1*6

180

AAG TCT GCC CCA TCT AGC AGC CCA TGG TAT GGC CCT GAC CGT GTT AAG TAC TTG GGC CCA	1*2
..AAA	1*1
... ..TA	1*3
... ..TA	1*4
... ..AA	1*5
... ..A ..AA	1*6

240

TTC TCT GGT GAG TCC CCA AGT TAC TTG ACT GGT GAA TTC CCT GGT GAC TAT GGA TGG GAT	1*2
... ..CCC ..GG	1*1
... ..CCC ..G	1*3
... ..CCC	1*4
... ..CCC ..G	1*5
... ..CCC ..C	1*6

300

ACC GCT GGA CTT TCA GCA GAC CCT GAG ACC TTT GCC AAG AAC CGT GAA CTT GAG GTG ATC	1*2
... ..AC	1*1
... ..AC	1*3
..TAA	1*4
... ..AC	1*5
..TAC	1*6

Figura 11

360

CAC TGC AGA TGG GCT ATG CTT GGT GCT CTT GGA TGT GTC TTC CCT GAG CTC TTG GCC CGT	1*2
.....A.....T..	1*1
.....	1*3
.....G.....	1*4
.....A.....A.....	1*5
..T.....	1*6

420

AAC GGT GTC AAG TTC GGT GAG GCT GTG TGG TTC AAG GCC GGA TCC CAG ATC TTC AGC GAG	1*2
.....A..T.....A.....C.T...	1*3
.....T.....	1*4
.....TC.....	1*5
..T.....A..T.....	1*6

480

GGT GGA CTT GAC TAC TTG GGC AAC CCA AGC TTG GTC CAT GCA CAA AGC ATC TTG GCC ATT	1*2
..A.....G.....C	1*1
.....A.....T.....C	1*3
.....G.....C.....	1*4
.....G.....G.....C	1*5

540

TGG GCT TGC CAA GTT GTG TTA ATG GGA GCT GTT GAG GGA TAC CGT ATT GCA GGT GGA CCT	1*2
.....C..G.....C...A..T.....T.....	1*1
.....G.....C...A..T.....T.....	1*3
.....G.....C.....T.....	1*4
.....C..G.....A..T.....T.....	1*5

600

CTT GGT GAG GTC GTC GAC CCA CTC TAC CCT GGT GGC AGT TTT GAC CCA TTA GGT CTT GCT	1*2
.....T.....C.....C.....	1*1
.....T...A.....C.....C..C.....G.....	1*3
.....T A.....C.....C.....G.....C.....	1*4
..T.....C..C.....C.....	1*5

Figura 11

	660	
GAT GAT CCA GAG GCA TTT GCT GAG CTC AAA GTA AAG GAG ATT AAG AAC GGC AGA CTT GCT	1*2	
..A ..C ..GG	1*1	
... ..CGCT ..T	1*3	
... ..CGCT ...	1*4	
..A ..C ..GG	1*5	
	720	
ATG TTC TCT ATG TTT GGA TTC TTC GTT CAA GCC ATT GTT ACC GGA AAG GGT CCA TTG GAG	1*2	
... ..G	1*1	
... ..TG	1*3	
... ..G ..A	1*4	
... ..G ..A	1*5	
	730	
AAT CTT GCT GAC CAC CTT GCA GAT CCA GTC AAC AAC AAT GCA TGG GCC TTT GCC ACA AAC	1*2	
..CC ..C ..TC ..TT ..C ...	1*1	
..CC ..C ..TC ..C ... T.T .A.	1*3	
..CC ..C ..TCAC	1*4	
..CAC ..C ..TC ..C ... T.T .A.	1*5	
	798	
TTT GTT CCC GGA AAA TGA ATATCATAAAAACGTTCTCTAGATATTATTGTTTGATGGCTTTGTAAGTTTTAGTT	1*2	
... ..C *** ATATCATAATATAATTTTAAATTTGATTGTTTCGATGACCTGTAAGTAGTTGTGACTT	1*1	
... ..C *** AAATCTTAAACAATCTTAAATTTTCATTGTTTGATGGCCGTGTAAGTAGTTGTTG	1*3	
... ..T *** ATATTTTATACAATCTTAAAATTATATGTTTGAGTTGTAAGTTGTATAGGTAGTTT	1*4	
... ..T ***	1*5	
GTGATTTACTTGACAATAGAATGGATTTTTCTTAGTCCTGAATTC	1*2	
ACTTGATAATAGAATGGTTCTTTTTCCATATCCAATGATTGTGTAGTTCTGAGTT	1*1	
TGACTTACTTGATAATAGAATGGTTCTTTTTCCATATCCAATGATTGTGTAGTTT	1*3	
ACTGACATATATGAA	1*4	

Figura 11: Secuencia de bases de la región de código de los genes *Lhc* de *Solanum tuberosum*. Se muestra la secuencia de los genes *Lhcb1*2*, *Lhcb1*1*, *Lhcb1*3*, *Lhcb1*4*, *Lhcb1*5* y *Lhcb1*6* (esta última incompleta). En la figura se indica en la parte superior, la secuencia completa del gen *Lhcb1*2*. El codón ATG inicial corresponde a la primer metionina de la proteína CAB sin procesar. Los puntos indican identidad de los otros genes con la secuencia del gen *Lhcb1*2*. Los asteriscos señalan el codón de terminación. También se muestran alrededor de 100 bases del extremo 3' no codificante.

Al comparar las secuencias de los genes aislados se observa que la mayoría de los cambios de bases ocurren en la tercer base de los codones, siendo conservativos en cuanto al aminoácido que codifican. Los distintos genes poseen una identidad mayor del 94% (Figura 12). Los genes *Lhcb1*1* y *Lhcb1*5* son los que presentan mayor homología (97.9% de identidad), mientras que los genes *Lhcb1*4* y *Lhcb1*5* son los que poseen las mayores diferencias (94.28% de identidad).

	<i>Lhcb1*2</i>	<i>Lhcb1*3</i>	<i>Lhcb1*4</i>	<i>Lhcb1*5</i>
<i>Lhcb1*1</i>	94.78	95.27	94.40	97.89
<i>Lhcb1*2</i>		94.40	94.78	94.53
<i>Lhcb1*3</i>			94.53	95.40
<i>Lhcb1*4</i>				94.28

Figura 12. Porcentaje de identidad entre los distintos genes.

Los polipéptidos CAB deducidos a partir de las respectivas secuencias de bases se muestran en la Figura 13. Se observan muy pocos cambios de aminoácidos entre los distintos polipéptidos. Las mayores diferencias se observan entre los polipéptidos codificados por los genes *Lhcb1*1* y *Lhcb1*3*, los cuales poseen siete aminoácidos distintos. Los polipéptidos codificados por los genes *Lhcb1*1* y *Lhcb1*2* poseen la mayor homología ya que solo difieren en los aminoácidos de la posición 119 y 201.

Figura 13

MAAATMALSSPSFAGQAVKLSPSASEISGNGRITMR	36	CAB
.....		1*1
.....		1*2
.....T.....		1*3
...S.....T.....		1*4
...S.....		1*5
...S.....T.....		1*6

KAVAKSAPSSSPWYGPDRVKYLGPFSGESPSYLTGE	72	1*1
.....		1*2
.....		1*3
.....		1*4
.....		1*5
.....		1*6

FPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELEVIHCRWAMLG	108	1*1
.....		1*2
.....		1*3
.....		1*4
.....		1*5
.....		1*6

ALGCVFPPELLSRNGVKFGEAVWFKAGSQIFSEGGLD	144	1*1
...A.....		1*2
...A.....R.....		1*3
...A.....		1*4
...A.....V.....		1*5
...A.....		1*6

Figura 13

	180	
Y L G N P S L V H A Q S I L A I W A C Q V V L M G A V E G Y R I A G G P		1*1
.....		1*2
.....		1*3
.....		1*4
.....		1*5
	216	
L G E V V D P L Y P G G S F D P L G L A E D P E A F A E L K V K E I K N		1*1
..... D		1*2
..... N		1*3
..... I		1*4
.....		1*5
	252	
G R L A M F S M F G F F V Q A I V T G K G P L E N L A D H L A D P V N N		1*1
.....		1*2
.....		1*3
.....		1*4
.....		1*5
	265	
N A W A F A T N F V P G K		1*1
.....		1*2
..... S Y		1*3
..... Y		1*4
..... S Y		1*5

Figura 13. Secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes *Lhcb1*1*, *Lhcb1*2*, *Lhcb1*3*, *Lhcb1*4*, *Lhcb1*5* y *Lhcb1*6*. Los puntos indican identidad con la secuencia de aminoácidos correspondiente al gen *Lhcb1*1*. Los aminoácidos están numerados desde el extremo N-terminal de la proteína precursora.

Teniendo en cuenta el codón de iniciación ATG, estos genes codificarían para una proteína de 265 aminoácidos. Como se mencionó anteriormente en la "Introducción", los polipéptidos CAB sufren un proceso de clivado al pasar al interior del cloroplasto. En este caso por comparación de las secuencias de aminoácidos con otros polipéptidos CAB cuyo sitio de procesamiento ha sido estudiado, daría una proteína madura de 230 aminoácidos y un péptido señal de 35 aminoácidos. (Michel *et al*, 1990). Las proteínas precursoras codificadas por los diferentes genes *Lhcb1* de papa, tendrían pesos moleculares entre 28056 a 28170 Daltons, mientras que los pesos moleculares de las proteínas maduras serían de 24633 a 24733 Daltons.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con genes *Lhc* de otras plantas, encontrándose alto grado de homología con el gen *Lhcb1*2* de tomate (también conocido como Cab1B) (Pichersky *et al*, 1985). Los polipéptidos codificados por los genes *Lhcb1*1* y *Lhcb1*2* de papa, solo difieren en un aminoácido con respecto al codificado por el gen *Lhcb1*2* de tomate (residuos 119 y 201, respectivamente). Por otra parte, el polipéptido codificado por el gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum* difiere en nueve aminoácidos con respecto al CAB 21 de *Nicotiana tabacum* (Número de acceso en el Genbank: X52743); posee 17 aminoácidos distintos con respecto al CAB 7 de *Nicotiana plumbaginifolia* y 18 aminoácidos diferentes comparado con el CAB 22R de *Petunia hybrida* (Números de acceso: X58229 y XO2360, respectivamente).

En un trabajo publicado por Jansson *et al* (1990b) se compararon polipéptidos CAB de angiospermas pertenecientes al Tipo I y Tipo II de la antena LHCIIb. En ese trabajo se vió que algunos aminoácidos se conservaban más que otros y se determinó aminoácidos específicos de cada tipo en ciertas posiciones. Durante este estudio encontré que los productos de traducción de los genes *Lhc* de papa estudiados, poseen todos los aminoácidos que son específicos de los polipéptidos Tipo I de la antena LHCIIb, por lo que se llamó a los genes aislados *Lhcb1*, utilizando la nueva nomenclatura ("b" indica que pertenecen a la antena del PSII y "1" pues son Tipo I).

II- 2. Análisis de la estructura secundaria de los polipéptidos deducidos.

a) Péptido de tránsito.

Por comparación con otras secuencias, el péptido de tránsito de los polipéptidos CAB estudiados, se extendería desde el extremo N-terminal hasta la metionina 35 inclusive (ver Figura 13). En un principio se creía que el residuo de metionina 35 quedaba en el extremo N-terminal de la proteína madura, pero por medio de espectrometría de masa se reveló que la arginina que le sigue se encuentra en el extremo N-terminal de los polipéptidos maduros codificados por los genes *Lhcb1* y *Lhcb2* (Michel *et al*, 1990).

En la Figura 14 se muestra el gráfico de hidropatía del péptido señal deducido a partir de la secuencia de bases del gen *Lhcb1*2*. Como puede observarse, el péptido de tránsito es fuertemente hidrofóbico. Además, posee dos residuos cargados positivamente y un residuo cargado negativamente, lo que deja una carga neta positiva. Por lo tanto, es ligeramente básico lo cual facilitaría la interacción de la proteína precursora con la membrana del cloroplasto altamente ácida (Highfield *et al*, 1978).

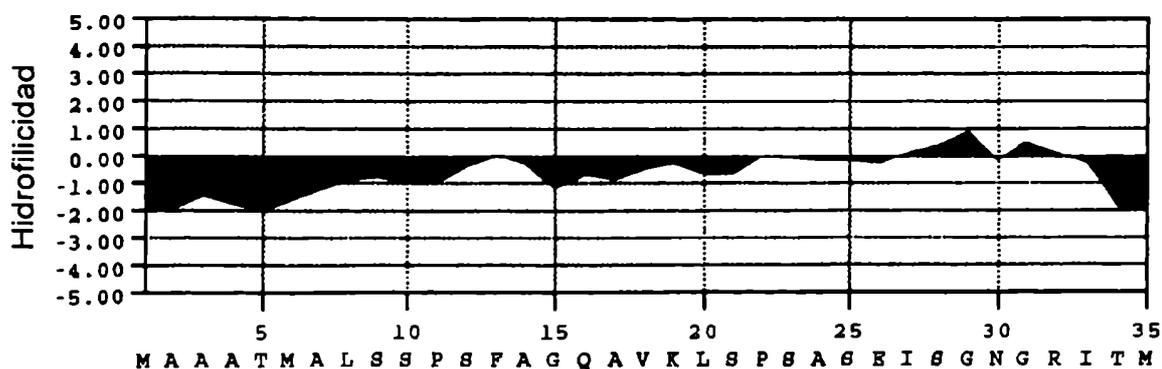


Figura 14. Gráfico de hidropatía del péptido de tránsito deducido del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum*. Este gráfico se realizó mediante el programa McVector. La tabla de hidrofobicidad de los aminoácidos que se usó fue la de Kyte y Doolittle (1982).

b) Polipéptido maduro.

En la Figura 15A se muestra el gráfico de hidropatía del polipéptido CAB maduro, codificado por el gen *Lhcb1*2*. La Figura 15B representa la estructura secundaria predicha para este polipéptido de 230 aminoácidos. El gráfico de estructura secundaria muestra las probables regiones de hélices α , hojas β y vueltas ("turn").

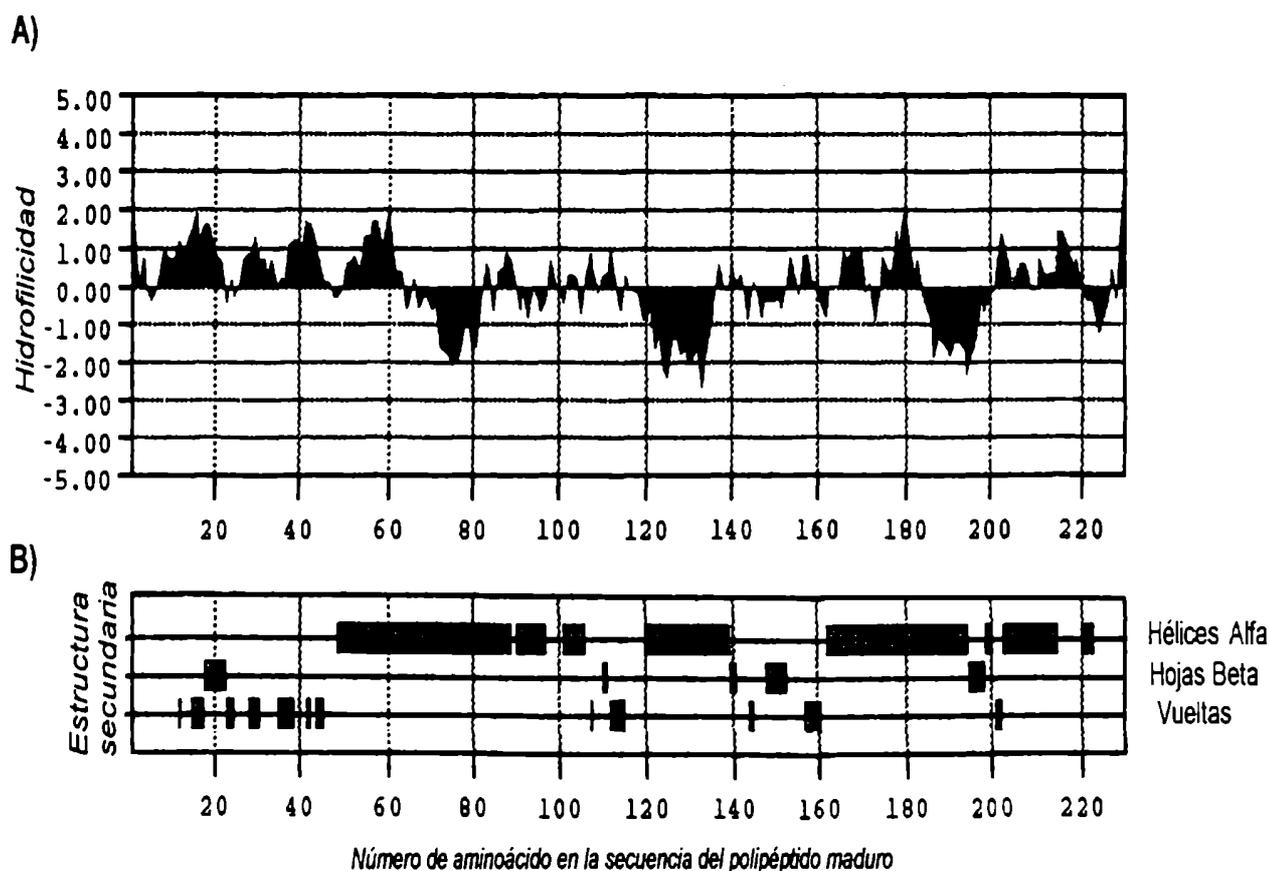


Figura 15. Análisis del polipéptido deducido a partir de la secuencia de bases del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum*. **A:** Análisis de hidropatía del polipéptido CAB maduro. Este gráfico se realizó de acuerdo a la tabla de hidrofobicidad de aminoácidos de Kyte y Doolittle (1982). **B:** Estructura secundaria deducida usando el programa McVector, según Robson-Garnier (Robson *et al*, 1976; Garnier *et al*, 1978).

Se observan tres regiones fuertemente hidrofóbicas de largo suficiente para atravesar la membrana tilacoide. Estas zonas hidrofóbicas poseen estructura secundaria de α -hélices. Estos resultados coinciden con los de Kuhlbrandt obtenidos a partir de estudios cristalográficos (Kuhlbrandt, 1994). Como se vió en el capítulo V de la Introducción, estas regiones de α -hélices transmembrana se denominan desde el extremo N-terminal de la proteína madura como: α -hélice B, α -hélice C y α -hélice A respectivamente. Las regiones que preceden las α -hélices transmembrana B y A son ricas en aminoácidos que promueven hojas β : glicina (G), prolina (P) y ácido aspártico (D). Como se puede observar en la Figura 15A, los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína CAB madura, son hidrofílicos. Se sabe que el N-terminal esta expuesto hacia el estroma del cloroplasto, mientras que el C-terminal esta hacia el lumen de los tilacoides (Kuhlbrandt, 1994).

En la Figura 16, se muestran las regiones de hélices α y hojas β en superposición con las secuencias de los polipéptidos CAB maduros. La α -hélice B posee 38 aminoácidos y se extendería desde la serina (S) 50 de la proteína madura hasta la glicina (G) 87. La α -hélice C es más corta ya que esta formada por 18 aminoácidos y se extiende entre la glutamina (Q) 120 hasta el ácido glutámico (E) 137. La α -hélice A de 31 aminoácidos se extendería desde la leucina (L) 162 hasta la fenilalanina (F) 192. Según los resultados del análisis de la estructura (Figura 15B), la α -hélice D posee 11 aminoácidos y se extendería desde el ácido glutámico (E) 205 hasta la valina (V) 215. De acuerdo a los datos obtenidos por cristalografía (Kuhlbrandt, 1994), la α -hélice D estaría en la membrana tilacoide paralela al plano de la misma y más cercana al lumen como se indica en la Figura 6.

Figura 16

RKAVAKSAPSSSPWY	G	P	D	R	V	K	Y	L	G	P	F	S	G	E	S	P	S	Y	L	T	G	36	CAB
	1*1
	1*2
	1*3
	1*4
	1*5
	1*6

EFPGDYGWDTAGL	α -hélice B										72													
	S	A	D	P	E	T	F	A	K	N	R	E	L	E	V	I	H	C	R	W	A	M	L	1*1
	1*2
	1*3
	1*4
	1*5
	1*6

GALGCVFPELLSRNG	V	K	F	G	E	A	V	W	F	K	A	G	S	Q	I	F	S	E	G	G	L	108	1*1	
	1*2
	1*3
	1*4
	1*5
	1*6

DYLGNP SLVHA	α - hélice C										144															
	Q	S	I	L	A	I	W	A	C	Q	V	V	L	M	G	A	V	E	G	Y	R	I	A	G	G	1*1
	1*2
	1*3
	1*4
	1*5

II- 3. Homología interna de los polipéptidos.

Las regiones de α -hélice A y B son muy similares en cuanto a su composición. A nivel de aminoácidos, las regiones comprendidas entre los residuos 50-77 de la α -hélice B y 165-192 de la α -hélice A muestran un 36% de identidad (Figura 17). Estas regiones si se las compara a nivel de nucleótidos presentan entre un 51-55% de identidad. Esta homología interna también ha sido observada en otros tipos de polipéptidos CAB de otras plantas (Hoffman *et al*, 1987; Karlin-Neumann *et al*, 1985; Cashmore, 1984).

		D	P	E		F	A			E						
Aminoácido		52	53	54		56	57			63						
base	253										297					
α -hélice B		TCA	GCA	GAC	CCT	GAG	ACC	TTT	GCC	AAG	AAC	CGT	GAA	CTT	GAG	GTG
α -hélice A		GCT	GAT	GAT	CCA	GAG	GCA	TTT	GCT	GAG	CTC	AAA	GTA	AAG	GAG	ATT
base	598															642
Aminoácido		167	168	169		171	172									178
			D	P	E		F	A								E
Aminoácido						R	A	M								G
						68	70	71								76
base	298															336
α -hélice B		ATC	CAC	TGC	AGA	TGG	GCT	ATG	CIT	GGT	GCT	CTT	GGA	TGT		
α -hélice A		AAG	AAC	GGC	AGA	CTT	GCT	ATG	TTC	TCT	ATG	TTT	GGA	TTC		
base	643															681
Aminoácido						183	185	186								191
						R	A	M								G

Figura 17. Alineamiento de las regiones correspondientes a la α -hélice B y α -hélice A del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum*. Se muestra la secuencia de bases y se señalan los aminoácidos deducidos cuando hay identidad entre ambas hélices.

La simetría que presentan la α -hélice B y A se manifiesta principalmente por la posición de pares de residuos voluminosos (F, M) y de residuos cargados (D, E, R). Se puede observar en la Figura 17 una simetría en cuanto a la posición de los siguientes aminoácidos:

	α -hélice B	α -hélice A
D (ácido aspártico)	52	167
P (prolina)	53	168
E (ácido glutámico)	54	169
F (fenilalanina)	56	171
A (alanina)	57	172
E (ácido glutámico)	63	178
R (arginina)	68	183
A (alanina)	70	185
M (metionina)	71	186
G (glicina)	76	191

III - ANALISIS DE LAS REGIONES 5' FLANQUEANTES DE LOS GENES Lhc AISLADOS DE PAPA.

Fueron secuenciadas aproximadamente 260 bases localizadas 5' río arriba de las regiones de código de los seis genes. En la Figura 18 se muestran dichas secuencias alineadas. Se utilizó un programa de comparación de secuencias que introduce espacios para lograr un mejor alineamiento. Mediante este alineamiento, estas regiones revelaron tener similitudes significativas. Sin embargo, esta homología es menor que la que poseen las secuencias que codifican el péptido de tránsito y la proteína madura.

TATGAGAGGACAATATTGGTTGTGTCCCTTGCT-GGAAAATT-GATGGATTGGAGATTGCtAA-aTG	PLhcb1*2
gATT-ttGGATTtGtGATTGCcAA-gTG	PLhcb1*1
CaTctT-aGAAAATtGGAaGGATTGGAGATTGCcAA-gTG	PLhcb1*3
TATGA-A-GACA-TATTaGaTGTGTCCCTTctT-GGAAattT-GATGGATTGGAGATTaCtAA-aTG	PLhcb1*4
CaTctT-GGAAAATtGGAaGGATTGGAGATTGCcAA-gTG	PLhcb1*5
TATGatAGGACAATATTGaaTGTGTCCCTT-CTtGGAAAATT-GATGGATTGGAGATT-C-AAga-G	PLhcb1*6
<p>IV CAAT III II I</p>	
TGcA-T-AATTGcTACA-A-gtaGGATCTTGATAgCCAATGAGATCATAGATATAGATtTCACTAGA	PLhcb1*2
TG-----A-TG-----g-A-g--GaATCTTGAcAtCCAATGAGAT-ATAGATATAGATATCgCTAGA	PLhcb1*1
TGcAtT-AATTGgaACA-c-atgGGATCTTGATaCCAATGAGATCATAGATATAGATATCACTAGA	PLhcb1*3
TGtAtT-AATTGcTAC--A-cagGGATCTTGATaCCAATGAGAcCATAGATATAGATATCAtTAGA	PLhcb1*4
-cat-T-AATTGcTACA-c-attGGATCTTGATaCCAATGAGATCATAGATATAGATATCA-TAGA	PLhcb1*5
TGcA-TtAATTGCcACAAtAg--GGATCTTGATaCCAATGAGATCATAGATATAGATATCACTAGA	PLhcb1*6
<p>TATA</p>	
TAA---G--GACTC--TTCCCTCTTtCTTAaT--CC-C-TATATATgGTGAATT--AATTCCTTg	PLhcb1*2
TAA---G--GACTC---TTCCC--TatCTTACT--ta-C-TATATATaGTGAAGT----TT--C-aa	PLhcb1*1
TAAttag--GACTCttTTCCCTCTTtaTTACT--CC-t-TATATATgGTGAATT--AATTCCTTg	PLhcb1*3
TAAttg--GACTa--TTCCtTCTTaaTTACT--CC-C-TATATATaGTGAATT--AAgTCCaTTg	PLhcb1*4
TAAttaa--GgCTC--TTCCCTCTTtCTTACT--CC-C-TATATATgGTGAATT--AtTTCCCTTa	PLhcb1*5
TAA---GaaGATC--TTTC--TCT--CT-AaTtAcCtCtTATATATtTGAAccccAA--C--T--	PLhcb1*6
<p>+1</p>	
TAACCTCATCT-CATCACAgC---C---ttCAACAATATTT-C-tTACCATCAAACACTcaacACTT	PLhcb1*2
TAACCTCagCT-CATCACaAc---t---aaCttttAcATaT-C-AaActAgC-AAC-CcctcACTT	PLhcb1*1
TAACCTCATCT-CATCACAgC---CaacttCAACAATATTT-C-ATACCATCAAACACT---tACTT	PLhcb1*3
TAAtTTCATCT-CATCACAtt---C---acagcCAATATTT-C-ATACCATCAAACACT---tACTT	PLhcb1*4
TAACCTCATCT-CATCgCacCagaC---ttCAACAATATTT-C-ATACCATCAAACACT---tACTT	PLhcb1*5
-AACTTCagCTtCATCACaAc---C-----AAC--T-TTgaCatT----TCAAACAccatcACTT	PLhcb1*6
↑	
TTCTC-T-TaATcTAAAtC ATG	PLhcb1*2
TcCTC-T-cttTATAAAcC ATG	PLhcb1*1
TTCTC-T-TgATATAAAtC ATG	PLhcb1*3
TTCTC-T-TgATATAAAtC ATG	PLhcb1*4
TcCTC-T-TgATATAAAcC ATG	PLhcb1*5
TTCTCcTgTtAT--AAAcC <u>ATG</u>	PLhcb1*6

Figura 18. Secuencias de las regiones localizadas río arriba de las zonas de código de los genes *Lhcb1* de *Solanum tuberosum*. Se señalan las cajas TATA y CAAT. Con una flecha se señala el sitio de iniciación de la transcripción. Las secuencias GATA se muestran numeradas: I, II, III y IV. Los espacios fueron introducidos para lograr un mejor alineamiento. Se utilizan letras en mayúscula para indicar identidad entre secuencias, y en minúscula en los casos en que no hay identidad. El codón ATG subrayado corresponde al inicio de la traducción.

En la Figura 18 se señala el sitio de iniciación de la transcripción, el cual fue determinado por "primer extension" para el gen *Lhcb1*2* según se detallará posteriormente. Las secuencias que se hallan localizadas río arriba del sitio de iniciación de la transcripción poseen las características típicas de los promotores eucariotas transcritos por la RNA polimerasa II, ya que poseen las secuencias TATA y CAAT.

La caja TATA esta localizada aproximadamente a -26 bases del sitio de iniciación de la transcripción, mientras que la secuencia CAAT se halla aproximadamente a -90 bases del mismo. Por otra parte, el sitio de iniciación de la transcripción esta localizado a 62-69 bases del sitio de iniciación de la traducción.

Las secuencias localizadas entre las cajas CAAT y TATA de los genes *Lhcb1* de papa son similares a las de otros promotores de los genes *Lhcb1*. Esta región ha sido propuesta como sitio de reconocimiento de varios factores que estarían involucrados en la expresión de los genes *Lhcb1* (Dunsmuir, 1985; Castresana *et al*, 1988). Cuatro secuencias GATA fueron detectadas en los promotores *Lhcb1* de papa estudiados. Tres secuencias GATA estan localizadas entre las cajas TATA y CAAT, mientras que la cuarta se encuentra localizada río arriba de la caja CAAT. Por otra parte la localización y espaciamiento de las secuencias GATA encontradas en los promotores de los genes *Lhcb1* de papa es similar a las descritas para genes *Lhcb1* de otras especies de plantas: GATAN2 GATAN6 GATA, siendo N= A, T, G ó C (Anderson *et al*, 1994). Los motivos GATA han sido encontrados en los promotores de los genes *Lhcb1* de todas las especies de plantas estudiadas (Castresana *et al*, 1987; Gidoni *et al*, 1989). Se encontró que los motivos GATA se unen "*in vitro*" a un factor llamado GI (Schindler *et al*, 1990) y se piensa que estarían involucrados en la regulación de la expresión de los genes *Lhc*.

IV- ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LOS GENES *Lhcb1* EN PLANTAS DE PAPA.

IV- 1. Estudio de la expresión de los genes *Lhcb1* en las hojas de plantas de 60 días.

Para determinar si los diferentes genes *Lhcb1* aislados se expresaban, se usó la técnica de "primer extension". Decidimos usar esta técnica en lugar de "Northern blot", debido a que la alta homología entre los distintos genes hacía difícil encontrar sondas que hibridaran específicamente con cada uno de ellos. Por comparación con genes *Lhcb1* de otras plantas (Piechula *et al*, 1991), se determinó el probable sitio de iniciación de la transcripción. Debido a que el número de bases que hay entre ese sitio y el sitio de iniciación de la traducción es distinto para los diferentes genes aislados (ver Figura 18), por medio de la técnica de "primer extension" podríamos distinguir la expresión de los distintos genes analizando el tamaño de los productos de la reacción. En la Figura 19 se muestran los productos de extensión de una reacción en la cual se utilizó el "primer 1" que es complementario a la región de código (residuos 13 a 30) de todos los genes *Lhcb1* aislados de papa. Este oligonucleótido hibrida con genes tipo *Lhcb1* y no hibrida con los ARNm correspondientes a otros tipos de genes *Lhc*. En este experimento se utilizó ARN total aislado de hojas de plantas de papa de 60 días. Los productos de la reacción de "primer extension" esperados para los genes aislados usando el "primer 1", son los siguientes:

Genes aislados	Largo del ADNc
<i>Lhcb1*1</i>	97 bases
<i>Lhcb1*2</i>	99 bases
<i>Lhcb1*3</i>	99 bases
<i>Lhcb1*4</i>	96 bases
<i>Lhcb1*5</i>	99 bases
<i>Lhcb1*6</i>	92 bases

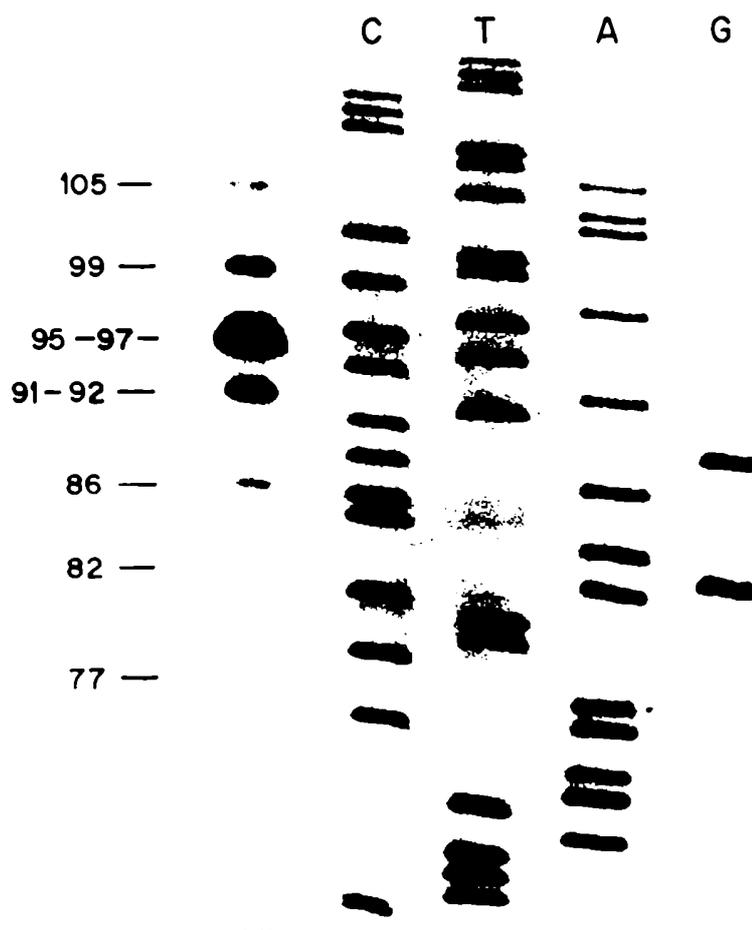


Figura 19. Productos de la reacción de "primer extension" obtenidos a partir de ARN de hojas de plantas de papa de 60 días. En esta reacción se utilizó el "primer 1", el cual hibrida con los ARNm de todos los genes *Lhcb1*. Se corrió como estándar de tamaño una reacción de secuencia (calles C, A, T, G).

Como se ve en la Figura 19, se obtuvieron por "primer extension" varias bandas. Las mismas poseen largos diferentes que se encuentran entre 105 y 77 nucleótidos. Sin embargo, se ven tres bandas de mayor intensidad correspondientes a productos de 99 nucleótidos, 95-97 nucleótidos y 91-92 nucleótidos. Estas bandas se corresponderían con los productos esperados para

nuestros genes. Probablemente, el fragmento de 99 nucleótidos corresponda a los productos de extensión de los genes *Lhcb1*2*, *Lhcb1*3* y *Lhcb1*5*. La banda intensa de 95-97 nucleótidos correspondería a los productos de los genes *Lhcb1*1* y *Lhcb1*4*, y la de 91-92 nucleótidos correspondería al del gen *Lhcb1*6*. Las bandas de 105, 86, 82 y 77 nucleótidos podrían corresponder a otros genes no aislados en este estudio. Las diferentes intensidades de las bandas indicarían que los distintos genes *Lhcb1* no se expresan al mismo nivel, o bien que hay más de un gen cuya distancia es la misma entre el sitio de iniciación de la transcripción y el lugar donde hibrida el "primer 1".

IV- 2. Expresión de los genes *Lhcb1* en distintos órganos de plantas de papa de 90 días.

Se estudió la expresión de los genes *Lhcb1* en las hojas, tallos y raíces de plantas de papa de 90 días. Se usó el "primer 1", que como se dijo anteriormente hibrida con las bases 13 a 30 de la región de código de todos los genes *Lhcb1* aislados (Figura 20).

Como se ve de la Figura 20 varios genes *Lhcb1* son expresados en las hojas, solo uno se expresó en los tallos y no se detectó expresión en las raíces. Esto indica que en las plantas de papa la expresión de los genes *Lhcb1* es específica de órgano.

Comparando la expresión en hojas y tallos (Figura 20: calles H y T) se observa que solo uno de los genes *Lhcb1* expresados en las hojas se expresa también en tallos. Además su nivel de expresión parece ser similar en ambos órganos. Los otros genes *Lhcb1* expresados en las hojas no fueron detectados en tallos. Esto sugiere que los mismos no se expresan en tallo o bien que su expresión es tan baja que no se detectan mediante la técnica utilizada. Además este resultado sugiere que aunque los genes *Lhcb1* presentan una alta homología en la región de código, muestran diferencias en su expresión.

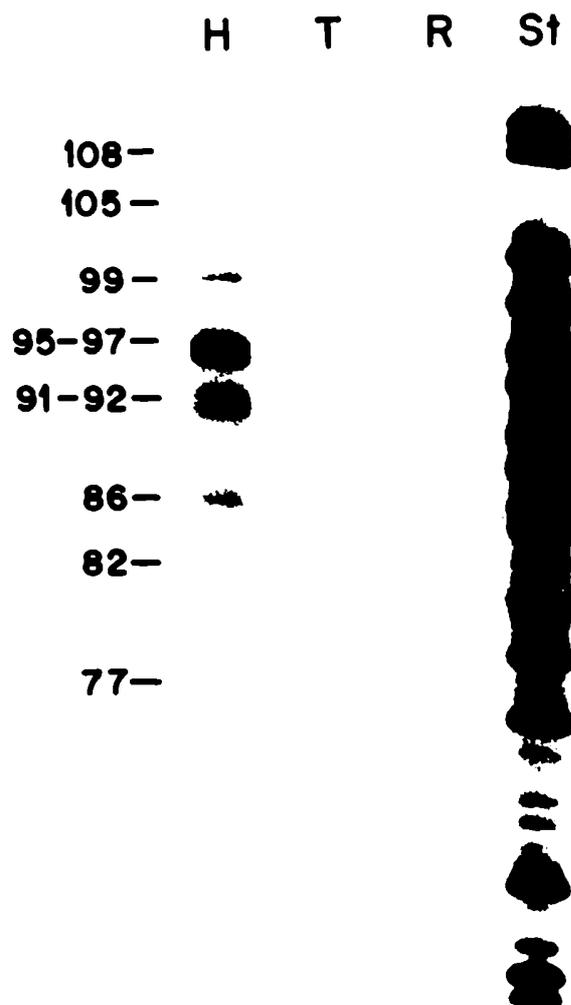


Figura 20. Expresión de los genes *Lhcb1* en los distintos órganos de las plantas. Se realizaron reacciones de "primer extension" utilizando ARN aislado de hojas (H), tallos (T) ó raíces (R) de plantas de papa de 90 días. Se utilizó el "primer 1" el cual es complementario a la región de código de los genes *Lhcb1* (bases 13 a 30). St: estándar de peso molecular.

Por otra parte, si se comparan los productos de extensión obtenidos a partir de ARN de hojas de plantas de 60 días (Figura 19) con los de plantas de 90 días (Figura 20, calle H), se puede ver que aparecen las mismas bandas de: 105, 99, 95-97, 91-92, 86, 82 y 77 bases. Sin embargo, al utilizar ARN de plantas de 90 días aparece además, una banda de 108 bases. Esto indicaría que hay genes *Lhcb1* que se expresan en ciertas etapas del desarrollo estando ausentes en otras. Por lo tanto, se puede concluir que hay una expresión diferencial de los genes *Lhcb1* durante el desarrollo de las plantas.

IV- 3. Expresión del gen *Lhcb1*2*. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción.

Para estudiar en mayor detalle la regulación de la expresión se eligió el gen *Lhcb1*2*, debido a que se había secuenciado en forma completa la región de 1.3 kb localizada río arriba de la región de código (Figura 22). Con el objeto de determinar si el gen *Lhcb1*2* se expresaba o no, se diseñó un oligonucleótido específico para detectar solo su expresión ("primer 2"). Como se puede ver en la Figura 21A, este oligonucleótido específico es complementario a una región de 19 bases que se hallan localizadas 5' río arriba del codón de iniciación de la traducción (bases 7 a 26). En otra reacción de "primer extension" se utilizó el "primer 1", con el que se detectan otros genes *Lhcb1* además del *Lhcb1*2*. Se utilizó ARN obtenido de hojas de plantas de 90 días (Figura 21B). Como se esperaba, varios productos de extensión aparecen con el "primer 1" no específico (Figura 21B, calle 1). Según se ve en la Figura 21B, calle 2, aparecieron dos productos de extensión de 63 y 62 nucleótidos de largo al utilizar el "primer 2". Es probable que la banda de menor tamaño sea producto de la degradación del ARNm correspondiente al gen *Lhcb1*2* en su extremo 5'. Puesto que el "primer 2" hibrida 36 nucleótidos río arriba del "primer 1", es muy probable que el producto de

extensión de 63 bases que se ve en la Figura 21B, calle 2, y el producto de 99 bases en la calle 1, resulten del mismo transcrito.

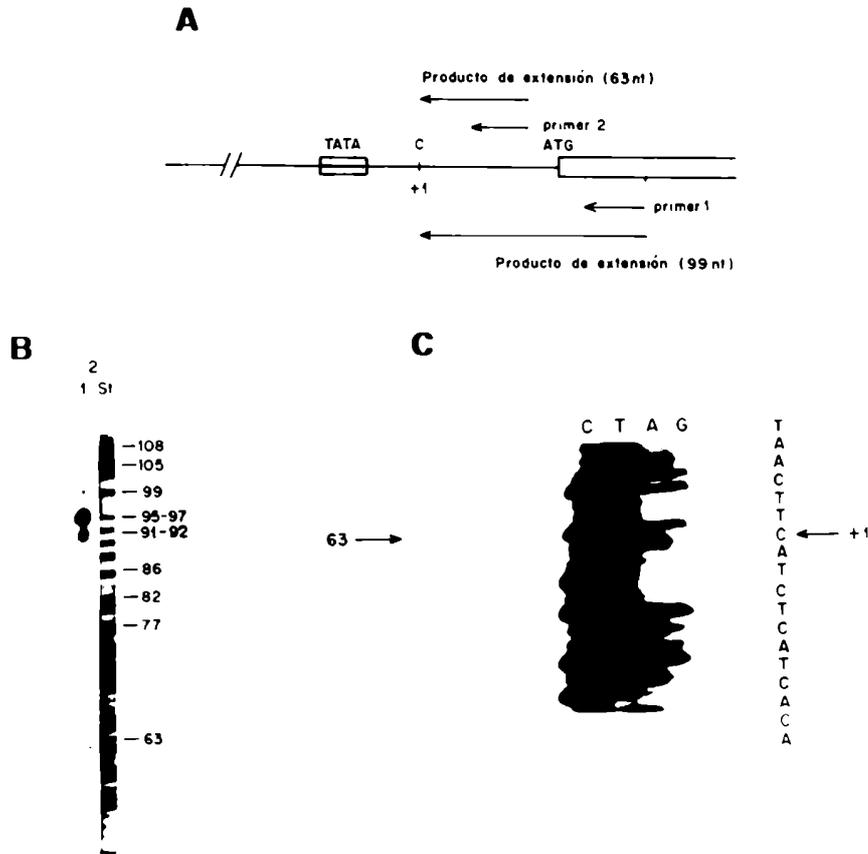


Figura 21. Productos de extensión obtenidos a partir de hojas de plantas de papa de 90 días. **A:** Mapa del gen *Lhcb1*2* donde se muestran los sitios de hibridación del "primer 1" y del "primer 2". El "primer 2" permite detectar solo la expresión del gen *Lhcb1*2*, mientras que con el "primer 1" se detecta la expresión de todos los genes *Lhcb1*. **B:** Calle 1, productos de extensión obtenidos al usar el "primer 1". Calle 2, productos de extensión obtenidos al usar el "primer 2". **C:** Se muestra en detalle la Figura 21B, calle 2 junto a una reacción de secuencia realizada con el mismo oligonucleótido ("primer 2"). Se señala con una flecha el sitio de iniciación de la transcripción del gen *Lhcb1*2*.

La mayor intensidad de la banda de 99 nucleótidos comparada con la de 63 bases puede ser explicada por la existencia de los productos de extensión correspondientes a los genes *Lhcb1*3* y *Lhcb1*5*.

La Figura 21C muestra en mayor detalle la Figura 13A, calle 2 junto con una reacción de secuencia. Basados en estos resultados, determinamos que el sitio de iniciación de la transcripción del gen *Lhcb1*2* esta localizado a 69 nucleótidos río arriba del codón de iniciación de la traducción (ATG). Esta posición coincide con la determinada para genes *Lhcb1* de otras plantas (Piechulla *et al*, 1991; Grob *et al*, 1987; Castresana *et al*, 1988). Nuestros resultados indican que la C de la secuencia CTTCAT es el primer nucleótido del ARNm correspondiente al gen *Lhcb1*2* (Figura 21C). Por lo tanto, el sitio de iniciación de la transcripción esta localizada a 26-31 bases de la caja TATA y a 88-92 bases de la secuencia CAAT. Se realizó también un análisis de "primer extension" utilizando ARN obtenido de tallos de plantas de papa de 90 días, en el cual se utilizó el oligonucleótido específico para detectar solo la expresión del gen *Lhcb1*2* ("primer 2"). Como se esperaba, tampoco se detectó la expresión del gen *Lhcb1*2* en los tallos al utilizar este oligonucleótido.

V- SECUENCIA DE LA REGION QUE SE HALLA LOCALIZADA RIO ARRIBA DE LA ZONA DE CODIGO DEL GEN *Lhcb1*2*.

Con el objeto de estudiar en mayor detalle la regulación de la expresión de los genes *Lhcb1*, se aisló y secuenció en forma completa la región que se halla río arriba de la zona de código del gen *Lhcb1*2*. Para ello la región comprendida entre el sitio de HindIII y PvuII (ver Figura 10) previamente subclonada en pUC19, fue cortada con la enzima EcoRI la cual divide al fragmento de 1.3 kb en dos fragmentos menores. Dichos fragmentos fueron subclonados y secuenciados en el

vector pBluescript KS⁺. Esta región fue difícil de secuenciar debido a la formación de estructuras secundarias, lo cual impedía que la enzima Sequenasa extendiera las nuevas cadenas en las reacciones de secuencia. Para solucionar este problema se secuenció utilizando vector simple cadena y además se aumentó la temperatura de las reacciones de marcado y de terminación. La Figura 22 muestra la secuencia obtenida de esta región localizada río arriba del gen *Lhcb1*2*. En ella se señalan las cajas TATA y CAAT así como también el sitio de iniciación de la transcripción determinado por "primer extension".

Como puede observarse, esta región presenta un alto contenido de A y T, y es debido a esto que se forman estructuras secundarias que interfieren en su secuenciación. El contenido de bases, expresados en porcentajes, es el siguiente: A 35.8%, T 31.2%, G 15.5% y C 17.5%.

El estudio de otros genes cuya expresión es regulada por la luz, como lo es por ejemplo la chalcona sintetasa y la pequeña subunidad de rubisco (rbcS), han permitido la identificación de secuencias de 6-15 bases presentes en los promotores, las cuales estarían involucradas en la regulación de la expresión de esos genes. En la Figura 22 se señalan, algunos de estos motivos presentes en el promotor del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum*. Se señalan las secuencias GATA, los motivos "GT" y la llamada caja "G" (5' TGGTTGTGTC 3'). El análisis de expresión del gen de la chalcona sintetasa en protoplastos, indicó que la caja "G" es necesaria para que haya una respuesta significativa a la luz (Schulze-Lefert *et al*, 1989). Por otra parte, se demostró que el factor citosólico GBF que se une a la caja G ("GBF: G-box binding factor") se transloca al núcleo en presencia de luz, mientras que en oscuridad permanece en el citosol (Harter *et al*, 1994).

-1302 -1292 -1282 -1272 -1262 -1252 -1242 -1232
 AAGCTTAAAA CTTGAATTTT CAGACCAGAT GAACTTATGG AATTCAGTTA ATTCTCGAGA AACAACTACT AAAATTAGTG-1223
 TAAAGTACTA ATGTTGAACA ACATGATGTT ATTACATGAT TCCTCATTTA TCTGTGCGAAA AGTGAGAGGA AATAAGAGGA-1143
 CATTGTTTCA TTTCACTACC AGAACATTGA AATTTCAATG ACAGGGGAAG AAAACCAATA TGTTTTGTAG TCTGAATGTA-1063
 GTAAGTAATA TATGAGTTTC CAGGTCCATA CAGTATGTCT CCTTTGAACA AATTCATAAA TTTCTTGTA AATCCTCGTG -983
 CCTCACATGT GGTACTATCT TTAGATTA AAA AGCATCCTTG ACAGATCCTT CAAAACAAGG TACATAGTAA TGACCAGAGC -903
 CAAAGGACAT ACATATGTAG TTAGAAGAAG ACACAAGTAC TGCTAAATAT GACACTTATT GGCAACAAAT TCAAGTTCTA -823
 TGCACTAATA ACTAAACAAT ATTTACACAA TCAAATTACT TAGTAAGTAA TTAAAGGTAA ATCACTTGAT AACATTAATC -743
 GGTAGTCTGG TAAAAATGG GAATTGACCT ACTATCACAC GTCAAAATTT ACTGATGTAA CTCTATTTC CCTTAATGCA -663
 GCGCAAAATT GTGATGCTGA TGAATCCAA CAAATTA AAA TCTTTGCTCA TATTCTTCTG AACAAAGCTCT TTCCAAGGCT -583
 CAGCATTGCT CATGTAGTAG TTAAGTAACA TGTACTAAGC CGCATTAAAT CTCTAAACCT AACAGTATTG TGAATGAGCA -503
 TAAACAATA TAACCTGTGT GGCTAACATA AACAACTTTG GTAATTAAGG TCTAATATAA TAAAGTTTCA ATCACATTGC -423
 TTTCCAAACA TAAAGATGCA TTATTAAGTT CCCAAAATTT ATGAATCAAG TAGTAATAAA TTTCAACTTT TCCTCAAATT -343
 TCCTAAACCA TAGTTCTACA TTGAATGAAG TATAGTGGTG GTATGTTTTA CCCTGCAGGT AGATAAAATC TAGAGAAATG -263
 CCAAGTGGAT AAAGATAGGG ATATCATATT GTAAGCTCAA CAAATCACAG GGCAGATTCC AATCCTTGTG GCAACATATG -183
 AGAGGACAAT TTGGTTGTGT CCCTTGCTG GAAAATTGAT GGATTGGAGA TGCTAAATGT GCATAATTGC TACAAGTAGG -103
 ATCTTGATAG CCAATGAGAT CATAGATATA GATTTCACTA GATAAGGACT CTTTCCCTCT TTCTTAATCC CTATATATGG -23
 TGAATTAATT CCCTTGTAAC TTCATCTCAT CACAGCCTTC AACAAATTTT CTTACCATCA AACACTCAAC ACTTTTCTCT +58
 TAATCTAAAT CATG

Figura 22. Secuencia de la región de 1.3 kb localizada río arriba de la región de código del gen *Lhcb1*2*. Se señalan las cajas CAAT y TATA. El sitio de iniciación de la transcripción determinado por "primer extension" se señala como +1. El doble subrayado destaca el sitio de iniciación de la traducción (codón ATG). También se muestran las secuencias GATA (subrayadas), la caja "G"(recuadro en línea llena) y las probables secuencias "GT"(recuadros en líneas punteadas).

VI- ESTUDIOS DE LA REGULACION DE LA EXPRESION EN PLANTAS DE TABACO TRANSGENICAS. REGION -1300+10 DEL GEN *Lhcb1*2* FUSIONADO AL GEN REPORTERO DE LA β -GLUCURONIDASA.

VI- 1. Estrategia general.

Para estudiar la regulación de la expresión de los genes *Lhcb1* de papa, el paso siguiente fue fusionar la región comprendida entre las bases -1300 a +10 (a partir del sitio de iniciación de la transcripción) del gen *Lhcb1*2* a un gen indicador. De esta forma el promotor del gen *Lhcb1*2* dirigiría la expresión del gen reportero facilitando así el estudio de la regulación de su expresión. En reglas generales, el gen indicador debe codificar una enzima que no este presente en la planta que se va a transformar con la construcción en estudio. Además la actividad de la enzima indicadora debe ser fácilmente medible.

Se utilizó el plásmido pBI101.2, diseñado por Jefferson (1987a), para subclonar el promotor del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum*. El plásmido pBI101.2 (Figura 7) posee como reportero el gen *uidA*, aislado de *E.coli*, el cual codifica la enzima β -glucuronidasa (GUS). El gen *uidA* es el indicador más usado en la actualidad debido a la simplicidad de su ensayo y a la variedad de sustratos disponibles. Por otra parte, la β -glucuronidasa es una enzima estable que no requiere cofactores (Jefferson 1987a, 1987b, 1989). Una vez que el promotor en estudio se fusionó al gen *uidA*, esta construcción se utilizó para transformar plantas de tabaco vía *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria Gram negativa presente en el suelo, capaz de producir tumores en la mayoría de las dicotiledóneas conocidos como agallas de corona. Actualmente esta bacteria es ampliamente utilizada como herramienta para la transferencia de genes foráneos en las plantas superiores. En su forma salvaje este microorganismo infecta a la célula vegetal a través de heridas y transfiere al genoma de la planta parte de su ADN: el T-ADN (ADN

transferible). Este fragmento de ADN que se transfiere se encuentra en un gran plásmido llamado Ti (inductor de tumores) (Hooykaas *et al*, 1992; Zambryski, 1992). El ADN transferido contiene genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de fitohormonas y metabolitos específicos denominados opinas. Como consecuencia de la expresión de éstos genes, las células vegetales transformadas forman tumores con capacidad de crecimiento autónomo, y excretan opinas las cuales son utilizadas por la bacteria como fuente de nitrógeno y carbono. La región del T-ADN esta flanqueada por dos repeticiones directas de 25 pb denominadas borde derecho (RB) y borde izquierdo (LB). Todo el material genético que se encuentra entre esos bordes es transferido e integrado al genoma de la planta. En el plásmido Ti existe fuera de la región del T-ADN, otra región muy importante, el operón *vir*, cuyos productos actúan en *trans* en el procesamiento y transferencia del T-ADN. Se sabe que los genes *vir* están en estado silente y su activación es inducida por ciertos factores de la planta presentes en las zonas heridas. Estos compuestos son derivados fenólicos como la acetosiringona y α -hidroacetosiringona (Winans, 1992).

La construcción de vectores para la transformación de plantas vía *Agrobacterium* ha aprovechado el hecho de que las únicas secuencias en *cis* necesarias para la transferencia del T-ADN son las repeticiones directas RB y LB. Un tipo de vectores actualmente muy usados para transformar plantas mediante *Agrobacterium* son los vectores binarios (An *et al*, 1988). Este tipo de vectores estan constituidos por dos plásmidos independientes: el derivado del plásmido Ti llevado por *Agrobacterium* y un vector intermediario (por ejemplo pBI101, pBI121, etc). El plásmido Ti desarmado (pAL4404 de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404), en el que se ha delecionado la región del T-ADN, contiene intacta la región *vir* cuyos genes confieren en *trans* las funciones de movilización al vector intermediario. Por otra parte, el vector intermediario posee los bordes del T-ADN, entre los cuales se encuentra el sitio de clonado y un marcador genético para seleccionar aquéllas plantas transformadas (por ejemplo, resistencia a kanamicina). La manipulación de genes que se desean introducir a la planta se realiza en *E.coli* y una vez que se

tiene la construcción de interés, el plásmido intermediario resultante se transfiere a *Agrobacterium*, ya que el mismo es capaz de replicarse en las dos bacterias.

Por lo tanto usando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que aportan las funciones *vir* en *trans* transformadas con los plásmidos derivados de pBI, es posible obtener plantas transgénicas fenotípicamente normales. La expresión de la β -glucuronidasa regulada por el promotor del gen *Lhcb1*2* de papa fue estudiada en las plantas transgénicas de tabaco bajo diferentes condiciones.

VI- 2. Fusión de la región -1300+10 del gen *Lhcb1*2* al gen reportero de la β - glucuronidasa.

El promotor del gen *Lhcb1*2* que se deseaba fusionar al gen *uidA* de pBI101.2, posee un sitio de corte para HindIII aproximadamente en la posición -1300 (ver Figura 10). Sin embargo del lado 3' no había ningún sitio de restricción adecuado que permitiera subclonarlo en pBI101.2. Por lo tanto se introdujo un sitio para la enzima de restricción BamHI cercano al sitio de iniciación de la transcripción. Para ello, como se esquematiza en la Figura 23, se amplificó el promotor de 1.3 kb mediante PCR utilizando un oligonucleótido parcialmente complementario a la región -11 a +18 (con respecto al sitio de iniciación de la transcripción). A este oligonucleótido se le introdujo un sitio de corte para la enzima de restricción BamHI, cercano a su extremo 5'. El otro oligonucleótido utilizado para amplificar el promotor fue el oligonucleótido comercial "reverse 1201" complementario al "linker" de pUC19, donde se hallaba subclonado el promotor. La región promotora del gen *Lhcb1*2* obtenida por PCR fue cortada con las enzimas HindIII y BamHI y ligada con en el plásmido pBI101.2, cortado previamente con las mismas enzimas. Una vez subclonado en pBI101.2 el fragmento se secuenció en los extremos para confirmar que estaba en el marco de lectura adecuado. En la Figura 23, se muestra la construcción realizada.

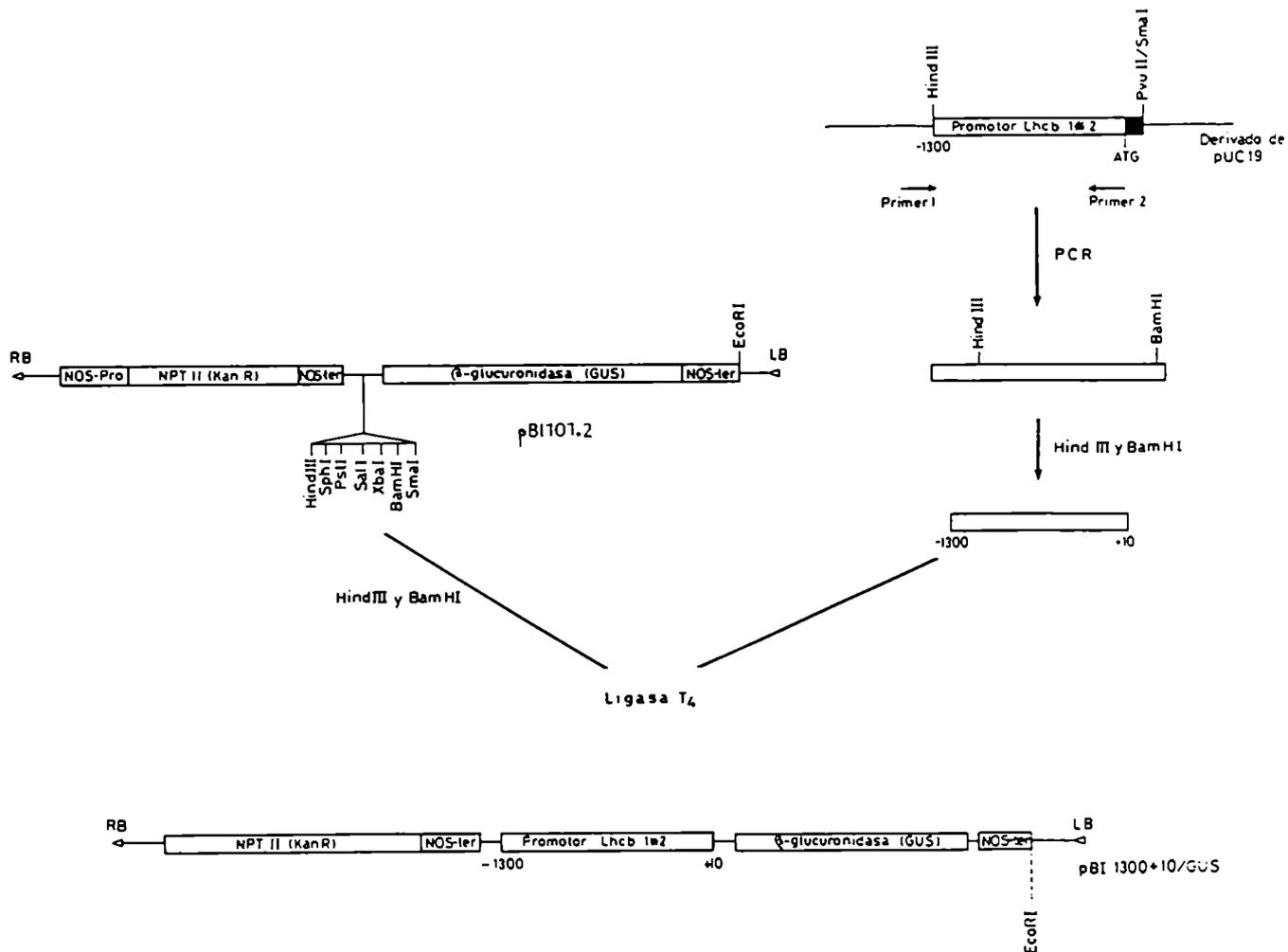


Figura 23. Esquema de la fusión de la región -1300+10 del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum* al gen reportero de la β-glucuronidasa (GUS). Se amplificó por PCR la región comprendida entre las bases -1300 a +10 (con respecto al sitio de iniciación de la transcripción) del gen *Lhcb1*2*. Se utilizó como templado en la reacción, un derivado de pUC19 en el que se había subclonado previamente la región comprendida entre los sitios HindIII y PvuII del gen *Lhcb1*2*. Se utilizó en la reacción de PCR, un oligonucleótido que es parcialmente complementario a la región -11 a +18, al que se le introdujo un sitio para BamHI (primer 2). El otro oligonucleótido utilizado fue el "primer reverse 1201" (primer 1). El fragmento resultante de la amplificación fue cortado con HindIII y BamHI y subclonado en pBI101.2 previamente cortado con las mismas enzimas. El plásmido resultante pBI-1300+10/GUS lleva el promotor del gen *Lhcb1*2* dirigiendo la expresión del gen GUS.

El plásmido pBI101.2 posee además del gen de la β -glucuronidasa, el gen de la enzima bacteriana neomicina fosfotransferasa II ó NPTII la cual fosforila antibióticos aminoglucósidos como la kanamicina, inactivándola (Bevan *et al*, 1983).

El producto de PCR también fue subclonado en pUC19, donde fue completamente secuenciado. Se comprobó así que no habían sido introducidas mutaciones por la Taq polimerasa en la reacción de PCR.

De esta forma el gen reportero de la β -glucuronidasa se puso bajo el control de la región promotora comprendida entre las bases -1300 a +10 del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum*. Al plásmido con esta construcción se lo llamó pBI -1300+10/GUS.

Con la construcción descrita se transformó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, mediante el método de Hofgen *et al* (Höfgen *et al*, 1988). Para seleccionar las transformantes, las bacterias se sembraron en medio agar LB con rifampicina, estreptomycin y kanamicina. La resistencia a rifampicina esta dada por un gen en el ADN cromosómico de la cepa de *Agrobacterium* LBA4404. La resistencia a estreptomycin esta dada por el plásmido pAL4404 que lleva la cepa receptora LBA4404 y que es el que aporta las funciones *vir*, y la resistencia a kanamicina es aportada por el plásmido derivado de pBI con el que se transformó.

VI- 3. Obtención de plantas de tabaco transgénicas para los estudios de regulación de la expresión.

Con la construcción promotor -1300+10/GUS en pBI 101.2, se transformaron plantas de tabaco vía *Agrobacterium tumefaciens* a partir de discos de hojas. Se eligieron plantas de tabaco para los ensayos de transformación debido a que se habían desarrollado técnicas para su transformación y además, las plantas de tabaco se hallan muy relacionadas con las plantas de papa ya que ambas pertenecen a la familia *Solanaceae*.

También se hicieron ensayos de transformación utilizando el plásmido pBI101.2 (Figura 7) y pBI121 (Figura 8). En el vector pBI121, la β -glucuronidasa esta bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (35S CaMV/GUS). El promotor 35S es un promotor fuerte que no muestra especificidad de tejido ni regulación por luz (Odell *et al*, 1985).

Se hicieron distintos controles del ensayo de transformación:

1) Control de regeneración: se simuló un cocultivo colocando los explantos en medio LB líquido sin agrobacterias, y posteriormente los explantos fueron colocados en medio de regeneración sin presión de selección.

2) Control del efecto de la cepa sobre la regeneración: se realizó el cocultivo de discos de hojas con agrobacterias de la misma cepa que se usó en la transformación pero sin el plásmido pBI, y luego los explantos fueron colocados: unos en medio de regeneración, y otros en medio de regeneración sin presión de selección.

3) Control de la efectividad del agente selectivo: para este tipo de control, los explantos sin tratar con *Agrobacterium* se colocaron en medio de regeneración.

Alrededor de cinco semanas después de la infección aparecieron los primeros brotes en los explantos infectados con las bacterias que llevaban la construcción promotor -1300+10/GUS. Estos brotes, los cuales se muestran en la Figura 24A, surgieron a partir de pequeños callos que se formaron en el borde de los discos de hojas, o sea en el sitio de herida.

El control de explantos infectados con bacterias que no llevaban el plásmido con resistencia a kanamicina y que habían sido colocados en el medio de regeneración en presencia del agente de selección, mostraron en cambio una clorosis generalizada (Figura 24B). En ningún caso se obtuvieron callos, ni hubo regeneración en los explantos correspondientes a este control. Una vez que aparecieron los brotes, los cuales se muestran en detalle en la Figura 25, los mismos se cortaron con un bisturí y se transfirieron a medio de enraizamiento. A cada brote se le adjudicó un número, dándole el mismo número a brotes provenientes del mismo explanto. Se fueron cortando los brotes que surgieron a lo largo de dos semanas.

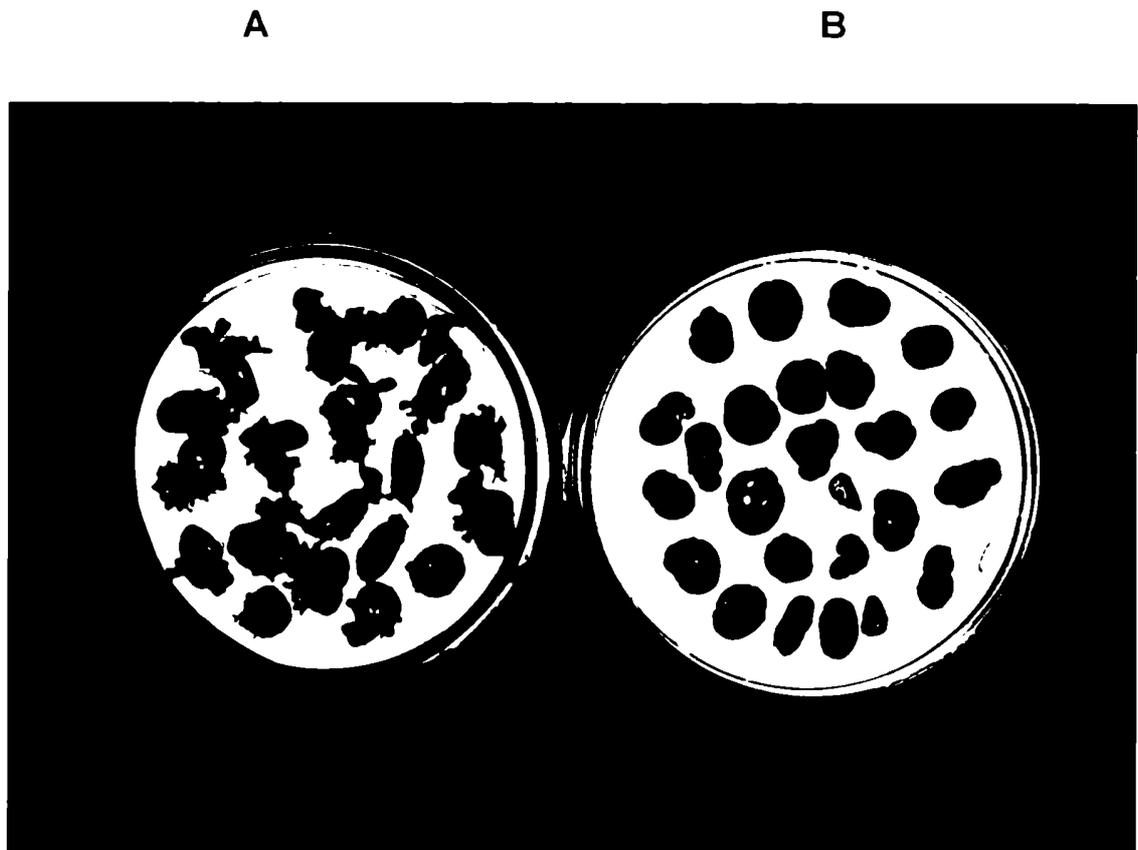


Figura 24. Discos de hojas de plantas de tabaco a las cinco semanas de la infección con *Agrobacterium* en el medio de regeneración (con el agente de selección: kanamicina). **A:** Se muestran los explantos con brotes desarrollados en los bordes, a las cinco semanas del cocultivo con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que lleva el plásmido pBI-1300+10/GUS. **B:** Discos de hojas infectados con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que no lleva el plásmido derivado de pBI (control 2 en medio con kanamicina).



Figura 25. Se muestran en detalle algunos brotes obtenidos al transformar los discos de hojas con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que lleva el plásmido pBI -1300+10/GUS.

La presión de selección (kanamicina) y la cefotaxine fueron mantenidas en los medios, en todos los pasajes realizados, hasta que la planta fue transferida a tierra.

Todos los controles colocados en medio no selectivo desarrollaron perfectamente, tanto para los explantos tratados o no con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (controles 2 y 1 respectivamente). Por lo tanto, el cocultivo con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* no tuvo efecto sobre la regeneración, así como tampoco influyó la cefotaxine agregada a los medios.

VI- 4. Análisis de las plantas transformadas.

a) Ensayo de la actividad GUS.

Con el objeto de determinar si las plantas crecidas en presencia de kanamicina eran realmente plantas transformadas, se realizó el ensayo fluorométrico para la cuantificación de la actividad GUS (Jefferson, 1987a). En líneas generales este método consiste en incubar un extracto proteico de la planta, durante distintos tiempos, en presencia de 4-metilumbeliferil β -D-glucurónido (MUG). La β -glucuronidasa hidroliza este compuesto produciendo ácido glucurónico y 7-hidroxí-4-metilcumarina (4-MU). El 4-MU en solución tiene un pico de excitación a 365 nm (UV) y un pico de emisión a 455 nm (azul).

Después de 8 a 10 semanas a partir del pasaje del brote a medio de enraizamiento, se obtuvo una planta bien desarrollada (Figura 26).



Figura 26. Plantas de tabaco transformadas con pBI-1300+10/GUS regenerada en medio con kanamicina. Se muestra una planta de tabaco transformada de 8 semanas, previamente a ser transferida a tierra.

En la Figura 26 se muestra una planta de 8 semanas y se puede observar que la misma posee raíces y hojas bien verdes. Se realizó el ensayo fluorométrico utilizando extractos de hojas de éstas plantas.

Como una medida preliminar de selección de las plantas transformadas se tuvo en cuenta la actividad de β -glucuronidasa. De 40 plantas cultivadas "in vitro" en medio con kanamicina, el 52% presentaron actividad β -glucuronidasa mayor de 14 pmol MU/min.mg. Se determinó la actividad GUS de varias plantas controles no transformadas, y se vio que la misma presentaba valores de alrededor 6 -11.5 pmol MU/min.mg. Las plantas que se habían desarrollado en presencia de kanamicina pero que presentaban valores de actividad GUS cercanas al valor de las plantas controles, fueron descartadas. En la Tabla 1 se muestran los valores obtenidos de la actividad GUS de las plantas seleccionadas, transformadas con la construcción promotor -1300+10/GUS.

Como puede observarse, los valores de la actividad GUS en las distintas plantas son muy variados. Esto puede deberse al distinto número de copias del ADN foráneo integrado por genoma, a los diferentes sitios de integración, a la metilación diferencial (Peerbolter *et al*, 1986), al distinto estado de desarrollo de las plantas (ya que varían en dos semanas) ó a la posición de la hoja utilizada para la medición de la β -glucuronidasa (posición con respecto al ápice de la planta).

Cuando se midió la actividad GUS en las plantas transformadas un mes después de la primera medición, la misma había aumentado notablemente. Esto se debe a que la β -glucuronidasa es muy estable y se acumula. Por lo tanto para estudiar la regulación de la expresión utilizando este gen reportero, hay que estandarizar muy bien las condiciones de los ensayos ya que esto constituye una desventaja puesto que bajos niveles de expresión pueden aparecer artificialmente altos (Gallagher, 1992).

Planta número	Actividad GUS Pmol MU/mg.min
3	96.38
5 ₁	273.63
5 ₂	360.73
5 ₃	440.91
6 ₁	298.47
6 ₂	124.90
7 ₂	20.76
8 ₂	166.71
8 ₃	149.87
9 ₂	241.58
10 ₁	84.71
10 ₂	89.81
12 ₁	18.80
12 ₂	135.85
13 ₁	15.07
15 ₁	63.09
15 ₂	99.76
17 ₁	37.59
17 ₂	26.52
18 ₁	60.75
18 ₂	82.22
19 ₁	51.98
19 ₂	17.80
1 (planta sin transformar)	2.61
2 (planta sin transformar)	11.54
20 (planta transformada con pBI101.2)	4.30
14 (planta transformada con pBI121)	258.10

Tabla 1. Actividad GUS de las distintas plantas de tabaco. Se indica la actividad GUS de 23 plantas transformadas con el promotor -1300+10 del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum* fusionado al gen reportero de la β -glucuronidasa. También se muestran los valores de actividad GUS de plantas controles sin transformar (plantas # 1 y 2). La planta # 20 fue transformada con pBI101.2. En la planta # 14 el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor dirige la expresión del GUS.

Las plantas de ocho semanas que mostraron resistencia a kanamicina y actividad GUS mayor que el valor de las plantas sin transformar, fueron transferidas a tierra y mantenidas a 25°C con fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs de oscuridad.

En la Figura 27 se muestran plantas transgénicas a los cuatro meses de su pasaje a tierra. A la derecha se observa una planta de tabaco transformada con la región promotora -1300+10 del gen *Lhcb1*2* fusionada al GUS. A la izquierda, en la Figura 27, se muestra una planta de tabaco transformada en la cual el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor regula la expresión del gen GUS. Estas plantas poseen un fenotipo similar a las plantas del control de regeneración. Las plantas transformadas (T1) fueron autofecundadas y se cosecharon sus semillas.



Figura 27. Plantas de tabaco transformadas. A la derecha se muestra la planta 5₃, la cual esta transformada con el promotor -1300+10 del gen *Lhcb1*2* de papa fusionado al GUS. A la izquierda se observa una planta transformada con pBI121. Ambas plantas poseen un fenotipo similar al de las plantas controles sin transformar obtenidas a partir de discos de hojas.

b) Análisis por "Southern blot".

Se eligieron cinco plantas para realizar ensayos de "Southern blot". En la Figura 28A se muestra la corrida en un gel de agarosa 0.4% de los ADNs extraídos de algunas plantas digeridos con la enzima de restricción HindIII. Esta enzima posee un solo sitio de corte en la construcción promotor-1300+10/GUS y el mismo se halla en el promotor en la posición -1300. El otro sitio de corte para HindIII será por fuera del ADN transferido. El ADN del gel se transfirió a nitrocelulosa y se hibridó con una sonda radiactiva correspondiente a un fragmento de 544 bases correspondientes al gen *uidA*. Esto nos permitió establecer el número de copias integradas por genoma. La autoradiografía se muestra en la Figura 28B. Como puede observarse las plantas 18₁ y 13₁ muestran una sola banda radiactiva, lo que indica que estas plantas poseen una sola copia de la construcción integrada en sus genomas. Las plantas 12₂ y 15₁ muestran dos bandas radiactivas, lo que implica que se integraron dos construcciones. La planta 17₂ muestra tres bandas y por lo tanto posee tres copias integradas.

Se esperaba que las bandas presentes en la autoradiografía tuvieran un tamaño no menor de 3.4 kb, ya que el promotor en estudio posee 1300 bases, el gen *uidA* tiene 1870 bases mientras que la terminación NOS (NOS-ter) posee 260 bases. Sin embargo, una de las bandas radiactivas que presentó la planta 15₁ posee un tamaño menor a 3.4 kb, lo que sugiere que una de las construcciones no se integró en forma completa.

c) Análisis por PCR.

Otra forma de confirmar que las plantas estaban transformadas, fue mediante PCR utilizando oligonucleótidos complementarios al gen *uidA*. Uno de los oligonucleótidos utilizados hibrida con el gen *uidA* entre las bases 13 a 31 a partir del codón de iniciación de la traducción ("primer 53"), mientras que el otro hibrida entre las bases 539 a 557 ("primer 54").

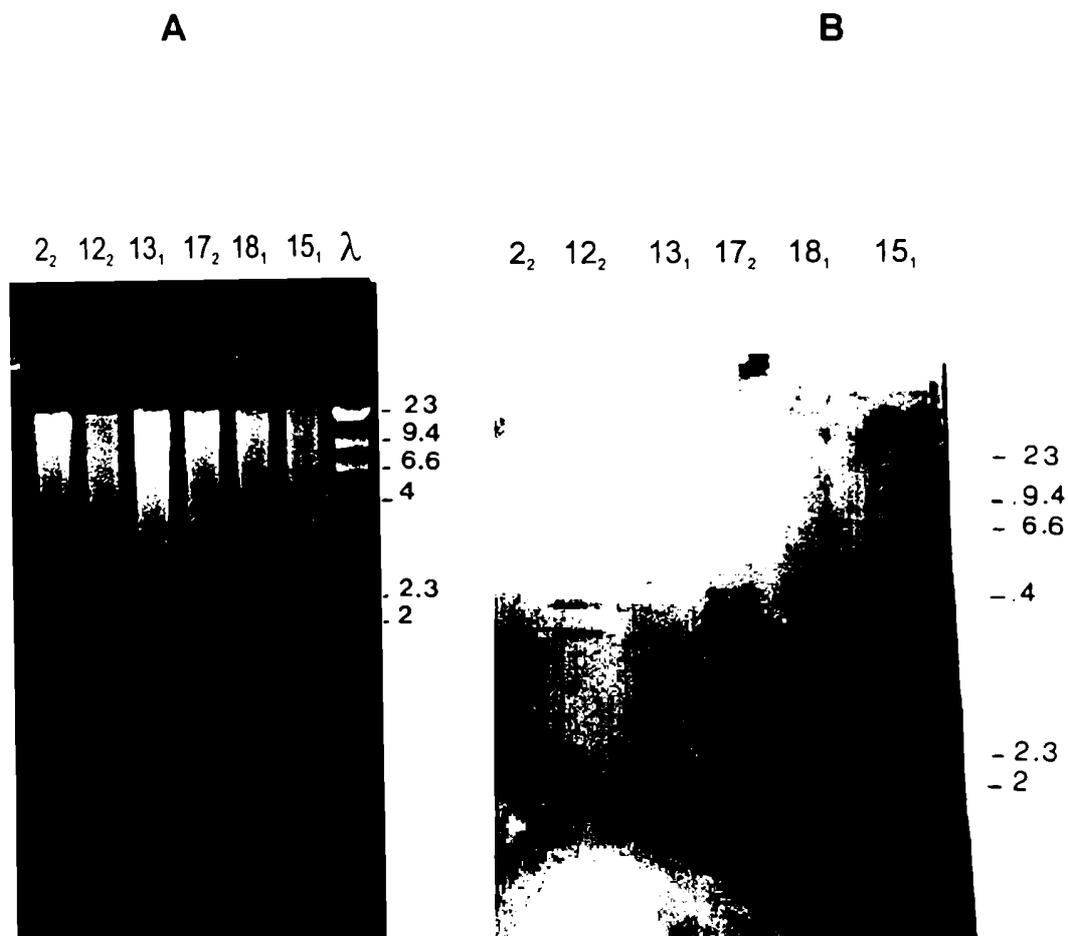


Figura 28. Análisis por "Southern blot" de las plantas de tabaco transformadas con pBI-1300+10/GUS. Se analizaron las plantas 12₂, 13₁, 17₂, 18₁ y 15₁, **A:** 20 µg de ADN obtenidos a partir de las hojas de las plantas, fueron digeridos con HindIII y corridos en un gel de agarosa 0.7%. **B:** El ADN del gel fue desnaturalizado, transfido a nitrocelulosa e hibridado con una sonda correspondiente al gen GUS. Se muestra una foto de la autoradiografía.

En la Figura 29 se observa el producto de PCR de 544 pb esperado al utilizar como templado ADN extraído de la planta 8₂ y 5₃. Cuando se utilizó el ADN extraído de una planta control no transformada, esta banda no aparece (Figura 20, calle 2). Como controles positivos, se realizaron reacciones de PCR en las que se utilizó como templado para la reacción los plásmidos pBI-1300+10/GUS y el plásmido pBI-690+10/GUS (éste último plásmido se describe posteriormente). Si bien este método permite detectar con facilidad la presencia del gen *uidA*, no da información sobre el número de inserciones presentes en el genoma de la planta.

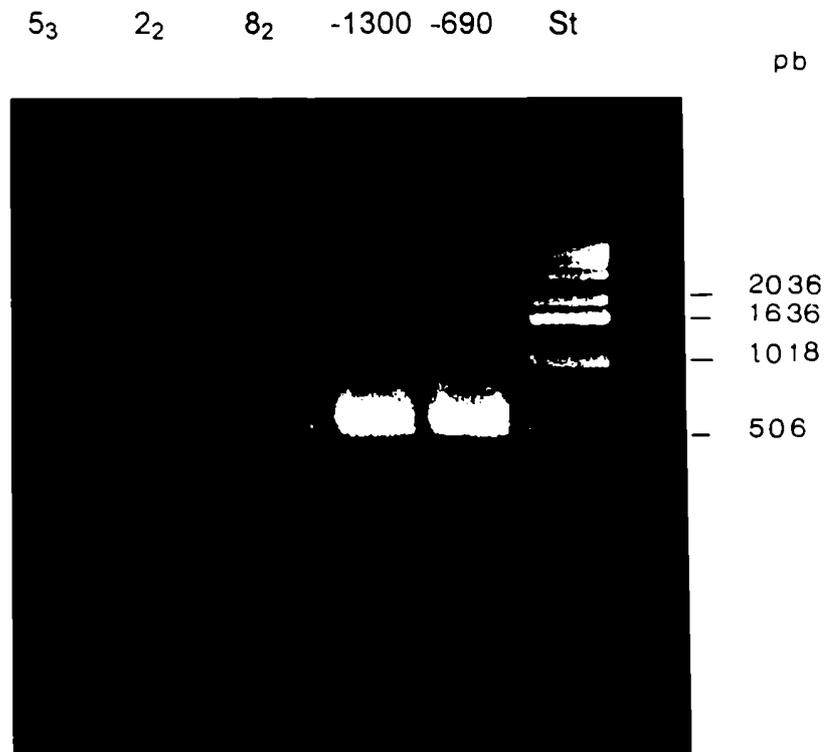


Figura 29. Análisis por PCR de las plantas de tabaco transformadas con pBI-1300+10/GUS. En todas estas reacciones de PCR, se utilizaron oligonucleótidos complementarios al gen *uidA* ("primers" 53 y 54). Se utilizó ADN extraído de las hojas de las plantas: 5₃ (calle 1) y 8₂ (calle 3). En la segunda calle se sembró el producto de una reacción de PCR en la que se utilizó ADN extraído de una planta control no transformada (2₂). En la calle 4 y 5 se sembraron los productos de reacciones de PCR en las que se usó como templado los plásmidos pBI-1300+10/GUS y pBI-690+10/GUS, respectivamente. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 2%. St: estandard de peso molecular.

VI- 5. Análisis de la herencia de la construcción: promotor -1300+10/GUS en la progenie T2.

Para demostrar que el ADN con el que se transformaron las plantas de tabaco estaba integrado en forma estable en el genoma, se analizó la progenie T2. Se espera que la construcción con la que se transformaron las plantas T1 (promotor -1300+10/GUS) sea heredada por su progenie. Con este objeto, se realizó un análisis de la segregación del marcador de selección (resistencia a kanamicina) utilizando las semillas de las plantas T1 obtenidas por autofecundación. De las 23 plantas T1 que eran resistentes a kanamicina y que mostraron tener actividad GUS, solo 14 dieron semillas. Estas semillas fueron sembradas en medio MSS con kanamicina. Después de cuatro semanas, se determinó el número de plantas de tabaco resistentes al antibiótico. En la Figura 30 a la derecha, se observa la progenie T2 proveniente de una de las plantas transformadas con el promotor -1300+10 del gen *Lhcb1*2* de papa fusionado al GUS en medio MSS con kanamicina. Todas las semillas germinaron ya que para ello utilizan sus reservas. Cuando las reservas se agotan, la planta utiliza los nutrientes del medio. Como se puede observar en la Figura 30 a la derecha, después de cuatro semanas en medio con kanamicina, a partir de una planta T1 transformada se obtuvieron dos fenotipos distintos. Algunas plantas T2 poseen cotiledones amarillos y no presentan desarrollo de raíces ni de hojas. Estas plantas al poco tiempo murieron: son plantas K^S . En la misma placa, hay otras plantas que poseen hojas y raíces y muestran un desarrollo normal. Estas son las plantas que heredaron la construcción promotor -1300+10/GUS y son por lo tanto K^R . Es debido a la segregación de los cromosomas durante la meiosis en las plantas T1, que se pueden observar plantas T2 sensibles a la kanamicina (K^S) y plantas T2 resistentes (K^R) y por lo tanto transformadas. Se determinó el número de plantas (T2) K^S y K^R . Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico de X^2 considerando como hipótesis que se habían integrado una, dos o tres copias de la

construcción en estudio en cromosomas que segregan independientemente. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2.

Como control se utilizaron semillas de una planta no transformada sembradas en medio con kanamicina. A las cuatro semanas, todas las plántulas desarrolladas en este medio poseen cotiledones e hipocótilos amarillos y no muestran desarrollo de raíces. Todas éstas plántulas son Km^S (Figura 30, a la izquierda).

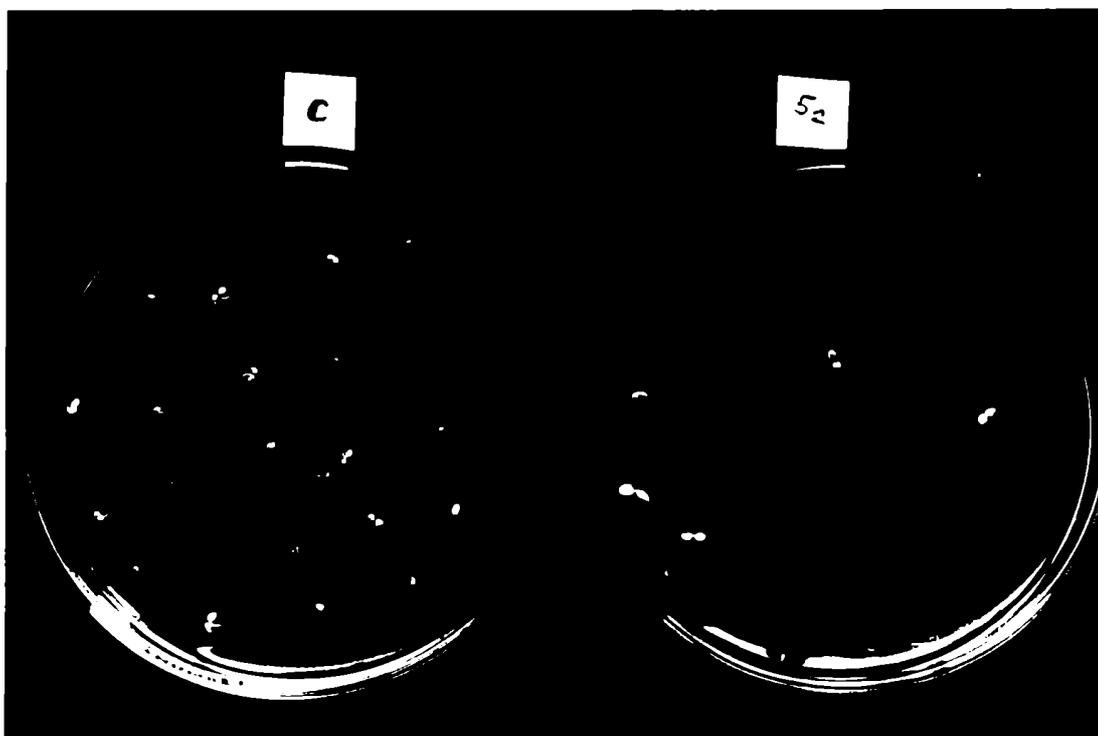


Figura 30. Ensayo de segregación en la progenie T2. A la derecha , progenie de una planta transformada con la construcción promotor-1300+10/GUS (planta 5₂) en medio MSS con una concentración final de 100 µg/ml de kanamicina. A la izquierda (C), plántulas no transformadas en el mismo medio.

Planta #	K ^R	Número de plantas		Valor de X ² para			Hipótesis más probable
		Km ^S	Una copia	Dos copias	Tres copias		
3	22	2	2.72	0.00	3.51	Una, dos o tres copias	
5 ₁	35	16	0.79	50.67		Una copia.	
5 ₂	67	16	1.16	21.85		Una copia.	
5 ₃	14	9	1.75	36.93		Una copia.	
6 ₁	101	7	18.78	0.0099	13.91	Dos copias.	
7 ₂	53	0	16.36	2.54	0.13	Dos o tres copias.	
8 ₂	89	21	1.75	28.80		Una copia.	
8 ₃	39	15	0.099	39.12		Una copia.	
12 ₁	40	14	0.00	32.4		Una copia.	
12 ₂	50	6	5.36	1.22	25.03	Una o dos copias.	
15 ₁	45	11	0.595	14.93		Una copia.	
15 ₂	40	16	0.21	14.93		Una copia.	
17 ₂	39	17	0.595	51.5		Una copia.	
18 ₂	17	7	0.056	17.78		Una copia.	
4 ₂	44	12	0.21	19.5		Una copia.	

Tabla 2. Segregación en la progenie T2 del carácter de resistencia a kanamicina. Las semillas obtenidas por autofecundación de las plantas transformadas con la construcción promotor -1300+10/GUS, fueron sembradas en medio MSS con kanamicina. Después de cuatro semanas, se determinó el número de plantas K^R y K^S. Todas son plantas transformadas con el promotor -1300+10/GUS excepto la planta 4₂, la cual fue transformada con pBI121. Mediante la prueba de X² se probaron las siguientes hipótesis: que una planta T1 lleve una, dos o tres copias de la construcción con la que se transformó. En los cálculos de X² fue usada la corrección de Yates debido al pequeño número de plantas de la progenie analizadas.

El valor de X² para un intervalo de confianza de 0.995 y un grado de libertad es X² 0.995= 7.879. Se rechaza la hipótesis propuesta si el valor de X² obtenido es mayor que dicho valor. Un valor mayor 7.879, indica que hay una probabilidad de 0.5% de rechazar la hipótesis propuesta siendo esta verdadera.

VI- 6. Estudio de la expresión específica de órgano del promotor -1300+10/GUS.

Con el objetivo de estudiar la expresión del promotor -1300+10/GUS en los distintos órganos de las plantas transgénicas de tabaco, se realizó el ensayo histoquímico para la detección de la β -glucuronidasa. La tinción histoquímica de la β -glucuronidasa (Gallagher, 1992) permite la localización de la enzima que se halla bajo el control del promotor en estudio en los distintos tejidos de la planta. En este ensayo, una sección del tejido a analizar se incubaba en una solución con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3 indolil- β -D-glucurónico (X-Gluc). La reacción consiste básicamente en el clivaje del X-Gluc por la β -glucuronidasa, lo cual produce un precipitado azul insoluble (dicloro-dibromo índigo). La reacción procede a través de un intermediario inestable, el cuál luego sufre una dimerización oxidativa al ClBr-índigo azul intenso.

En la Figura 31A se observa el resultado de la reacción histoquímica realizada en una hoja de una de las plantas de tabaco transgénica (T1) en la cual el gen GUS se halla bajo el control de la región promotora -1300+10 del gen *Lhcb1*2* de papa. Se observa un color azul intenso que pone de manifiesto la fuerte expresión de la β -glucuronidasa en éste órgano. En la Figura 31B, se muestra el resultado del mismo ensayo realizado en una hoja de una planta control no transformada. En la Figura 32A se muestra la reacción histoquímica positiva realizada en un sépalo de una de las plantas T1 transformadas con la construcción en estudio. En la Figura 32B, se puede observar que no se detectó expresión GUS en los pétalos de las mismas plantas. En la Figura 33 se muestra la reacción histoquímica para la detección de la β -glucuronidasa, realizada en una raíz y en un corte transversal de tallo de una planta de tabaco transgénica T2. Como puede observarse por el color azul, la β -glucuronidasa se expresó en el tallo pero no hubo expresión en la raíz.

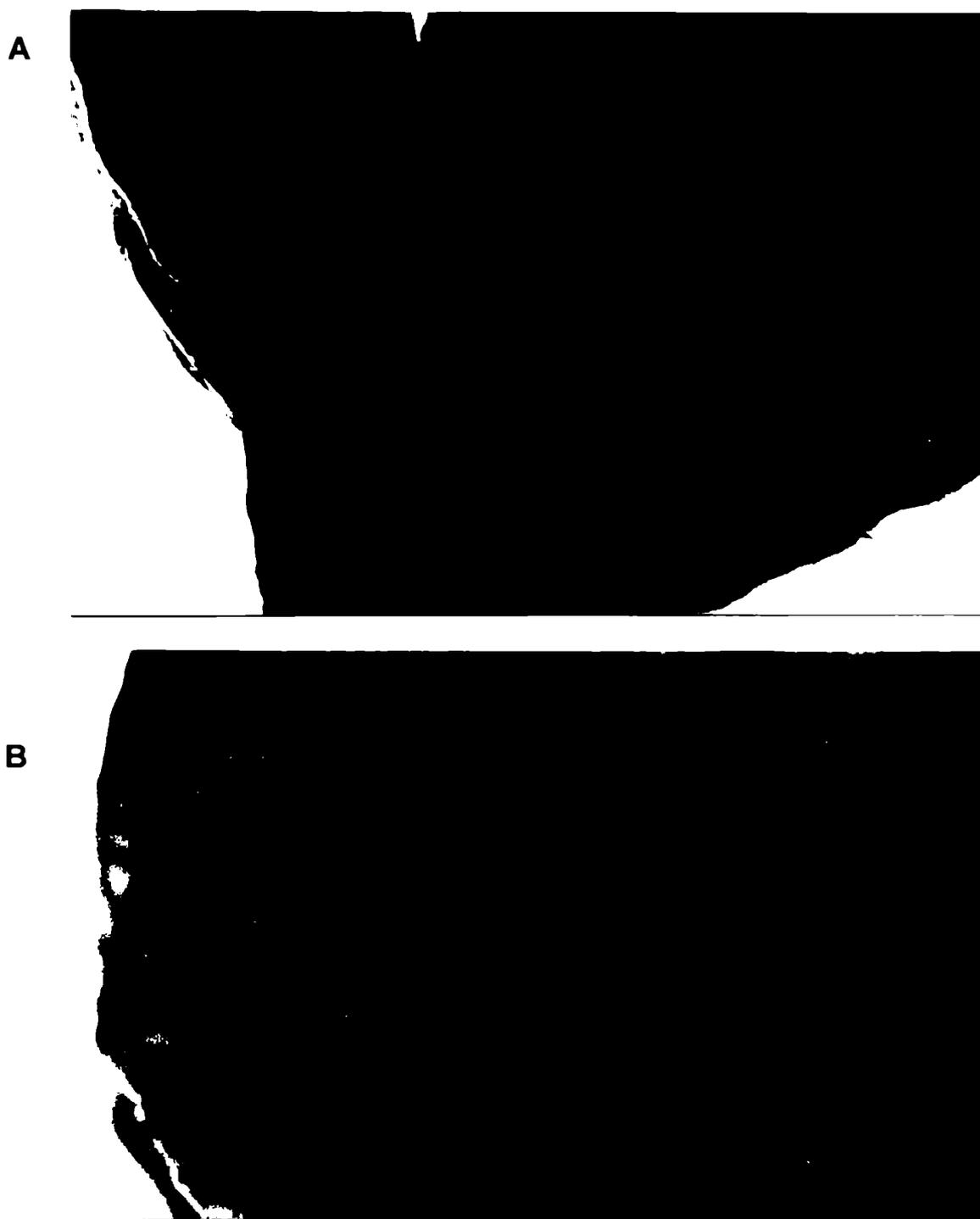


Figura 31. Expresión de la β -glucuronidasa en las hojas de las plantas de tabaco transformadas con pBI-1300+10/GUS. **A:** Se realizó la reacción histoquímica para la detección de la β -glucuronidasa en una hoja de una planta transformada con pBI-1300+10/GUS (planta 5₃). El color azul intenso indica que el gen reportero, el cual se halla bajo el control del promotor de 1.3 kb del gen *Lhcb1*2* de papa, se expresa en ese órgano. **B:** Se muestra el resultado del ensayo histoquímico realizado en una hoja de una planta de tabaco no transformada.

A



B



Figura 32. Ensayo histoquímico realizado en sépalos y pétalos de las plantas de tabaco transformadas con pBI-1300+10/GUS. **A:** Se realizó la reacción histoquímica en los sépalos de una planta transformada (planta 5₃). El color azul indica que hay expresión en ese órgano. **B:** Ensayo realizado en un pétalo de la misma planta.

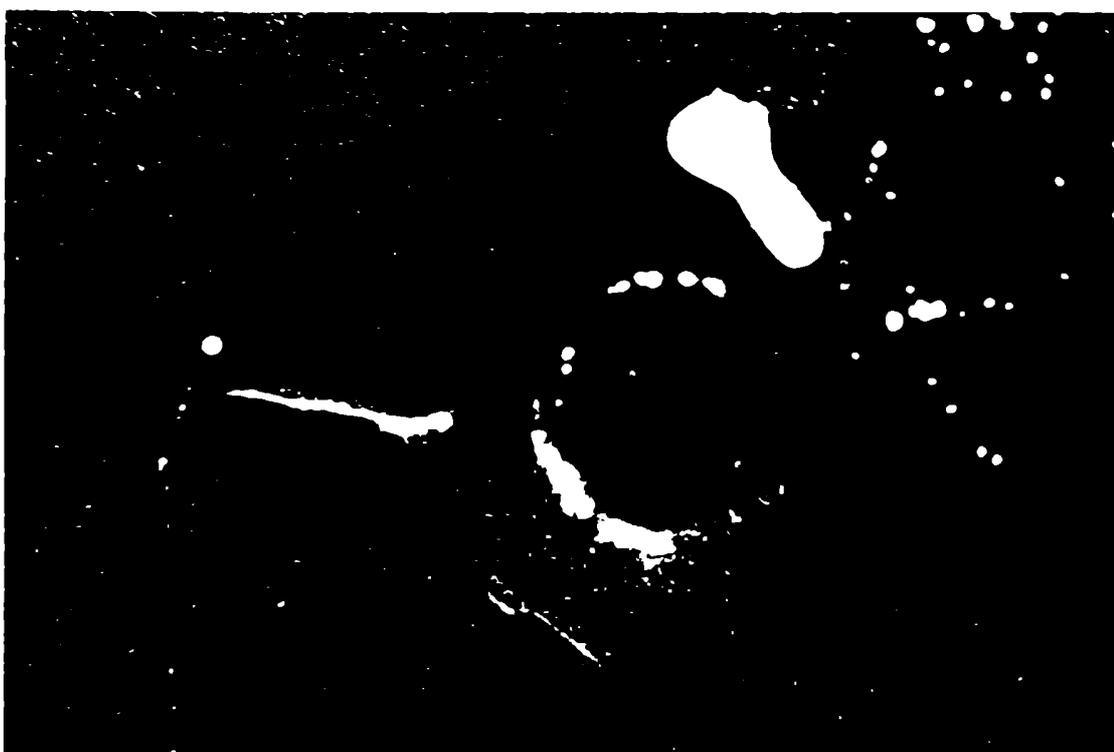


Figura 33. Estudio de la expresión en hojas, tallos y raíces de las plantas de tabaco transformadas con pBI-1300+10/GUS. Se realizó el ensayo histoquímico en un corte transversal de tallo. Se utilizó un tallo de una planta joven (T2), de aproximadamente 60 días. También se realizó el ensayo en un segmento de hoja. El color azul indica que hay expresión en esos órganos. No se detectó expresión en las raíces de la misma planta.



Figura 34. Ensayo histoquímico realizado en una hoja y raíces de una planta de tabaco transformada con pBI121 (promotor 35S CaMV/GUS). **A:** Ensayo realizado en una hoja. **B:** Ensayo realizado en las raíces.

Por lo tanto el promotor -1300+10 del gen *Lhcb1*2* de papa dirige la expresión del gen reportero en las hojas, tallos y sépalos de las plantas transgénicas de tabaco. No se observa expresión en las raíces ni en los pétalos de las plantas. Tampoco se detectó la presencia de β -glucuronidasa en los estambres ni en los pistilos.

Cuando el ensayo histoquímico se realizó en una planta transformada en la cual el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor dirige la expresión del GUS, el patrón de expresión fue distinto. Como se ve en la Figura 34, se observa expresión del gen reportero en las hojas y raíces. También se observó expresión en el tallo. Esto indicaría que el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor no posee especificidad de órgano como sí lo muestra el promotor del gen *Lhcb1*2*.

Estos resultados indican que la región promotora del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum* es la que determina la expresión específica de órgano en las plantas transformadas con la construcción promotor-1300+10/GUS.

Con la idea de tener una información más precisa, mediante el ensayo fluorométrico se cuantificó la expresión del gen reportero en los distintos órganos de plantas de tabaco de 30 días. La Tabla 3 muestra los valores obtenidos de la actividad GUS de las plantas de tabaco T2 determinada en hojas, tallos y raíces.

Planta #	Hojas	Tallos	Raíces
5 ₁ (3)	1270.4 \pm 462	291.7 \pm 78.1	0
6 ₁ (3)	1261.0 \pm 784.2	295.5 \pm 111	0
18 ₂ (1)	417.8	147.8	0
8 ₂ (1)	351.6	176.1	0
4 ₂ (1)	47.24	33.95	46.2

Tabla 3. Actividad GUS en los distintos órganos de las plantas transgénicas de tabaco. Plántulas T2 que llevan la construcción promotor -1300+10/GUS fueron cultivadas en esterilidad en frascos con medio MSS durante 90 días, en un ambiente con un fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs oscuridad. El ensayo fluorométrico fue llevado a cabo con un extracto proteico del órgano correspondiente (hojas, tallos ó raíces) según se describe en "Materiales y Métodos". La actividad GUS se expresa en pmol/min.mg. El número de plantas usadas en cada caso, se indica en paréntesis. También se realizó el ensayo fluorométrico en los distintos órganos de una planta transformada con la construcción promotor 35S CaMV/GUS (planta 4₂). Se indica el error estándar cuando corresponde.

La construcción promotor-1300+10/GUS mostró tener diferentes valores de expresión de acuerdo al órgano analizado. La expresión fue alta en las hojas, siendo menor en los tallos y no se detectó expresión en raíces. Esto confirma los resultados obtenidos mediante el ensayo histoquímico. La actividad GUS es alrededor de 3 a 4 veces menor en tallo que en hojas.

Nuestros resultados indican que el promotor del gen *Lhcb1*2* dirige la expresión del gen reportero solo en los tejidos verdes, fotosintéticos.

VII- SEÑAL DEL CLOROPLASTO PARA LA EXPRESION DE LOS GENES *Lhc*. ESTUDIOS EN LAS PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO.

VII- 1. Efecto del Norflurazon sobre la expresión del gen *Lhcb1*2* de papa en las plantas transgénicas de tabaco.

Se ha demostrado que condiciones que impiden el desarrollo de los cloroplastos bloquean específicamente la expresión de varios genes nucleares que codifican proteínas del cloroplasto, asociadas a funciones fotosintéticas (Harper *et al*, 1984; Mayfield *et al*, 1984). Por lo tanto se postuló que una señal del cloroplasto acopla la transcripción de ciertos genes nucleares que codifican proteínas relacionadas a la fotosíntesis con el estado funcional del cloroplasto. Susek *et al* (1992) sugirieron que un precursor de la clorofila, hemo u otra porfirina podría actuar como señal entre el cloroplasto y el núcleo. Por otra parte, se han identificado al menos tres genes nucleares en *Arabidopsis* (*gun1*, *gun2* y *gun3*) necesarios para acoplar la expresión de éstos genes nucleares al estado de desarrollo del cloroplasto (Susek *et al*, 1993).

Nuestro objetivo fue estudiar si esta señal del cloroplasto era necesaria para la expresión del gen reportero dirigida por el promotor del gen *Lhcb1*2* de papa. Para ello, las semillas de la planta transformada 5₃ fueron sembradas en medio MSS con Norflurazon. El efecto de este herbicida es impedir la síntesis de carotenoides, ya que es un inhibidor de la enzima fitoeno desaturasa (Chamovitz *et al*, 1991). Cuando las plantas son cultivadas en un medio con Norflurazon y en presencia de luz, se produce la destrucción de los cloroplastos. Luego de sembrar las semillas, algunas se dejaron en un ambiente a 22°C con un fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs oscuridad, mientras que otras se dejaron en total oscuridad. Las plantas cultivadas en medio MSS en presencia de luz mostraban un color verde intenso en los cotiledones, mientras que las desarrolladas en medio con Norflurazon presentaban cotiledones menos desarrollados y totalmente blancos. Se realizó la tinción histoquímica para la detección de la β -glucuronidasa una semana después de la germinación de las semillas.

Tal como se esperaba, las plantas cultivadas en la luz y en ausencia de Norflurazon expresaron el gen *uidA* en los cotiledones y en la parte superior del hipocótilo (Figura 35A, a la izquierda). Estos resultados concuerdan con los observados para la expresión de los genes *Lhc* en otras especies. Por otra parte se puede observar que la presencia de Norflurazon (5 μ M) inhibe totalmente la expresión del gen reportero dirigida por el promotor *Lhcb1*2* de papa (Figura 35A, a la derecha). Esto estaría indicando que hace falta un factor (es) del cloroplasto para inducir la expresión de los genes *Lhc*. En la parte inferior de la figura (Figura 35B) se observa que cuando las plantas se cultivan en oscuridad, ya sea en presencia o ausencia de Norflurazon, no hay expresión de la β -glucuronidasa. Para descartar la posibilidad de que el Norflurazon este interfiriendo con la estabilidad o traducción del ARNm correspondiente al gen *uidA*, se realizaron experimentos similares a los anteriores utilizando plantas transgénicas que contienen la construcción 35S CaMV/GUS.



Figura 35. Efecto del Norflurazon en las plantas de tabaco transformadas con el promotor -1300+10/GUS. Ensayo histoquímico para la detección de GUS realizado en : **A:** Plantas desarrolladas bajo un fotoperíodo 16 hs luz-8 hs oscuridad. A la izquierda, se muestra una planta cultivada en medio MSS y a la derecha, otra planta en medio MSS con 5 μ M de Norflurazon. **B:** Plantas desarrolladas en oscuridad. A la izquierda, planta cultivada en medio MSS y a la derecha se muestra otra planta transformada, cultivada en medio MSS con 5 μ M de Norflurazon. El ensayo histoquímico se realizó una semana después de la germinación de las semillas.

En la Figura 36 se muestra que la expresión dirigida por el promotor 35S no se encuentra afectada por la presencia del Norflurazon, obteniéndose una tinción similar cuando las plantas fueron dejadas en oscuridad (resultado no mostrado). En la Figura 37A y B se muestra el resultado del ensayo histoquímico realizado en plantas de un mes transformadas con pB 121 cultivadas en MSS sin Norflurazon, en presencia de luz y en total oscuridad. Se puede observar que en ambos casos hay expresión del gen *uidA*



Figura 36. Planta de tabaco transformada con el promotor 35S CaMV/GUS cultivada en presencia de Norflurazon. Semillas de plantas transformadas con pBI121 fueron sembradas en medio MSS con 5 μ M de Norflurazon. Las mismas fueron colocadas en una cámara de cultivo con un fotoperíodo 16 hs luz-8 hs oscuridad. A la semana de la germinación de las semillas, se realizó el ensayo histoquímico para la detección de la β -glucuronidasa.

A



B

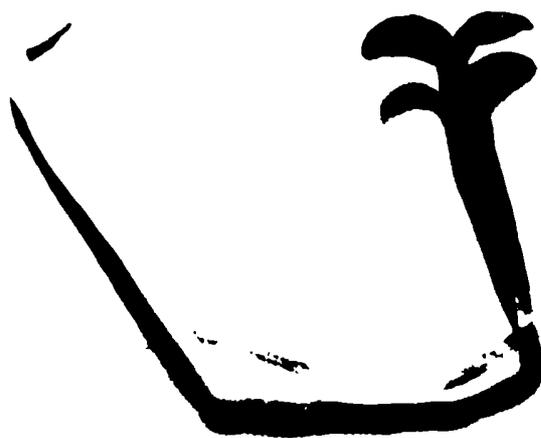


Figura 37. Plantas de tabaco transformadas con el promotor 35S CaMV/GUS cultivadas en medio MSS. Semillas de plantas transformadas con pBI121 fueron sembradas en medio MSS. Al mes de la germinación se realizó el ensayo histoquímico para la detección de la β -glucuronidasa. **A:** Planta de un mes cultivada en presencia de luz (16 hs luz-8 hs oscuridad). **B:** Planta de un mes cultivada en total oscuridad.

Estos resultados indican que en las plantas transgénicas de tabaco, el promotor *Lhcb1*2* de papa dirige la expresión del GUS solo en presencia de luz y fuertemente sugiere que es necesaria una señal proveniente de los cloroplastos para que esto ocurra.

VII- 2. Estudio de la expresión temporal del gen *Lhcb1*2* de papa a partir de la germinación de las semillas.

Ha sido propuesto por estudios realizados con plantas de mostaza que la señal proveniente de los cloroplastos, necesaria para la expresión de los genes *Lhc*, aparece en un estadio temprano en el desarrollo de esta organela (Oemüller *et al*, 1986; Taylor, 1989). Con la idea de estudiar la correlación entre la maduración de los cloroplastos y la expresión de los genes *Lhc* de papa, se determinó a partir de que día después de la germinación se detecta actividad GUS en las plantas transgénicas de tabaco. Para ello, las semillas de una de las plantas de tabaco transformadas con la construcción promotor -1300+10/GUS fueron sembradas en placas de Petri con medio MSS. Las mismas fueron colocadas en un ambiente con un fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs oscuridad a 22°C. Las plántulas fueron retiradas a distintos días después de la germinación y se realizó el ensayo histoquímico para la detección de la β -glucuronidasa.

En la Figura 38A se muestra un embrión, un día después de la germinación de la semilla. En la Figura 38B se ve un embrión al segundo día de la germinación. En ninguno de estos casos se detectó actividad GUS mediante el ensayo histoquímico. Por el contrario se pudo detectar actividad GUS al tercer día de la germinación, como puede observarse en la Figura 38C por el color azul tenue de los cotiledones. A partir de este momento la actividad GUS aumentó notablemente. En la Figura 38D se muestra una plántula de dos semanas, en la cual se observa un color azul intenso en los cotiledones y en la parte superior del hipocótilo.

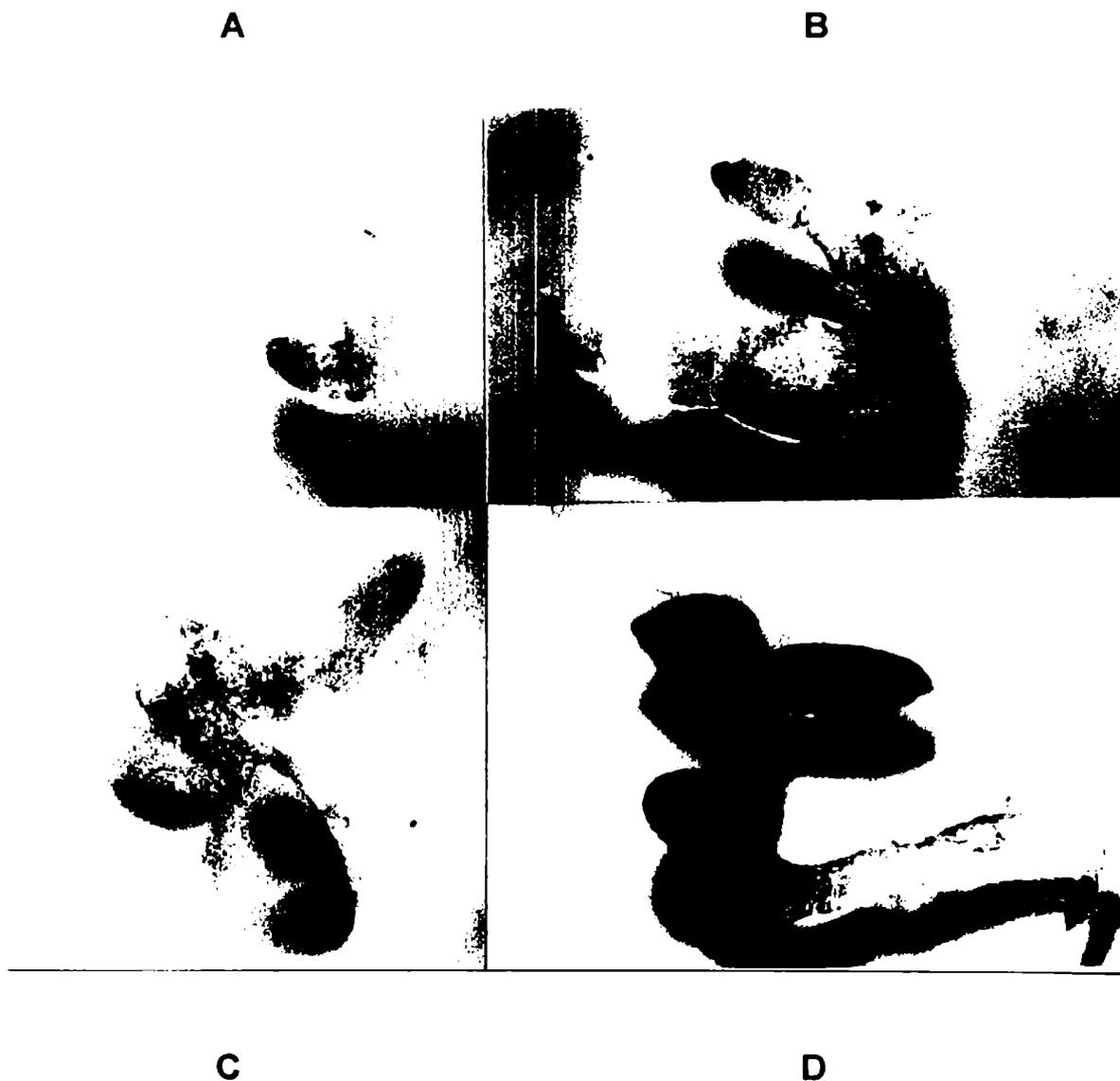


Figura 38. Expresión temporal de la β -glucuronidasa dirigida por el promotor *Lhcb1*2* de papa, en plantas transgénicas de tabaco. Semillas de las plantas de tabaco transformadas con el promotor -1300+10/GUS fueron esterilizadas y colocadas en medio MSS, bajo un fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs oscuridad. Se realizó el ensayo histoquímico a distintos días de la germinación de las semillas. **A:** Un día después de la germinación. **B:** Al segundo día de la germinación. **C:** A los tres días. **D:** A las dos semanas de la germinación.

Ha sido descrito que bajo las condiciones de crecimiento adoptadas en nuestros experimentos, los plástidos en los cotiledones de plántulas de mostaza desarrollan toda la ultraestructura característica de los cloroplastos, entre 36 y 120 hs después de la germinación (Oelmüller *et al*, 1986).

El hecho de que sea necesaria la presencia de cloroplastos maduros para poder observar la expresión de los genes *Lhc*, apoya la teoría de mecanismos de regulación de la expresión de estos genes nucleares por estas organelas.

VIII-. ESTUDIO DE LA EXPRESION INDUCIDA POR LA LUZ EN LAS PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO.

VIII- 1. Expresión mediada por el fotoreceptor fitocromo.

Uno de los primeros experimentos que se realizaron para estudiar la regulación de la expresión por la luz se muestra en la Figura 39. Se analizó la expresión del gen reportero dirigida por el promotor de 1.3 kb del gen *Lhcb1*2* de papa bajo diferentes condiciones de iluminación. Como se puede apreciar las plantas transformadas con la construcción en estudio presentan una clara respuesta a los tratamientos con luz roja, así sea cuando la misma es dada en forma continua (RC) o mediante pulsos (R). En las plantas mantenidas siempre en oscuridad (D) hay una expresión muy baja, basal de la β -glucuronidasa. Estos resultados indican que la expresión de los genes *Lhcb1* esta regulada por la luz. Se observa que en presencia de pulsos de luz roja lejana (RL) se obtiene una pequeña pero significativa inducción de la expresión. La inducción de la actividad GUS que se observa en las plantas transformadas ante los tratamientos con luz roja lejana dados en forma continua (RLC), indican que esta respuesta a la luz puede estar mediada por el fitocromo en una respuesta del tipo de alta irradiancia (HIR). Las

respuestas HIR son aquellas que requieren alta irradiancia y tiempos prolongados de exposición (Hart, 1988; Mancinelli, 1994). Por el contrario, plantas de tabaco transformadas con la construcción promotor 35S CaMV/GUS mostraron una actividad GUS similar cuando fueron mantenidas en oscuridad o sometidas a los distintos tratamientos luminosos. Estos resultados son los esperados dado que ha sido descrito que el promotor 35S CaMV no muestra regulación por la luz. Estos experimentos efectuados en paralelo con los anteriores, indican claramente que la expresión dirigida por el promotor *Lhcb1*2* de papa es fotoregurable. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que la expresión de los genes *Lhc* de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) esta regulada por la luz y muy posiblemente a través del fitocromo.

Como se vió, las plantas transformadas con la construcción promotor -1300+10/GUS mostraron una actividad basal de GUS cuando se dejaron en oscuridad. Se hicieron experimentos controles utilizando plantas transformadas con el plásmido pBI101.2 (sin promotor que controle la expresión del gen *uidA*), cultivadas en presencia de luz o mantenidas en oscuridad durante seis días. En ningún caso se detectó actividad GUS. Por lo tanto, estos resultados sugieren que habría una expresión muy baja de los genes *Lhc* en plantas mantenidas en la oscuridad. Sin embargo la actividad GUS no se puede correlacionar con el nivel de expresión pues se sabe que la β -glucuronidasa es una enzima muy estable. Por lo tanto niveles muy bajos de expresión pueden aparecer artificialmente más altos. Hay que destacar que estos niveles tan bajos de expresión GUS de plantas transformadas con el promotor -1300+10/GUS mantenidas en la oscuridad, son detectados mediante el ensayo fluorométrico pero no con el histoquímico.

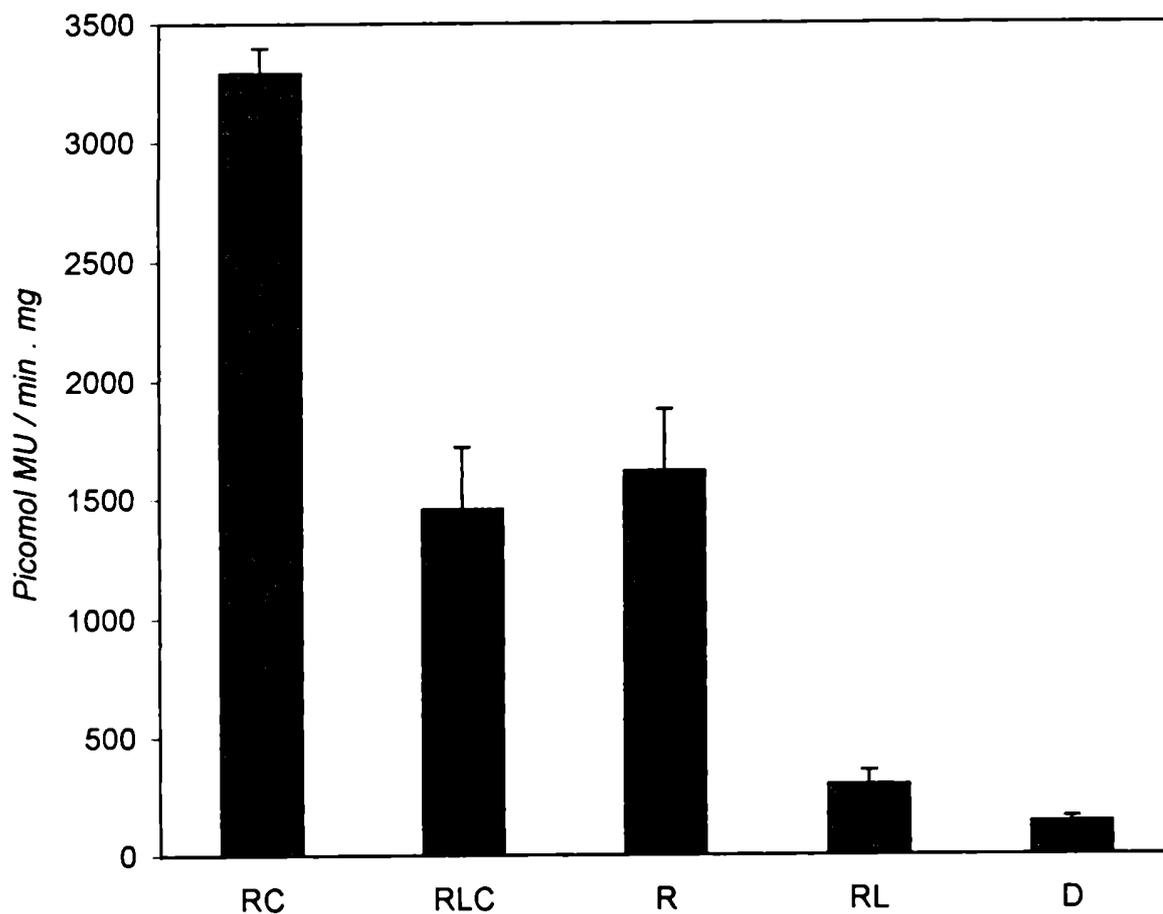


Figura 39. Actividad GUS de las plantas 5_3 transformadas sometidas a distintos tratamientos luminosos. Plántulas T2, luego de cinco días cultivadas en oscuridad, fueron sometidas a los siguientes tratamientos luminosos:

- RC (rojo continuo): durante 48 hs; $\lambda=660$ nm, $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;
- RLC (rojo lejano continuo): durante 48 hs; $\lambda=730$ nm, $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;
- R (pulsos de luz roja): dos pulsos de 5 minutos cada uno, separados por 12 hs en oscuridad, $\lambda=660$ nm, $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;
- RL (pulsos de rojo lejano): dos pulsos de 5 min cada uno y separados por un intervalo de 12 hs en oscuridad, $\lambda=730$ nm, $42 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;
- D: oscuridad.

La germinación fue inducida exponiendo las semillas durante 16 hs a luz blanca continua. Los tratamientos fueron realizados al sexto y séptimo día de preparar las semillas en las cajas de plástico transparente, según se detalla en "Materiales y Métodos". Las barras indican el error estándar.

El criterio más tradicional para identificar una respuesta mediada por el fitocromo es la demostración de la reversibilidad de la respuesta es decir, lo que la luz roja (R) induce, la luz roja lejana (RL) lo revierte. Sin embargo, no poder demostrar la reversibilidad R/RL no quiere decir que el fitocromo no este involucrado en la respuesta. Por ejemplo, las respuestas muy sensibles al Pfr (0.01% de Pfr), conocidas como VLFR (respuesta a muy baja fluencia) pueden impedir la demostración de la reversibilidad.

Con la idea de tener una información más precisa del tipo de fotoreceptor que media la respuesta de los genes *Lhc*, se realizaron estudios como los que se indican en la Figura 40. Se analizaron cuatro líneas transgénicas independientes que llevaban la construcción del promotor -1300+10 del gen *Lhcb1*2* de papa fusionado al GUS.

La actividad GUS de las plantas sometidas a pulsos de rojo (R) es similar a la de las plantas mantenidas en luz blanca continua. Se observa que los pulsos de rojo lejano revierten la inducción producida por la luz roja (R/RL). La inducción por rojo y reversión por rojo lejano indica que es una respuesta mediada por el fitocromo (Furuya, 1993).

La actividad GUS de las plantas sometidas al tratamiento R/RL es algo mayor a la actividad que presentan las plantas mantenidas en oscuridad. Esto se debe a que si bien el RL aplicado inmediatamente después del tratamiento con R revierte la forma del fitocromo biológicamente activa (Pfr) a la forma inactiva (Pr), el rojo lejano en pulsos (RL) por sí mismo y como se vió en la Figura 39 es capaz de inducir una pequeña cantidad de Pfr (alrededor de un 3%) (Casal, 1995).

Como conclusión de estos experimentos se puede destacar que la expresión de los genes *Lhc* esta regulada por la luz a través del fitocromo. También estos experimentos sugieren que estarían involucrados los modos de respuesta HIR del fitocromo, como ya ha sido demostrado para otros genes *Lhc* en otras especies de plantas.

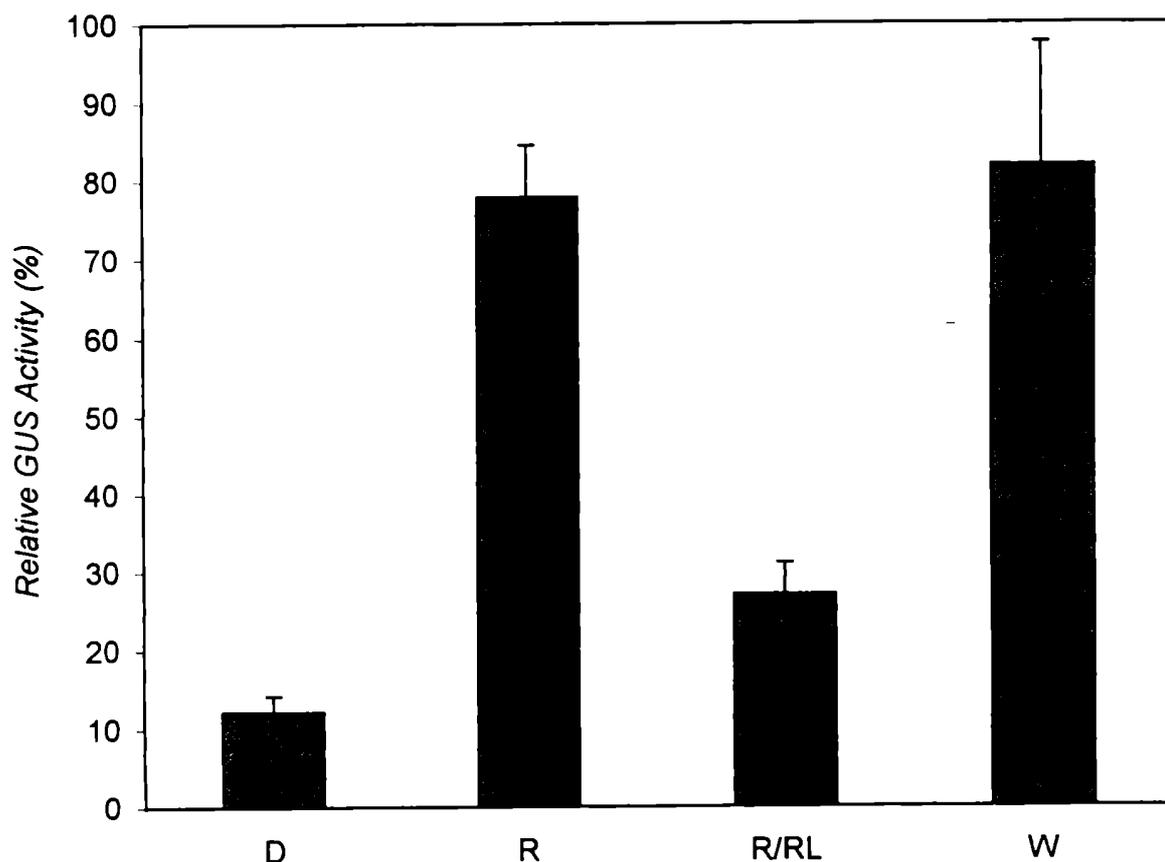


Figura 40. Respuesta del promotor de 1.3 kb del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum* a la inducción mediada por el fitocromo. Semillas de las plantas de tabaco transformadas con el promotor -1300+10/GUS fueron colocadas en cajas transparentes y cultivadas en oscuridad. Al quinto y sexto día las plántulas fueron sometidas a distintos tratamientos. Un grupo fue tratado con un pulso de 5 min de luz roja (R). Otro grupo se irradió con un pulso de 5 min de rojo seguido inmediatamente por un pulso de 5 min de rojo lejano (R/RL). Otras plántulas fueron mantenidas en oscuridad (D), mientras que el cuarto grupo fue sometido a luz blanca continua durante el quinto y sexto día (W). Al séptimo día se determinó la actividad GUS. Se eligieron para analizar las semillas de las plantas 3, 5₃, 12₁ y 17₂. Cada tratamiento fue realizado por triplicado para cada una de éstas líneas transgénicas independientes. Todos los valores fueron normalizados considerando como 100% el máximo valor de actividad GUS para cada una de las líneas transgénicas, el cual fue obtenido en algunos casos para el tratamiento con rojo y en otros para luz blanca continua. Las barras indican el error estándar.

VIII- 2. Estudio de la expresión mediada por el receptor de luz azul.

Se ha propuesto que el receptor de luz azul media la regulación de la expresión por la luz de los genes *Lhcb1* de varias especies de plantas (Wehmeyer *et al.*, 1990). Se estudió por lo tanto, si el promotor del gen *Lhcb1*2* de papa fusionado al gen GUS respondía a la regulación mediada por este fotoreceptor en las plantas transgénicas de tabaco. Se eligieron para este análisis las semillas de la planta 5₃. Se analizaron las respuestas del promotor *Lhcb1*2* de papa a la inducción por luz naranja de 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y a la luz blanca de dos fluencias cercanas a la anterior. La luz naranja contiene las mismas longitudes de onda que las que posee la luz blanca, excepto que no contiene la longitud de onda correspondiente al azul. Por otra parte, se eligieron estas fluencias pues son las condiciones establecidas que permiten estudiar respuestas mediadas por el receptor de luz azul. A fluencias altas el fitocromo se halla en condiciones saturantes y así ante cualquier otro efecto de inducción, la acción del fitocromo puede ser descartada. Los resultados que se ven en la Figura 41 sugieren que la expresión de los genes *Lhc* es inducida por la luz azul.

Si bien estos resultados son preliminares es bastante posible que un fotoreceptor azul este involucrado en la regulación de los genes *Lhc*. Para obtener resultados mas concluyentes será necesario ampliar estos estudios analizando otras plantas transgénicas que contengan inserciones independientes a la utilizada en este estudio. Los resultados obtenidos concuerdan con los de genes *Lhc* de otras especies de plantas. En nuestro laboratorio se ha encontrado que los genes *Lhcb1* de tabaco son regulados por la luz azul en plantas transgénicas de tabaco (Ariel Scharlat, comunicación personal).

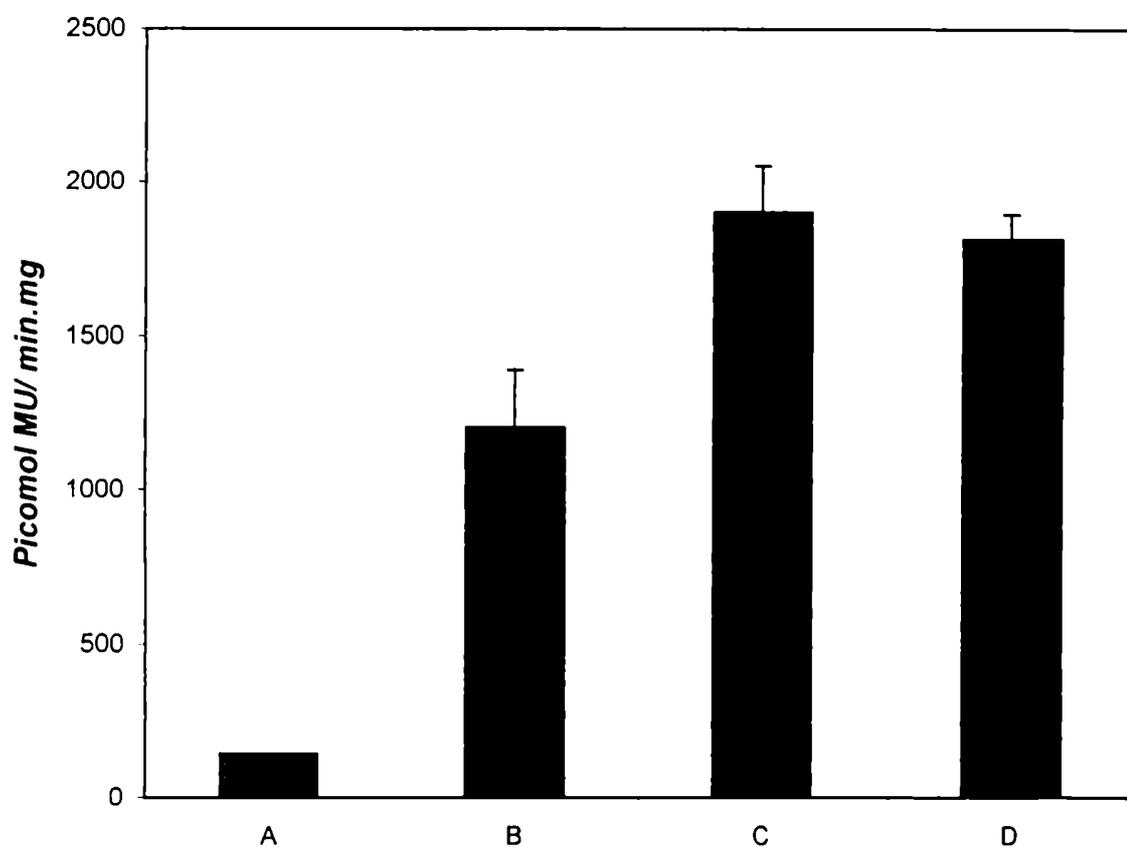


Figura 41. Estudio del efecto de la luz azul. Semillas de la planta 5₃ fueron preparadas en cajas transparentes según se detalla en "Materiales y Métodos", y cultivadas durante cinco días en oscuridad para ser luego sometidas a distintos tratamientos luminosos: **A:** oscuridad; **B:** luz naranja de 300 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; **C:** luz blanca de 200 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; **D:** luz blanca de 400 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Los tratamientos que se indican en cada caso fueron realizados al sexto día y tuvieron una duración de 3 hs. La actividad GUS se expresa como picomol MU/min.mg.

IX- ESTUDIOS CON EL PROMOTOR DELECCIONADO FUSIONADO AL GEN GUS EN PLANTAS DE TABACO TRANSGENICAS.

IX- 1. Fusión de la región -690+10 del gen *Lhcb1*2* de papa al gen reportero *uidA* y transformación de plantas de tabaco.

Con la idea de localizar las regiones responsables de la regulación de la expresión por la luz y de la especificidad de tejido, el promotor de 1.3 kb del gen *Lhcb1*2* de papa fue deletado. Se aisló una de las delecciones correspondiente a la región del promotor de 690 pb más cercanas al codón de iniciación de la traducción del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum*. Esta región se clonó en pBI101.2 quedando así fusionada al gen reportero de la β -glucuronidasa. Para poder subclonarlo en pBI 101.2 fue necesario introducir un sitio de corte para la enzima HindIII del lado 5' del fragmento de 690 pb. Para esto, como se muestra en la Figura 42, el promotor de 1.3 kb previamente subclonado en pUC19 fue digerido con la enzima EcoRI. El corte por esta endonucleasa de restricción divide al promotor de 1.3 kb en dos fragmentos: uno de 610 pb y otro de 690 pb. El fragmento de 690 pb corresponde a la región del promotor más cercana a la zona de código del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum*. El producto de esta digestión se corrió en un gel de agarosa 0.7% y se aisló y purificó el fragmento de 690 pb. Este fragmento EcoRI/EcoRI fue subclonado en pBluescript KS⁺. Posteriormente, el plásmido resultante fue digerido con las enzimas HindIII y BamHI. El sitio para HindIII se encuentra en el "linker" de pBluescript, del lado 5' del fragmento subclonado, mientras que el sitio de BamHI se halla del lado 3' dentro de la secuencia del promotor. Se aisló así la región promotora de 690 pb con los sitios apropiados para ser subclonada entre los sitios HindIII y BamHI de pBI101.2. Este plásmido fue llamado pBI-690+10/GUS.

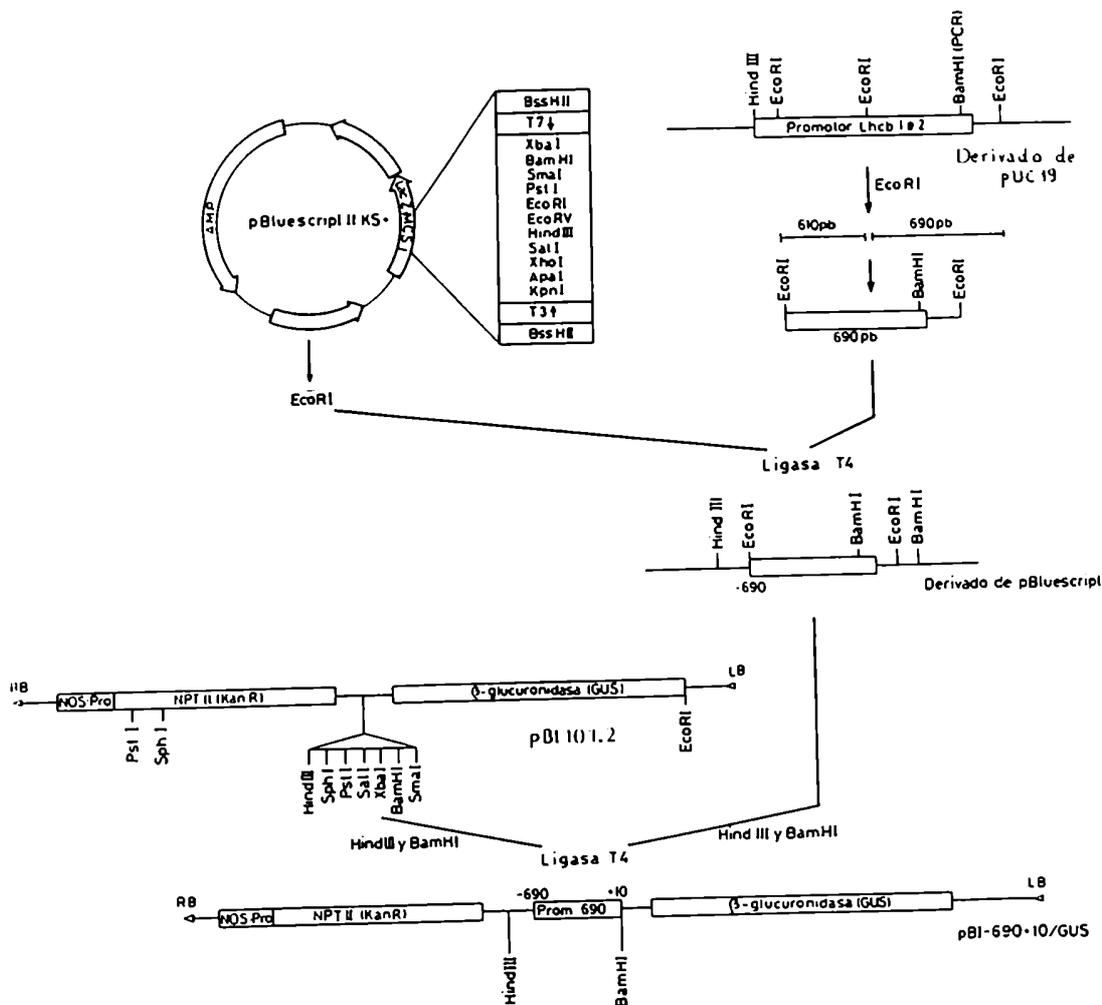


Figura 42. Esquema del subclonado de la región promotora comprendida entre las bases -690 a +10 del gen *Lhcb1*2* de papa en el plásmido pBI101.2. El promotor *Lhcb1*2* de 1.3 kb se había subclonado previamente en pUC19. Este plásmido fue digerido con EcoRI y el producto de esta digestión se corrió en un gel de agarosa 0.7%. El fragmento de 690 pb fue extraído del gel, purificado y subclonado en el sitio EcoRI de pBluescript KS⁺. Posteriormente, el plásmido derivado de pBluescript fue digerido con HindIII y BamHI y el producto de esta digestión se corrió en un gel de agarosa 0.7%. El fragmento de interés fue extraído y purificado. Finalmente, se lo subclonó entre los sitios HindIII y BamHI de pBI101.2. En el plásmido pBI-690+10/GUS, la región del promotor comprendida entre las bases -690 a +10 dirige la expresión del gen reportero de la β-glucuronidasa.

Con el plásmido pBI-690+10/GUS se transformaron plantas de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*, seleccionándose aquéllas plantas resistentes a kanamicina. Se realizó el ensayo fluorométrico para la detección de la β -glucuronidasa utilizando extractos proteicos realizados a partir de las hojas de plantas de un mes. Las plantas resistentes a kanamicina que mostraron una actividad GUS mayor que las plantas controles no transformadas fueron transferidas a tierra. Con las semillas obtenidas por autofecundación, se realizaron experimentos con el fin de determinar si el promotor delecionado de 690 pb se comportaba o no como el promotor entero de 1.3 kb.

IX- 2. Actividad GUS de las plantas de tabaco transformadas con el promotor entero ó delecionado.

Se comparó la actividad GUS de las plantas transformadas con el promotor entero ó delecionado. Para ello, se colocaron 25 semillas de cada una de las líneas transformadas en cajas transparentes según se detalla en "Materiales y Métodos". Esto se realizó por duplicado para cada una de las líneas transformadas. Las cajas con las semillas se mantuvieron en un ambiente a 22°C con un fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs oscuridad. La actividad GUS de las plantas T2 se determinó al noveno día. Los resultados obtenidos para cada planta se muestran en la Tabla 4.

Planta #	Actividad GUS
* 3	315.13
* 5 ₁	958.57
* 5 ₂	858.99
* 5 ₃	887.92
* 6 ₁	1738.32
* 7 ₂	260.49
* 8 ₂	553.57
* 8 ₃	510.23
* 12 ₁	1016.19
* 12 ₂	3211.16
* 15 ₂	1085.51
* 17 ₂	809.79
* 18 ₂	3184.66
◆ 2 ₃	477.63
◆ 4	874.64
◆ 6	311.64
◆ 8	1259.26
◆ 11	1062.26
◆ 13	1310.86
♣ 2 ₂	28.82
♣ 101.2	28.25

Tabla 4. Actividad GUS de plantas T2 transformadas con el promotor entero y delecionado. Plantas T2 que llevan el promotor entero ó delecionado, fusionado al gen GUS fueron cultivadas durante 9 días con un fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs oscuridad. Se utilizaron cajas de plástico transparente donde se colocaron 25 semillas de cada una de las plantas transformadas. Se determinó la actividad GUS mediante el ensayo fluorométrico. La actividad GUS se expresa en pmol MU/min.mg. Con el símbolo * se señalan las plantas transformadas con el promotor -1300+10/GUS; ◆ indica las plantas transformadas con la construcción promotor-690+10/GUS; ♣ señala las plantas controles: planta 2₂, sin transformar y planta 101.2 transformada con el plásmido pB1101.2.

En la Figura 43 se muestra mediante un gráfico de barras la actividad GUS de las plantas transformadas con el promotor entero y delecionado. Se puede observar que la actividad GUS disminuye en las plantas transformadas con el promotor delecionado. Si bien estos resultados no parecen ser significativos, sugieren que

en la región río arriba de la base -690 podrían existir secuencias regulatorias positivas responsables de aumentar la expresión del gen *Lhcb1*2*.

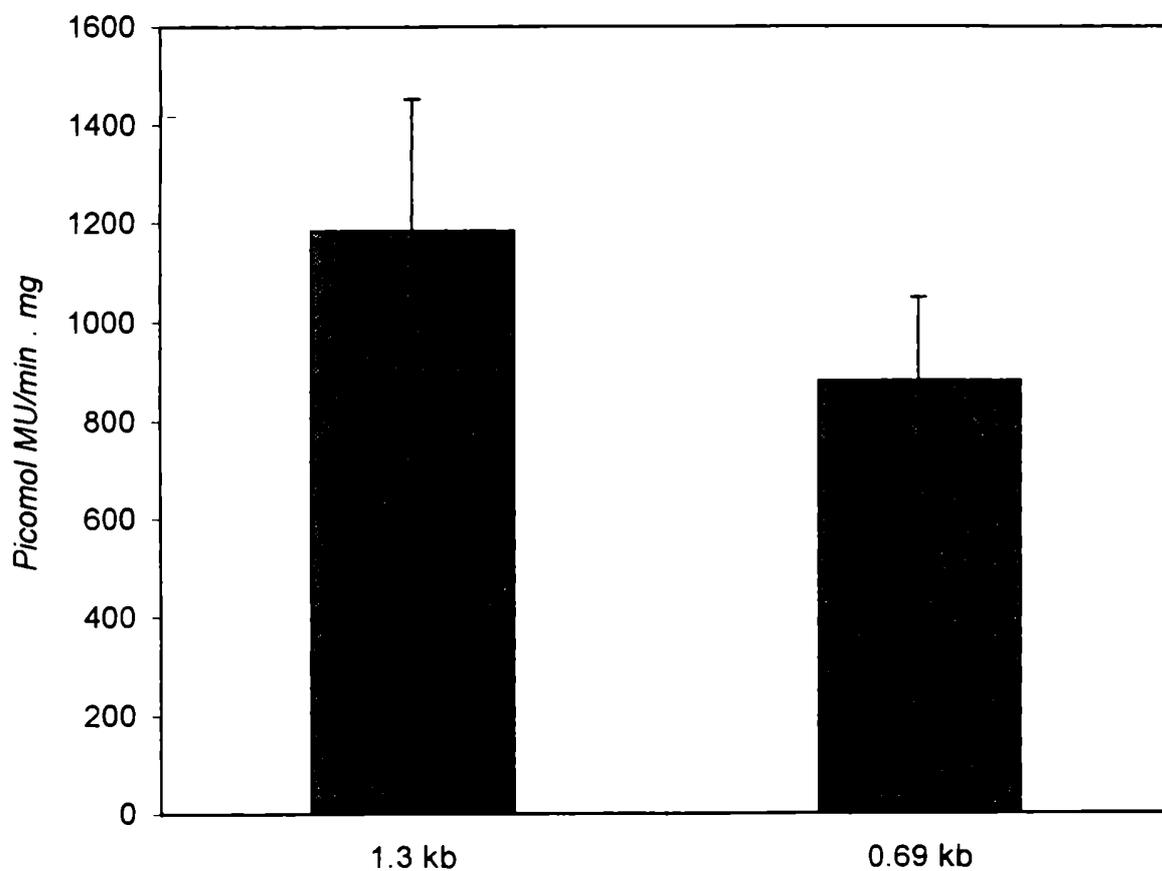


Figura 43. Actividad GUS de las plantas de tabaco transformadas con el promotor del gen *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum*, entero (1.3kb) o delecionado (0.69 kb), fusionado al GUS. Se indica el error estándar.

IX- 3. Expresión específica de órgano y regulación mediada por el fitocromo.

Para estudiar si el promotor delecionado mantenía la expresión específica de tejido que mostró tener el promotor de 1.3 kb, comprendido entre las bases -1300 a +10, se ensayó la actividad GUS en distintos órganos de las plantas de tabaco transformadas con el promotor delecionado fusionado al gen *uidA*. En la Figura 44 se muestra el resultado del ensayo histoquímico realizado en un segmento de hoja, en un corte transversal de tallo y en una raíz de una planta de tabaco de aproximadamente dos meses, en la cual el promotor -690+10 dirige la expresión del GUS.



Figura 44. Ensayo histoquímico realizado en los distintos órganos de una planta de tabaco transformada con el plásmido pBI-690+10/GUS. Se utilizó una planta T2 de 60 días. La reacción histoquímica para la detección del GUS fue realizada en: un segmento de hoja (a la izquierda), en un corte transversal de tallo (en el centro de la figura) y en una raíz (a la derecha).

Como puede observarse, el promotor delecionado dirigió la expresión del gen reportero en las hojas y en el tallo, pero no en la raíz. Puede observarse que hubo una fuerte expresión en la hoja mientras que la misma fue muy baja en el tallo. En la Figura 45 se muestra en detalle el resultado del ensayo histoquímico realizado en el corte transversal de tallo.

Por lo tanto, podemos concluir que el promotor delecionado comprendido entre las bases -690 a +10 no cambió el patrón de expresión observado cuando el gen reportero se hallaba bajo la dirección del promotor *Lhcb1*2* comprendido entre las bases -1300 a +10.

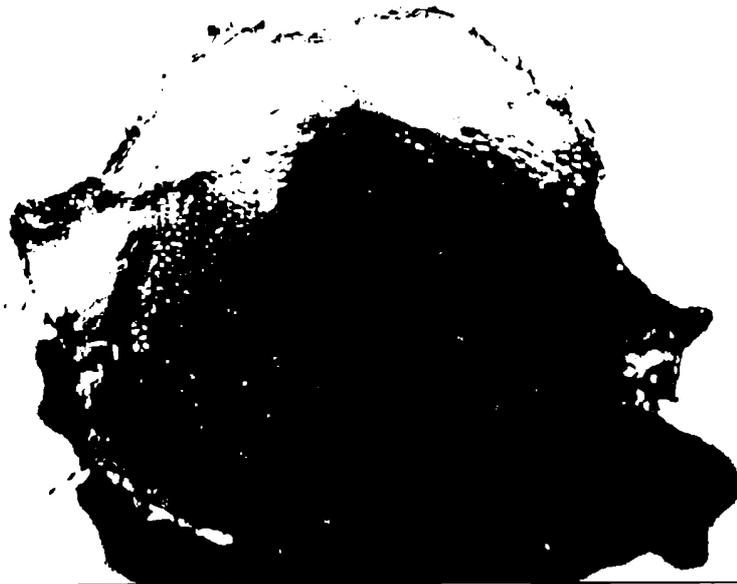


Figura 45. Ensayo histoquímico para la detección de la β -glucuronidasa realizado en un corte transversal de tallo de una planta transformada con pBI-690+10/GUS. Se muestra en detalle el corte transversal de tallo que se ve en la Figura 43.

Se cuantificó la actividad GUS en hojas, tallos y raíces de plantas T2 de 90 días (Tabla 5).

Planta #	Hojas	Tallos	Raíces
♦ 2 ₃ (2)	298.8 ± 126.1	205.9 ± 63.9	0
♦ 4 (2)	938.04 ± 81.9	22.1 ± 3.6	0
♣ 4 ₂	47.24	33.95	46.19

Tabla 5. Actividad GUS en los distintos órganos de las plantas de tabaco transformadas. Plantas T2 que llevaban la construcción promotor-690+10/GUS fueron cultivadas durante 90 días en medio MSS bajo un fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs oscuridad. El número de plantas analizadas se indica entre paréntesis. Se realizó el ensayo fluorométrico del GUS en hojas, tallos y raíces. La actividad GUS se expresa en pmol MU/min.mg. Con el símbolo♦ se señalan las plantas transformadas con el promotor -690+10/GUS. Se indican también los valores de actividad GUS en los distintos órganos de plantas transformadas con el promotor 35S CaMV/GUS (♣).

Los resultados demostraron que hay expresión en hojas y tallos y no hay expresión en raíces. La actividad GUS en las hojas de las plantas es mayor que en los tallos. Todo indica pues, que la región del promotor comprendida entre las bases -690 y +10 retiene la expresión específica de órgano que mostró tener el promotor entero de 1.3 kb en las plantas transgénicas de tabaco. Sin embargo en estos resultados preliminares se encontró que los valores de actividad GUS en los tallos, eran más dispersos que los encontrados cuando se estudió el promotor entero.

En la Figura 46 se muestra la tinción histoquímica realizada en cortes transversales de tallos de plantas transformadas con distintas construcciones.



Figura 46. Reacción histoquímica para la detección de la β -glucuronidasa en cortes transversales de tallos. Se utilizaron plantas jóvenes de tabaco de aproximadamente dos meses. A la izquierda, arriba, corte transversal de tallo de una planta transformada con el promotor 35S CaMV/GUS. Abajo a la izquierda, tallo de una planta control no transformada. A la derecha, arriba, corte transversal de tallo de una planta transformada con el promotor -1300+10/GUS y abajo, tallo de una planta transformada con el promotor -690+10/GUS.

A la derecha en la parte superior de la Figura 46, se muestra el resultado del ensayo histoquímico realizado en un corte transversal de tallo de una planta transformada con el promotor de 1.3 kb del gen *Lhcb1*2* fusionado al GUS. En la parte inferior de la misma figura, a la derecha, se puede observar el resultado del mismo ensayo realizado en un corte transversal de tallo de una planta transformada con el promotor deletado/GUS. En la primera, en la cual el

promotor de 1.3 kb dirige la expresión del GUS se observa una fuerte expresión en las células cercanas al sistema vascular, mientras que la expresión disminuye en las células de la corteza. En la planta transformada con el promotor de 690 pb se ve que no hay expresión en las células que rodean el sistema vascular y se observa en cambio, una tinción tenue en ciertas zonas de la corteza y en la médula. Como control de este experimento se utilizaron plantas transformadas con el promotor 35S del CaMV que dirige la expresión del GUS. Como se mencionó anteriormente, el promotor 35S CaMV es un promotor fuerte que no muestra especificidad de tejido (Figura 46, parte superior izquierda). En la parte inferior izquierda de la misma figura se muestra una planta control no transformada.

Por lo tanto, al delecionar el promotor *Lhcb1*2* de papa cambia notablemente el patrón de expresión en el tallo. Se piensa estudiar el patrón de expresión en un mayor número de plantas transgénicas, con el fin de elucidar si se trata de un efecto que depende específicamente de la región promotora delecionada o si es un efecto que depende del lugar donde se inserta la construcción en estudio. Por otra parte si bien no se estudió el patrón de expresión en los diferentes tipos celulares de las hojas, sería interesante analizar en el futuro este aspecto.

También se analizó si el promotor delecionado seguía respondiendo a la regulación por la luz a través del fotoreceptor fitocromo. Para ello, plántulas etioladas transformadas con el promotor de 690 pb dirigiendo la expresión del GUS, fueron sometidas a tratamientos con pulsos de rojo (R), pulsos de rojo lejano (RL), pulsos de rojo seguidos por pulsos de rojo lejano (R/RL), oscuridad (D) ó luz blanca (W). Se trataron al quinto y sexto día y se les aplicó un solo pulso cada día. Se analizaron tres líneas transgénicas independientes: 2₃, 11 y 18₁. La Figura 47 muestra la actividad GUS expresada en porcentaje de las plantas de tabaco transformadas con la construcción promotor -690+10/GUS, sometidas a los distintos tratamientos.

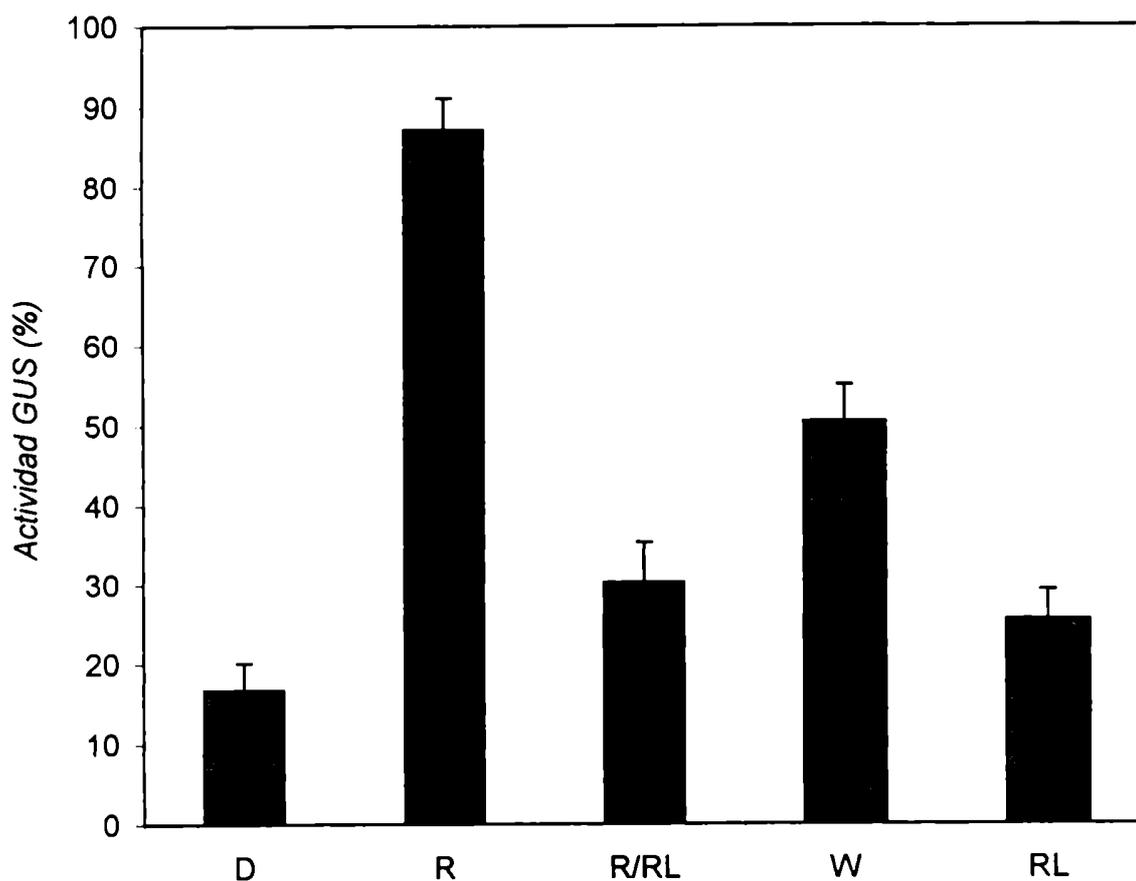


Figura 47. La región del promotor del gen *Lhcb1*2* de papa, comprendida entre las bases -690 a +10 responde a la inducción por la luz mediada por el fitocromo. En este experimento se utilizaron las semillas de las plantas 2₃, 11 y 18₁ transformadas con el promotor -690+10/GUS. Un grupo de plántulas fue mantenido en oscuridad (D). Otro grupo, fue tratado con un pulso de 5 min de luz roja (R). El tercer grupo se trató durante 5 min con rojo y se irradió inmediatamente durante otros 5 min con rojo lejano (R/RL). Otras plántulas se dejaron bajo luz blanca continua (W) durante todo el quinto y sexto día. Otras fueron tratadas con rojo lejano durante 5 min (RL). Estos tratamientos se hicieron por cuadruplicado para cada línea transgénica y fueron realizados al quinto y sexto día. Los valores fueron normalizados considerando como 100% el máximo valor de actividad GUS obtenido en todos los casos para el tratamiento con rojo (R). Las barras indican el error estándar.

Al igual que lo observado con el promotor -1300+10/GUS, se ve que la luz roja (R) induce la expresión del gen reportero y también se observa la capacidad del rojo lejano de revertir el efecto del rojo. Estos resultados indican que el fitocromo de las plantas de tabaco sigue mediando la expresión inducida por la luz dirigida por el promotor *Lhcb1*2* de papa delecionado. Por lo tanto, la región del promotor *Lhcb1*2* de papa comprendida entre las bases -690 a +10 es capaz de responder al fitocromo. Sin embargo los valores absolutos de las actividades GUS obtenidos para los distintos tratamientos luminosos fueron menores para las plantas transformadas con el promotor delecionado que en las transformadas con el promotor entero. La actividad GUS cayó entre un 40% a 50% en las plantas transformadas con el promotor delecionado, incluso en los valores de actividad obtenidos en la oscuridad. Estos resultados como se propuso anteriormente, indicarían que río arriba de la base -690 existiría una secuencia “enhancer”, la cual aumentaría la expresión del gen *Lhcb1*2*.

En la Tabla 6 se comparan las relaciones de las actividades GUS entre los distintos tratamientos en las plantas transformadas con el promotor entero y delecionado.

	Prom-1300+10/GUS	Prom -690+10/GUS
R/D	6.4	5.2
R / (R/RL)	2.9	2.9
(R/RL) / D	2.2	1.8
RL / D	NR	1.5
W/R	1.2	0.6

Tabla 6. Relaciones entre las respuestas a los distintos tratamientos luminosos de las plantas transformadas con el promotor entero y delecionado. Las relaciones entre los distintos tratamientos que se indican en cada caso, fueron calculadas a partir de los valores de las actividades GUS que se muestran en las Figuras 40 y 47. W: luz blanca; D: oscuridad; R: pulsos de rojo; RL: pulsos de rojo lejano. NR: no realizado.

Tanto con el promotor entero como con la delección se observa que el rojo induce la expresión entre 5 a 6 veces con respecto a los valores obtenidos en la oscuridad. No se observan diferencias entre ambas construcciones en cuanto al efecto de reversión del rojo lejano. Por otra parte, en las plantas transformadas con el promotor entero el efecto inductor de la luz blanca fue similar al efecto de la luz roja. Sin embargo, en las tres líneas transgénicas independientes transformadas con el promotor delecionado el efecto inductor de la luz blanca es inferior al de la luz roja. Esto sugeriría que río arriba de la base -690 podría haber secuencias importantes que medien la regulación por la luz a través de un fotoreceptor distinto al fitocromo. En un futuro, será necesario analizar otras plantas transgénicas independientes para estudiar este aspecto en mayor detalle.

DISCUSSION

DISCUSION.

Se aislaron seis genes *Lhcb1* a partir de una biblioteca genómica de *Solanum tuberosum*, los cuales fueron llamados: *Lhcb1*1*, *Lhcb1*2*, *Lhcb1*3*, *Lhcb1*4*, *Lhcb1*5* y *Lhcb1*6*. Dichos genes poseen 798 pb, excepto el gen *Lhcb1*6* el cual fue aislado en forma incompleta (411 pb). Pude determinar que estos genes se hallan en tandem y poseen la misma orientación 5'→ 3' (Figura 2). La distancia entre las distintas regiones de código es de aproximadamente 1.3 kb. Ninguno de los genes aislados posee intrones y cada uno tiene su propio promotor localizado río arriba de la región de código. Por sus características, determiné que pertenecen al LHCIIb, tipo I. Si fueran traducidos, las proteínas tendrían 265 aminoácidos. Estas proteínas precursoras serían clivadas al pasar al interior del cloroplasto por una proteasa presente en el estroma (Gray *et al*, 1995). Posteriormente, las proteínas CAB maduras de 230 aminoácidos se insertan en las membranas tilacoides donde se asocian con moléculas de clorofila a, clorofila b y carotenos, formando así las antenas que captan la luz.

Los genes *Lhcb1* aislados de papa son muy similares entre sí (poseen entre un 94% a 98% de identidad) y codifican proteínas casi idénticas. Esto indica que podrían haber surgido como resultado de eventos de duplicaciones recientes y en tandem de un gen. Por otra parte, los genes estudiados son muy parecidos a genes *Lhcb1* de otras especies de plantas. Esta alta homología refleja una fuerte presión evolutiva para conservar la estructura de los complejos que captan la luz. Hay que tener en cuenta que la función de las proteínas CAB es orientar y espaciar en forma precisa las moléculas de clorofila y carotenoides que están asociadas a ellas, de tal forma que la energía absorbida sea transferida eficientemente al centro de reacción. Esta función requiere un arreglo exacto de las proteínas y pigmentos dentro de cada complejo individual así como también entre los LHC y el centro de reacción. Así, el rol del polipéptido y en particular el de las α -hélices A y B, parece ser principalmente la de andamio para empaquetar los cromóforos en un pequeño volumen, asegurando un espaciamiento y orientación adecuadas para la

transferencia de energía. Por lo tanto, el hecho de que las secuencias de los genes *Lhc* sea altamente conservada significa que se necesita una óptima organización de los pigmentos que se unen en forma no covalente a los polipéptidos CAB.

Por otra parte, los genes *Lhcb1* aislados de papa muestran gran homología con los genes *Lhc* de tomate, tabaco y petunia y son más divergentes de los correspondientes genes de *Lemna gibba* (lenteja de agua) y trigo. Esto parece estar de acuerdo con las relaciones filogenéticas entre estas especies ya que papa, tomate, tabaco y petunia pertenecen a la familia *Solanaceae*. También observamos que los polipéptidos CAB deducidos a partir de las secuencias de los genes *Lhcb1* de papa, muestran una homología interna. Esta simetría interna entre las α -hélices transmembrana A y B, ha sido observada para distintos tipos de polipéptidos CAB en todas las especies de plantas en las que se los estudió. Ha sido propuesto que la simetría interna probablemente se produjo como consecuencia de la duplicación en tandem de un gen ancestral que codificaba un polipéptido que atravesaba la membrana, el cual probó ser efectivo en mantener la clorofila *a* en contacto con los carotenoides. La región media hidrofóbica (α -hélice C) posiblemente evolucionó posteriormente, simplemente para mantener la primera y tercera región hidrofóbica en la misma orientación dentro de la membrana tilacoide (estroma a lumen). Por otra parte, si la hipótesis de duplicación interna es correcta, debería existir algún gen relacionado que codifique un polipéptido con una única hélice transmembrana y que se una a la clorofila *a* y *b*. Este gen todavía no se ha encontrado. Sin embargo, las proteínas CAB están relacionadas estructuralmente a las enzimas que participan en los últimos pasos de la síntesis de clorofila, puesto que ambas tienen sitios para la unión de pigmentos. Por lo tanto, una hipótesis es que las proteínas CAB pudieron haber surgido a través de la duplicación de un gen que codifica una enzima de la biosíntesis de la clorofila. El resultado de esta duplicación fue un gen que codificó una proteína estructural que formó parte de un sistema nuevo para captar la luz.

Cada uno de los genes *Lhcb1* aislados de *Solanum tuberosum*, posee su propio promotor localizado 5' río arriba de la región de código. Se secuenciaron aproximadamente 260 bases de las regiones promotoras de los distintos genes, mientras que la región que se halla río arriba del gen *Lhcb1*2* fue secuenciada en forma completa (1.3 kb). Estas regiones muestran homología entre ellas, si bien la misma es menor a la que poseen las

secuencias de código. Esto apoya la teoría sobre el origen de éstos genes a partir de la duplicación en tandem de uno de ellos. Por otra parte, observamos que las regiones promotoras de los genes *Lhcb1* de papa poseen las características típicas de promotores transcritos por la RNA polimerasa II, ya que poseen las cajas TATA y CAAT. Además poseen secuencias típicas presentes en los promotores de otros genes cuya expresión es regulada por la luz, como ser las secuencias GATA, los motivos "GT" y la caja "G".

Utilizando la técnica de "primer extension", demostramos que varios genes *Lhcb1* se expresan en las hojas de las plantas de papa. Las bandas de 99, 95- 97 y 91- 92 nucleótidos que se observan en la Figura 19 corresponden a los productos de extensión esperados para los seis genes aislados. Las otras bandas de 108, 105, 86, 82, y 77 nucleótidos corresponderían a otros genes no aislados. Por lo tanto nuestros resultados indican que habría al menos 11 genes *Lhcb1* en *Solanum tuberosum*, lo cual concuerda con el número de genes estimados en otras especies de plantas (Pichersky *et al*, 1990b).

Al estudiar la expresión de los genes *Lhcb1* en los distintos órganos de las plantas de papa, detectamos que los mismos se expresan en las hojas y tallos pero no hay expresión en las raíces (Figura 20). Estos resultados indican que la expresión es específica de órgano. Por otra parte, mientras que en las hojas de las plantas se expresan varios genes *Lhcb1*, solo uno se expresa en los tallos. El hecho de que éstos genes muestren alta expresión en las hojas, es consistente con la función que poseen de ordenar las moléculas de clorofila para que las mismas atrapen la luz eficientemente, proceso que ocurre principalmente en las hojas de las plantas.

También observamos que en las hojas de plantas de 90 días se detecta la expresión de un gen *Lhcb1*, que no se expresa en las plantas de 60 días. Esto sugiere que los genes *Lhcb1*, aunque tienen alta homología en sus secuencias de bases, se expresarían en forma diferencial durante el desarrollo de las plantas. En el futuro sería muy interesante estudiar este aspecto usando "primers" específicos para cada uno de los genes aislados en experimentos de "primer extension", utilizando ARN aislado de plantas en distintas etapas del desarrollo.

Ha sido descripto para algunas especies de plantas que los genes *Lhcb1* se expresan en plantas mantenidas en oscuridad, mientras que en otras especies no se expresan bajo esas condiciones. Aunque nuestros resultados en plantas transgénicas de tabaco sugieren

que habría una expresión basal muy baja en la oscuridad, sería interesante estudiar si los genes que nosotros aislamos se expresan de la misma forma en las plantas de papa. Esto podría realizarse usando "primers" específicos para cada uno de los genes aislados en experimentos de "primer extension", utilizando ARN de plantas de papa etioladas.

Utilizando un primer específico para el gen *Lhcb1*2*, detectamos que este gen se expresa en hojas pero no en tallos ni raíces de las plantas de papa. También determinamos el sitio de iniciación de la transcripción para este gen, el cual se halla a 69 bases río arriba del codón de iniciación de la traducción. El gen *Lhcb1*2* fue elegido para estudiar en mayor detalle la regulación de su expresión, ya que se había secuenciado en forma completa la región que se halla 5' río arriba de la zona de código. Con este objeto, esta región de 1.3 kb fue fusionada al gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS) y con la construcción resultante se transformaron plantas de tabaco via *Agrobacterium*. Lo ideal hubiese sido transformar plantas de papa para estudiar así, la regulación de la expresión en la misma planta de la cual proviene el gen aislado. Decidimos estudiar la regulación de la expresión del gen *Lhcb1*2* de papa en plantas de tabaco pues ya estaban en marcha en el laboratorio las técnicas apropiadas para ello. Además papa y tabaco son dos especies muy relacionadas pues pertenecen a la misma familia: *Solanaceae*.

En varias plantas de tabaco transformadas con el promotor del gen *Lhcb1*2* de 1.3 kb fusionado al GUS se determinó el número de copias insertas por genoma mediante "Southern blot". No observamos correlación entre el número de copias insertas y el nivel de expresión del GUS. Esto también fue observado en trabajos realizados por otros grupos (Jones *et al*, 1987). Varias explicaciones han sido sugeridas ya que por ejemplo la expresión refleja diferentes sitios de inserciones o metilación diferencial de las distintas copias insertas (Peerbolte *et al*, 1986).

Las plantas de tabaco obtenidas estaban transformadas en forma estable y eran capaces de transmitir a su progenie T2 la resistencia al marcador de selección (Km). Aplicando la prueba estadística del X^2 determiné el número mínimo de inserciones en cada una de las plantas transformadas. En este análisis no se consideran 2 o más inserciones que pudieran ocurrir en el mismo cromosoma (estas son consideradas como una sola inserción), ya que al plantear las distintas hipótesis (una, dos o tres inserciones) se considera la segregación independiente del carácter estudiado (Km^R). Es debido a esto

que a veces, los resultados obtenidos por "Southern blot" no coinciden con los del análisis por X^2 . Por ejemplo, por "Southern blot" determinamos que la planta 17₂ poseía tres copias de la construcción en estudio insertas en su genoma, mientras que la prueba de X^2 indica que lo más probable es que solo tenga una inserción de la construcción en estudio. Lo que sucede en este caso es que la planta 17₂ posee tres copias de la construcción insertas en el mismo cromosoma, las cuales segregan juntas. También podemos concluir que la planta 15₁ tiene dos copias insertas en un mismo cromosoma, una de las cuales no se insertó en forma completa.

Al estudiar la expresión de la β -glucuronidasa dirigida por el promotor del gen *Lhcb1*2* de papa en las plantas transgénicas de tabaco, observamos que había una fuerte expresión del gen reportero en las hojas. La expresión era menor en los tallos y no se detectó expresión en las raíces. Estos resultados nos permiten concluir que el promotor del gen *Lhcb1*2* de papa es el responsable de dirigir la expresión en ciertos órganos de las plantas. La actividad GUS en los tallos de las plantas transgénicas de tabaco fue entre 3 a 4 veces menor que en hojas. Esto podría explicar el hecho de que el ARNm correspondiente al gen *Lhcb1*2* no se haya detectado en tallos en el experimento de "primer extension" realizado con el "primer específico", ya que la banda tendría que ser 3-4 veces menos intensa que la detectada en hojas y por lo tanto sería difícil de visualizar (Figura 20, calle T). Se observó también que el promotor del gen *Lhcb1*2* dirige la expresión del gen reportero en los sépalos de las plantas de tabaco. No se detectó expresión en los pétalos, ni en los estambres ni pistilos. Por lo tanto, podemos concluir que el promotor del gen *Lhcb1*2* dirige la expresión del gen reportero solo en aquellos tejidos capaces de fotosintetizar.

Pude determinar también que el promotor en estudio dirige la expresión del gen reportero en una etapa temprana del desarrollo de las plantas. Mediante el ensayo histoquímico detectamos expresión del GUS en los cotiledones de las plántulas de tabaco a partir del tercer día de la germinación de las semillas.

Ha sido demostrado que los carotenoides estabilizan la estructura plegada de los polipéptidos del LHCIIb dentro de la membrana (Kuhlbrand, 1994) y que son esenciales para la reconstitución *in vitro* del complejo del LHCII (Plumley *et al*, 1987; Paulsen *et al*, 1990a, 1990b). Esto también es apoyado por el hecho de que en general mutantes sin

carotenoides no poseen LHCII (Michel *et al*, 1983). Nosotros observamos que en las plantas transformadas con el promotor -1300+10/GUS, en presencia de un inhibidor de la síntesis de los carotenos como lo es el Norflurazon, el cual además inhibe el desarrollo de los cloroplastos, no hay expresión del gen reportero. Este resultado y además el hecho de que solo haya expresión en los tejidos fotosintéticos, indicaría que para que el promotor *Lhcb1*2* de *Solanum tuberosum* dirija la expresión requeriría una "señal" proveniente de los cloroplastos.

Hay que destacar que mediante el ensayo histoquímico no se detectó actividad GUS en las plantas transformadas mantenidas durante una semana en oscuridad, mientras que mediante el ensayo fluorométrico se detectó un nivel basal, muy bajo, de actividad GUS. Esto confirma la mayor sensibilidad del ensayo fluorométrico sobre el histoquímico. Sin embargo, hay que tener en cuenta también en este punto que la β -glucuronidasa es una enzima estable y por lo tanto se acumula, por lo que valores muy bajos de expresión pueden aparecer artificialmente más elevados.

Mediante nuestros resultados determinamos que el promotor del gen *Lhcb1*2* de papa es el responsable de la respuesta inducida por la luz. En las plantas de tabaco transformadas con el promotor -1300+10/GUS, hay una inducción de la expresión por la roja de alrededor 6 veces con respecto a la actividad GUS de plantas mantenidas en la oscuridad. Probé también que esta inducción esta mediada por el fitocromo ya que la inducción de la expresión producida por la luz roja es revertida por luz del rojo lejano (Figura 40). Por otra parte, el receptor de luz azul parecería intervenir en la inducción de la expresión del gen *Lhcb1*2* en las plantas de papa ya que el efecto inductor de la luz blanca (naranja + azul) es mayor que el de la luz naranja en las plantas transgénicas de tabaco (Figura 41).

Con la idea de acotar la región del promotor *Lhcb1*2* de papa que responde a la inducción por la luz mediada por el fitocromo y a la expresión específica de tejido, se transformaron plantas de tabaco transformadas con el promotor deletado fusionado al gen *uidA*. Determinamos que la región del promotor comprendida entre las bases -690 a +10 retiene la especificidad de tejido que muestra el promotor entero. También determinamos que esta región del promotor retiene la inducción por la luz mediada por el fitocromo. Por otra parte, la actividad GUS de las plantas transformadas con el promotor deletado ya sea en presencia de luz o en oscuridad, resultó ser menor que la de las plantas transformadas

con el promotor entero. Esto sugiere que río arriba de la base -690 existirían secuencias responsables de aumentar la expresión del gen *Lhcb1*2* de papa.

Observamos mediante el ensayo histoquímico que la localización de la β -glucuronidasa en los tallos varía al comparar las plantas transformadas con el promotor entero o delecionado. En plantas transformadas con el promotor de 1.3 kb la β -glucuronidasa parece localizarse principalmente cerca de los haces vasculares, mientras que en la transformadas con el promotor delecionado se localiza más hacia la perifería, en la región de la corteza. Para confirmar este cambio en la localización del GUS será necesario estudiar, en un futuro, este aspecto en un mayor número de plantas. También sería interesante continuar con el estudio de otras deleciones para determinar así la mínima región del promotor que muestra especificidad de tejido. Es interesante también determinar la mínima región del promotor que responde a la inducción por la luz mediada por el fitocromo y el receptor de luz azul. Estudios realizados con promotores *Lhcb* de otras especies de plantas indicaron que la región del promotor comprendida entre las 250 bases más cercanas al sitio de iniciación de la traducción serían suficientes para mantener la respuesta mediada por el fitocromo (Nagy *et al*, 1987).

También será interesante estudiar el comportamiento de los otros promotores aislados para ver si los distintos genes *Lhcb1* se expresan en forma diferencial bajo distintas condiciones.

CONCLUSIONES FINALES

Conclusiones.

- Se aisló un "cluster" de seis genes *Lhc* a partir de una genoteca de *Solanum tuberosum*. Estos genes se hallan en tandem y todos poseen la misma orientación 5'→ 3'. Ninguno de estos genes posee intrones. Las distintas zonas de código están separadas por aproximadamente 1.3 - 1.4 kb.

Hay que destacar que es la primera vez que se aísla un "cluster" que contiene un número tan alto de genes *Lhc*. Es la primera vez que estos genes son estudiados en esta especie.

- Los genes aislados codifican proteínas que pertenecerían a la antena principal del LHCII, la cual se conoce como LHCIIb. Por otra parte, por sus características pertenecerían al tipo I del LHCIIb, por lo que estos genes fueron denominados: *Lhcb1*1*, *Lhcb1*2*, *Lhcb1*3*, *Lhcb1*4*, *Lhcb1*5* y *Lhcb1*6*.

- Cada uno de estos genes posee 798 pb y codifican proteínas de 265 aminoácidos. Estas proteínas serían clivadas al pasar al interior de los cloroplastos por una peptidasa del estroma, dando así las proteínas maduras de 230 aminoácidos.

- Cada uno de los genes estudiados posee su propio promotor localizado 5' río arriba de la secuencia de código. Estas regiones promotoras poseen la secuencia TATA, característica de promotores transcritos por la RNA polimerasa II, y también poseen la caja CAAT. Por otra parte, muestran secuencias características presentes en los promotores de otros genes cuya expresión es regulada por la luz como ser las secuencias GATA, las secuencias "GT" y la llamada caja "G".

- Al analizar las secuencias de bases se vió que las distintas regiones de código poseen alta homología (entre un 97.9% a 94.3%). Aunque también hay cierta homología entre las distintas regiones promotoras, la misma es menor.
- Por experimentos de "primer extension" y utilizando un "primer" complementario a una zona de la región de código común a todos los genes aislados, pude determinar que los seis genes parecerían expresarse, si bien esto habría que confirmarlo utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos. Además se detectó que se expresan otros genes *Lhcb1* no aislados en este estudio, por lo que se puede estimar que habría al menos 11 genes *Lhcb1* en *Solanum tuberosum*.
- Varios genes *Lhcb1* se expresan en las hojas de plantas de papa, mientras que solo uno se expresa en el tallo. No hay expresión en las raíces. Estos experimentos demuestran que los genes *Lhcb1* de papa poseen una expresión específica de órgano.
- Los genes *Lhcb1* parecen expresarse en forma diferencial en las hojas de las plantas de papa dependiendo del estadio de desarrollo en que se halle la planta.
- Se determinó el sitio de iniciación de la transcripción para el gen *Lhcb1**2. El mismo se halla localizado a 69 bases río arriba del codón de iniciación de la traducción (codón ATG).
- A través de los estudio realizados en las plantas transgénicas determiné que la región promotora del gen *Lhcb1**2 comprendida entre las bases -1300 a +10 es la que determina de la expresión específica de tejido. Se detectó expresión del GUS en las hojas y en los tallos de las plantas de tabaco. No hubo expresión en las raíces. Por otra parte, la expresión resultó ser entre 3 a 4 veces mayor en las hojas que en los tallos. También se detectó expresión en los sépalos pero no en los pétalos de las plantas de tabaco transgénicas. Por lo tanto la región promotora

comprendida entre las bases -1300 a +10 dirige la expresión en aquéllos tejidos capaces de fotosintetizar.

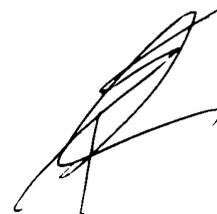
- La expresión del GUS se empieza a detectar a partir de las 72 hs después de la germinación de las semillas, lo cual parece correlacionarse con el tiempo de maduración de los cloroplastos.

- En las plantas en las cuales se impide el desarrollo de los cloroplastos no se detectó actividad GUS. Esto apoya la teoría sobre la necesidad de una "señal" proveniente de los cloroplastos maduros para la expresión de los genes *Lhc*.

- La expresión dirigida por el promotor *Lhcb1*2* es regulada por la luz. Se observó una expresión entre 6 a 7 veces más alta en plantas cultivadas a la luz que en aquéllas mantenidas en oscuridad. Como se demostró esta inducción de la expresión esta regulada por el fotoreceptor fitocromo. El receptor de luz azul también parece mediar esta respuesta.

- El promotor *Lhcb1*2* comprendido entre las bases -690 a +10 retiene la expresión específica de tejido y la regulación de la expresión por la luz que mostró tener la región promotora comprendida entre las bases -1300 a +10. Pude demostrar esta región del promotor del gen *Lhcb1*2* sigue mediando la expresión inducida por la luz a través del fotoreceptor fitocromo.

-El nivel de expresión disminuyó al delecionar el promotor. Estos resultados sugieren que río arriba de la base -690 podría existir una secuencia tipo "enhancer". Por otra parte, el patrón de expresión cambió en el tallo al delecionar el promotor. Esto será necesario analizarlo en un mayor número de plantas para comprobar que en realidad se trata de un efecto de la delección.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad M. y Cashmore A., 1993: "Hy4 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor". *Nature* 366, 162- 166.
- An G., Ebert P., Mitra A. y Ha S., 1988: "Binary vectors". En "Plant Molecular Biology Manual", A3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1- 19,
- Anandan S., Morishige D. y Thornber J., 1993: "Light-induced biogenesis of light-harvesting complex I (LHCI) during chloroplast development in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol.* 101, 227- 236.
- Anderson J. y Andersson B., 1988: "The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion". *Trends in Biochem. Sci.* 13, 351- 355.
- Anderson S., Teakle G., Martino-Catt S. y Kay S., 1994: "Circadian clock- and phytochrome-regulated transcription is conferred by a 78 bp *cis*-acting domain of the *Arabidopsis* CAB2 promoter". *Plant Journal* 6, 457- 470.
- Bassi R. y Simpson D., 1987: "Chlorophyll-protein complexes of barley photosystem I". *Eur. J. Biochem.* 163: 221- 230.
- Bassi R. y Dainese P., 1992: "A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem II membranes". *Eur. J. Biochem* 204: 317- 326.
- Bassi R., Pineau B., Dainese P. y Marquardt J., 1993: "Carotenoid-binding proteins of photosystem II". *Eur. J. Biochem.* 212, 297- 303.
- Bennoun P., Spierer-Herz M., Erickson J., Girard-Bascou J., Pierre Y., Delosme M. y Rochaix J., 1986: "Characterization of photosystem II mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the *psbA* gene". *Plant Mol. Biol.* 6, 151- 160.
- Benton W. y Davis R., 1977: "Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*". *Sciences* 196, 180- 182.
- Bevan M. , Flavell R. y Chilton M., 1983: "A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation". *Nature* 304, 184- 187.
- Bevan M., 1984: "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation". *Nucleic Acids Res.* 12, 8711- 8721.

- Borthwick H., Hendricks S., Parker M. y Toole E., 1952: "A reversible photoreaction controlling seed germination". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 662- 666.
- Bowler C., Neuhaus G., Yamagata H. y Chua N-H., 1994: "Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction". Cell 77, 73- 81.
- Camm E. y Green B., 1983: "Relationship between the two minor chlorophyll a- protein complexes and the photosystem II reaction centre". Biochim. Biophys. Acta 724: 291- 293.
- Casal J., Sanchez R., Di Benedetto A. y De Miguel L., 1991: "Light promotion of seed germination in *Datura ferox* is mediated by a highly stable pool of phytochrome". Photochem. Photobiol. 53, N°2, 249- 254.
- Casal J., 1995: "Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in *Arabidopsis*". Planta 196, 23- 29.
- Cashmore A., 1984: "Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a chlorophyll *a/b*- binding polypeptide". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2960- 2964.
- Castresana C., Staneloni R., Malik V. y Cashmore A., 1987: "Molecular characterization of two clusters of genes encoding type I CAB polypeptides of PSII in *Nicotiana plumbaginifolia*". Plant Mol. Biol. 10, 117- 126.
- Castresana C., García - Luque I., Alonso E., Malik V. y Cashmore A., 1988: "Both positive and negative regulatory elements mediate expression of photoregulated *Cab* gene from *Nicotiana plumbaginifolia*". EMBO J. 7, 1929- 1936.
- Chamovitz D., Pecker I. y Hirschberg J., 1991: "The molecular basis of resistance to the herbicide norflurazon". Plant Mol. Biol. 16, 967- 974.
- Chitnis P. y Thornber P., 1988: "The major light-harvesting complex of the photosystem II: aspects of its cell and molecular biology". Photosynth. Res.16: 41- 63.
- Chomczynski P. y Sacchi N., 1987: "Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". Anal. Biochem. 162, 156- 159.
- Chory J., Peto C., Feinbaum R., Pratt L. y Ausubel F., 1989: "*Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light". Cell 58, 991- 999.
- Chory J., 1993: "Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants". Trends in Genet. 9, 167- 172.

- Clarck G., Memon A., Tong C., Thompson G. y Roux S. , 1993: "Phytochrome regulates GTP-binding protein activity in the envelope of pea nuclei". *Plant J.* 4: 399- 402.
- Dainese P. y Bassi R., 1991: "Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll *a/b* binding proteins". *J. Biol. Chem.* 266: 8136- 8142.
- Dehesh K., Bruce W. y Quail P., 1990: "A *trans*-acting factor that binds to a GT-motif in a phytochrome gene promoter". *Sciences* 250, 1397- 1399.
- Deng Xing-Wang, 1994: "Fresh view of light signal transduction in plants". *Cell* 76, 423- 426.
- Dreyfuss B. y Thornber J., 1994: "Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of photosystem II". *Plant Physiol.* 106, 829- 839.
- Dunahay T. y Staehelin A., 1986: "Isolation and characterization of a new minor chlorophyll *a/b*-protein complex (CP24) from spinach". *Plant Physiol.* 80: 429- 434.
- Dunsmuir P., 1985: "The petunia chlorophyll *a/b*-binding protein genes: a comparison of *Cab* genes from different gene families". *Nucleic Acids Res.*13, 2503- 2518.
- Feinberg A. y Vogelstein B., 1983: "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Anal. Biochem.* 132: 6- 13.
- Furuya M.,1993: "Phytochrome: their molecular species, gene families and functions". *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 617- 645.
- Gallagher Sean R, 1992: en "GUS Protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression". Academic Press, Inc.
- Garnier J., Osguthorpe D. y Robson B., 1978: "Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins". *J. Mol. Biol.* 120, 97- 120.
- Gidoni D., Brosio P., Bond-Nutter D., Bedbrook J. y Dunsmuir P., 1989: "Novel *cis*-acting elements in *Petunia Cab* gene promoters". *Mol. Gen. Genet.* 215, 337- 344.
- Gilmartin P., Sarokin L., Memelik J. y Chua N-H, 1990: "Molecular light switches for plant genes". *Plant Cell* 2: 369- 378.
- Gray J. y Row P., 1995: "Protein translocation across chloroplast envelope membranes". *Trends in Cell Biology* Vol. 5, 243- 247.

- Green B., Pichersky E. y Kloppstech K., 1991: "Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family". Trends in Biochem. Sci 16: 181- 186.
- Grob U. y Stüber K., 1987: "Discrimination of phytochrome-dependent, light-inducible from non-light-inducible plant genes. Prediction of a common light-responsive element (LRE) in phytochrome-dependent, light-inducible plant genes. Nucleic Acids Res. 15: 9957-9973.
- Harpster M., Mayfield S. y Taylor W., 1984: "Effects of pigment-deficient mutants on the accumulation of photosynthetic proteins in maize". Plant Mol. Biol. 3, 59- 71.
- Hart J. W., 1988: "Light and plant growth". En "Topics in Plant Physiology". M. Black and J.Chapman editions, 52-79.
- Harter K., Kircher S., Frohnmeyer H., Krenz M., Nagy F y Schäfer E., 1994: "Light-regulated modification and nuclear translocation of cytosolic G-box binding factors in parsley". Plant Cell 6, 545- 559.
- Harrison M. y Melis A., 1992: "Organization and stability of polypeptides associated with the chlorophyll *a-b* light-harvesting complex of photosystem- II". Plant Cell Physiol. 33, 627- 637.
- Highfield P. y Ellis R., 1978: "Synthesis and transport of the small subunit of chloroplast ribulose biphosphate carboxylase". Nature 271, 420- 424
- Hoffman N., Pichersky E., Malik V., Castresana C., Ko K., Darr S. y Cashmore A., 1987: "A cDNA clone encoding a photosystem I protein with homology to photosystem II chlorophyll *a/b*-binding polypeptides". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8844- 8848.
- Hoffman N. y Franklin A., 1994: "Evidence for a stromal GTP requirement for the integration of a chlorophyll *a/b*-binding polypeptide into thylakoid membranes" Plant Physiol. 105, 295- 304.
- Höfgen R. y Willmitzer L., 1988: "Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation". Nucleic Acids Research 16, 9877.
- Hooykaas P. y Schilperoort R., 1992: "*Agrobacterium* and plant genetic engineering". Plant Mol. Biol. 19: 15- 38.
- Horsch R., Fry J., Hoffmann N., Eichholtz D., Rogers S. y Fraley R., 1985: "A simple and general method for transferring gene into plants". Sciences 227, 1229- 1231.

- Ikeuchi M., Hirano A. y Inoue Y., 1991: "Correspondence of apoproteins of light-harvesting chlorophyll *a/b* complexes associated with photosystem I to *Cab* genes: evidence for a novel type IV apoprotein". *Plant Cell Physiol.* 32: 103- 112.
- Jansson S., Selstan E. y Gustafsson P., 1990a: "The rapidly phosphorylated 25 kDa polypeptide of the light-harvesting complex of photosystem II is encoded by the type 2 *Cab-II* genes". *Biochim. Biophys. Acta* 1019, 110- 114.
- Jansson S. y Gustafsson P., 1990b: "Type I and type II genes for the chlorophyll *a/b*-binding proteins in the gymnosperm *Pinus sylvestris* (Scots pine): cDNA cloning and sequence analysis". *Plant Mol. Biol.* 14, 287- 296.
- Jansson S. y Gustafsson P., 1991: "Evolutionary conservation of the chlorophyll *a/b*-binding proteins: cDNA encoding Type I, II and III LHCl polypeptides from the gymnosperm *Scots pine*". *Mol. Gen. Genet.* 229: 67- 76.
- Jansson S., Pichersky E., Bassi R., Green B., Ikeuchi M., Melis A., Simpson D., Spangfort M., Staehelin A. y Thornber P., 1992: "A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll *a/b*-binding proteins of higher plants". *Plant Mol. Biol. Rep.* 10, 242- 253.
- Jansson S., 1994: "The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins". *Biochim. Biophys. Acta* 1184, 1- 19.
- Jefferson R., 1987a: "Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system". *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387- 405.
- Jefferson R., Kavanaugh T. y Bevan M., 1987b: "GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants". *EMBO J.* 6, 3901- 3907.
- Jefferson R., 1989: "The GUS reporter gene system". *Nature* 342, 837- 838.
- Johnson C., Knight M., Kondo T., Masson P., Sedbrook J., Haley A. y Trewavas A., 1995: "Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic calcium in plants". *Sciences* 269, 1863- 1865.
- Jones J., Gilbert D., Grady K., Jorgensen R., 1987: "T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives". *Mol. Gen. Genet.* 207, 478- 485.
- Karlin-Neumann G., Kohorn B., Thornber J. y Tobin E., 1985: "A chlorophyll *a/b*-protein encoded by a gene containing an intron with characteristics of a transposable element". *J. Mol. Appl. Genet.* 3, 45- 61.

- Kaufman L., 1993: "Transduction of blue-light signals". *Plant Physiol.* 102, 333- 337.
- Knoetzel J., Svendsen I. y Simpson J., 1992: "Identification of the photosystem I antenna polypeptides in barley. Isolation of the three pigment-binding antenna complexes". *Eur. J. Biochem.* 206, 209- 215.
- Kühlbrandt W. y Wang N., 1991: "Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography". *Nature* 350, 130- 134.
- Kühlbrandt W., 1994: "Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography". *Nature* 367, 614- 621.
- Kyte J. y Doolittle R., 1982: "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein". *J. Mol. Biol.* 157, 105- 132.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A. y Randall R., 1951: "Protein measurement with Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193, 265- 275.
- Mancinelli A., 1994: "The physiology of phytochrome action". En "Photomorphogenesis in Plants", 2da edición. R.E. Kendrick & G.H.M. Kronenberg (eds.), 211- 269.
- Mayfield S. y Taylor W., 1984: "Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein (LHCP) mRNA". *Eur. J. Biochem.* 144, 79- 84.
- McGrath J., Terzaghi W., Sridhar P., Cashmore A. y Pichersky E., 1992: "Sequence of the fourth and fifth Photosystem II Type I chlorophyll *a/b*-binding protein genes of *Arabidopsis thaliana* and evidence for the presence of a full complement of the extended CAB gene family". *Plant Mol. Biol.* 19, 725- 733.
- Michel H., Tellenbach M. y Boschetti A., 1983: "A chlorophyll *b*-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking in the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex but not in its apoprotein". *Biochem. Biophys. Acta* 725, 417- 424.
- Michel H., Buvinger W. y Bennett J., 1990: "Redox control and sequence specificity of a thylacoid protein kinase". En "Current Research in Photosynthesis", Vol. 2. Kluwer Academic, Dordrecht, 747- 753.
- Millar A., McGrath R. y Chua N-H., 1994: "Phytochrome phototransduction pathways". *Annu Rev. Genet.* 28, 325- 349.
- Mohr H. y Shropshire W., 1983: En "Encyclopedia of plant physiology", Vol.16A. Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg/ New York/ Tokyo, 24- 38.

- Morishige D. y Thornber J., 1992: "Identification and analysis of a cDNA clone encoding the 31 kilodalton LHCIIa (CP29) apoprotein of the light-harvesting antenna complex of photosystem II". *Plant Physiol.* 98, 238- 245.
- Murashige T. y Skoog F., 1962: "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant.* 15, 473- 497.
- Nagy F., Boutry M., Hsu M-Y., Wong M. y Chua N-H: "The 5'-proximal region of the wheat Cab-1 gene contains a 268-bp enhancer-like sequence for phytochrome response". *EMBO* 6, 2537-2542.
- Nagy F., Kay S. y Chua N-H., 1988: "Analysis of gene expression in transgenic plants". En "Plant Molecular Biology Manual", B4, 1- 29.
- Neuhaus G., Bowler C., Kern R. y Chua N-H., 1993: "Calcium/calmodulin -dependent and -independent phytochrome signal trasduction pathways". *Cell* 73, 937- 952.
- Odell J., Nagy F. y Chua N-H, 1985: "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter". *Nature* 313, 810- 812.
- Oemüller R. y Mohr H., 1985: "Mode of coaction between blue/UV light and light absorbed by phytochrome in light-mediated anthocyanin formation in the milo (*Sorghum vulgare* Pers.) seedling". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6124- 6128.
- Oemüller R., Levitan I., Bergfeld R., Rajasekhar V. y Mohr H., 1986: "Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids". *Planta* 168, 482- 492.
- Parks B. y Quail P., 1993: "*Hy8*, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A". *Plant Cell* 5, 39- 48.
- Paulsen H., Rumler U. y Rudiger W., 1990a: "Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*". *Planta* 181, 204- 211.
- Paulsen H., Finkenzeller B. y Kühlein N., 1990b: "Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein". *Eur. J. Biochem.* 215, 809- 816.
- Peerbolter R., Leenhoutsk, Hooykaas-van Slogteren G., Wullems G., Schilperoort R., 1986: *Plant Mol. Biol.* 7, 285- 299.
- Peter G. y Thornber J., 1991a: *Photosynth. Res.* 34: 249
- Peter G. y Thornber J., 1991b: "Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins". *J. Biol. Chem.* 266, 16745- 16754.

- Peter G. y Thorber J., 1991c: "Biochemical evidence that the higher plant photosystem II core complex is organized as a dimer". *Plant Cell Physiol.* 32, 1237- 1250.
- Pichersky E., Bernatzky R., Tanksley S., Breidenbach R., Kausch A. y Cashmore A., 1985: "Molecular characterization and genetic mapping of two clusters of genes encoding chlorophyll *a/b*-binding proteins in *Lycopersicon esculentum* (tomato)". *Gene* 40, 247- 258.
- Pichersky E., Hoffmann N., Bernatzky R., Piechulla B., Tanksley S. y Cashmore A., 1987: "Molecular characterization and genetic mapping of DNA sequences encoding the Type I chlorophyll *a/b*-binding polypeptide of photosystem I in *Lycopersicon esculentum* (tomato)". *Plant Mol. Biol.* 9, 205- 216.
- Pichersky E., Tanksley S., Piechulla B., Stayton M. y Dunsmuir P., 1988: "Nucleotide sequence and chromosomal location of *Cab-7*, the tomato gene encoding the type II chlorophyll *a/b*-binding polypeptide of photosystem I". *Plant Mol. Biol.* 11, 69- 71.
- Pichersky E., Brock T., Nguyen D., Hoffman N., Piechulla B., Tanksley S. y Green B., 1989: "A new member of the CAB gene family: structure, expression and chromosomal location of *Cab-8*, the tomato gene encoding the type III chlorophyll *a/b*- binding polypeptide of photosystem I". *Plant Mol. Biol.* 12, 257- 270.
- Pichersky E. y Green B., 1990a: "The extended family of chlorophyll *a/b*-binding proteins of PSI and PSII". En "Current Research in Photosynthesis", Vol 3. Kluwer Academic, Dordrecht, 553- 556.
- Pichersky E., Soltis D. y Soltis P., 1990b: "Defective chlorophyll *a/b*-binding protein genes in the genome of a homosporous fern". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 195- 199.
- Pichersky E., Subramaniam R., White M., Reid J., Aebersold R. y Green B., 1991: *Mol. Gen. Genet.* 227, 277- 284.
- Piechulla B., Kellmann J-W, Pichersky E., Schwartz E. y Förster H-H., 1991: "Determination of steady-state mRNA levels of individual chlorophyll *a/b* binding protein genes of the tomato *cab* genes family". *Mol. Gen. Genet.* 230, 413- 422.
- Piechulla B., 1993: "Circadian clock directs the expression of plant genes". *Plant Mol. Biol.* 22, 533- 542.
- Plumley F. y Schmidt G., 1987: "Reconstitution of chlorophyll *a/b* light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 146- 150.

- Reed J., Nagpal P., Poole D., Furuya M. y Chory J., 1993: "Mutations in the gene for the far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development". *Plant Cell* 5, 147-157.
- Robson B. y Suzuki E., 1976: "Conformational properties of amino acids residues in globular proteins". *J. Mol. Biol.* 107, 327- 356.
- Rosahl S., Eckes P. y Willmitzer L., 1986: "Organ-specific gene expression in potato isolation and characterization of tuber-specific cDNA sequences". *Mol. Gen. Genet.* 202, 368- 373.
- Sanger F. y Coulson A., 1975: "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA Polymerase". *J. Mol. Biol.* 94, 441- 448.
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A., 1977: "DNA sequence with chain-terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463- 5467.
- Sanger F. y Coulson A., 1978: "The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing". *FEBS Lett.* 87, 107- 110.
- Sambrook J., Fritsch E. y Maniatis T., 1989 : En "Molecular Cloning: A Laboratory Manual".
- Schindler U. y Cashmore A., 1990: "Photoregulated gene expression may involve ubiquitous DNA binding proteins". *EMBO J.* 9, 3415- 3427.
- Schulze-Lefert P., Dangl J., Becke -Andre M., Hahlbrock K. y Schulz W., 1989: "Inducible *in vivo* DNA footprints defines sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene". *EMBO J.* 8, 651-656.
- Schwartz E. y Pichersky E., 1990: "Sequence of two tomato nuclear genes encoding chlorophyll *a/b*-binding proteins of CP24, a PSII antenna component". *Plant Mol. Biol.* 15, 157- 160.
- Schwartz E., Shen D., Aebersold R., McGrath J., Pichersky E. y Green B., 1991a: "Nucleotide sequence and chromosomal location of *Cab11* and *Cab12*, the genes for the fourth polypeptide of the photosystem I light-harvesting antenna (LHCI)". *FEBS Lett.* 280, 229- 234.
- Schwartz E., Stasy R., Aebersold R., McGrath J., Green B. y Pichersky E., 1991b: "Sequence of a tomato gene encoding a third type of LHCII chlorophyll *a/b*-binding polypeptide". *Plant Mol. Biol.* 17, 923- 925.
- Sharrock R. y Quail P., 1989: "Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family". *Genes Dev.* 3, 1745- 1757.

- Sigrist M. y Staehelin A., 1994: "Appearance of Type 1, 2 and 3 light-harvesting complex II proteins during light-induced greening of barley (*Hordeum vulgare*) etioplasts". *Plant Physiol.* 104, 135- 145.
- Sokal R. y Rohlf F., 1980: "Análisis de frecuencias". En "Introducción a la Bioestadística", Cap.13.
- Southern E. M., 1975: "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis". *J. Mol. Biol.* 98, 503- 517.
- Susek R. y Chory J., 1992: "A tale of two genomes: Role of a chloroplast signal in coordinating nuclear and plastid expression". *Aust. J. Plant Physiol.* 19, 387- 399.
- Susek R., Ausubel F. y Chory J., 1993: "Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development". *Cell* 74, 787- 799.
- Taylor W. C., 1989: "Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes". *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 211-233.
- Thomson D. y Henry R., 1993: "Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis". *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 202- 206.
- Thornber J., Peter G., Morishige D., Gómez S., Anandan S., Welty B., Lee A., Kerfeld C., Takeuchi T. y Preiss S., 1993: "Light harvesting in photosystem I and II". *Biochem. Soc. Trans.* 21, 15- 18.
- Tolmasky M., Actis L. y Crosa J., 1993: "Virulence plasmids". En "Plasmids, a practical approach". Second edition. Hardy K. J. eds, 116- 117.
- Tomes D., Ross M., Higgins R., Rao A., Staebell M. y Howard J., 1990: "Direct DNA transfer into intact plant cells and recovery of transgenic plants via microprojectile bombardment". En "Plant Molecular Biology Manual" A13, Kluwer Academic Publishers, 1- 22.
- Wehmeyer B., Cashmore A. y Schäfer E., 1990: "Photocontrol of the expression of genes encoding chlorophyll *a/b*-binding proteins and small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxilase in etiolated seedlings of *Lycopersicon esculentum* (L.) and *Nicotiana tabacum* (L.)". *Plant Physiol.* 93, 990- 997.
- Weickert M. y Chambliss G., 1989: *USB Editorial Comments* 16, 5.
- White M. y Green B., 1987: "Antibodies to the photosystem I chlorophyll *a+b* antenna cross-react with polypeptides of CP29 and LHCII". *Eur. J. Biochem.* 163: 545- 551.

- Winans S., 1992: "Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions". *Microbiological Reviews* 56, 21- 31.
- Yuan J., Henry R. y Cline K., 1993: "Stromal factor plays an essential role in protein integration into thylakoids that cannot be replaced by unfolding or by heat shock protein Hsp70". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8552- 8556.
- Zambryski P.C., 1992: "Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story". *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 465- 490.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25