

Tesis de Posgrado

Clonado y caracterización de un gen de tomate modulable por ácido abscísico

Rossi, María Magdalena

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:

Rossi, María Magdalena. (1996). Clonado y caracterización de un gen de tomate modulable por ácido abscísico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2882_Rossi.pdf

Cita tipo Chicago:

Rossi, María Magdalena. "Clonado y caracterización de un gen de tomate modulable por ácido abscísico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2882_Rossi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Clonado y caracterización de un gen de tomate modulable por ácido abscísico

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas.

Lic. María Magdalena Rossi

Director: Dr. Norberto Daniel Iusem

1996

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICV, INTA Castelar y Laboratorio de
Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Ciencias
Biológicas, FCE yN-UBA.

AGRADECIMIENTOS

Mil veces con la mirada perdida escribí en mi cabeza los agradecimientos de mi tesis, incluso antes de saber de qué se iba a tratar. Sin embargo, acá estoy y no se por donde empezar...

Quisiera agradecer...

En primer lugar a Norbius por haberme enseñado con absoluta dedicación, incluso pipeteando a la par mía durante mucho tiempo. Por haber estado siempre dispuesto a dedicarme todo el tiempo que hiciera falta discutiendo resultados, estrategias, resolviéndome problemas o simplemente aplacando mis angustias hasta ayer (como pocos jefes pueden hacerlo).

Muy, pero muy, especialmente a Esteban por haberse interesado en mi formación permitiéndome trabajar en su laboratorio, por sus infinitos consejos y opiniones y por ocuparse de mí como parte de su equipo. Porque aunque en los papeles no figure es también mi jefe.

A Luis Herrera-Estrella por haberme brindado la posibilidad de trabajar en su laboratorio y por el trabajo que hicimos juntos y con Fernando. Por los momentos divertidos que pasamos que me permitieron desmitificar a los "ídolos".

A Dario Bernacchi por la colaboración imprescindible en el mapeo de los genes.

A Fernando porque buena parte de este trabajo no hubiera sido posible sin él.

A Eduardo Palma como representante del INTA por su apoyo institucional.

A la UBA por la beca de iniciación.

A Fer, Paula (Cramer), y a Mariana por todo lo que me enseñaron desde que era una "chiquitita" hasta ahora y sobre todo por los consejos útiles a tiempo.

Al Doctor *honoris causa* Daniel Lindisky por su invaluable asesoramiento en softwares, audio, video y computers.

A Ceci V. y Sebas por haber cuidado mis hijas mientras estuve en México. Y a Ceci en particular (5º-1º) por.....no me pudientes.

A Nilda por haberme salvado de preparar medios más de una vez y a Tere por el tiempo que le dedicó a mis plantitas.

A Osvaldo, Angel y Lela que siempre estuvieron bien predispuestos para canalizar mis inquietudes.

Al club de fumadores: Pauli, Ceci T., Lau, Dany, Fernando, Fabi y Osky (aunque no te asumas como tal) por las horas que con café y pucho en mano filosofamos, nos divertimos y nos quejamos.

A Oskey porque lo nuestro no pudo ser.

A Marce porque pipeta en mano escribimos más de un libreto para series. Y bueno, tú sabes.....

A Susy por sus recetas caseras para solucionar todo tipo de problemas, abarcando desde la Biología Molecular hasta problemas circulatorios.

A Eleo, Laura, Caro, Sebas, Juan, Daniel y Agueda por la sangre nueva que aportaron al laboratorio.

A Dany especialmente porque siempre se interesó y preocupó de las vicisitudes de mi vida.

A Alez, Analía, Ceci T. y Silvito por haber sido cómplices del incidente de los "pirotines" y con el deseo de intentarlo nuevamente.

Una mención especial para Jorge Dubcovsky porque a pesar de no haber sido dotado del mejor de los humores, la tiene muy clara, sus opiniones dan siempre en la tecla, y es un gran ejemplo.

A todo el malón del IB (ex IBM) en general, a los que ya nombré, y a Mercedes, Ale E., Marisa, Alicias, Erika, Ana Rosa, y creo que no me olvido de nadie, porque convivimos bajo el mismo techo.

A mis grandes amigos Dalia, Ernes, Guille, Fer, Vero y Daniel por todas las risas y lágrimas que compartimos y el puntal incondicional que significaron para mí en todos estos años.

A Pacha, primo y ex-marido, que durante buena parte de este trabajo estuvo al lado mío.

A mamá por haberme dado ánimo, haber respetado todas mis decisiones y enjugado lágrimas que poco tenían que ver con la ciencia. Por ser mi gran refugio afectivo.

A Diego porque gracias a él, el mundo de los marcadores moleculares no me es tan ajeno y por sus muy buenas ideas que aportaron mucho material a este trabajo. Porque una vez me dijo que todo iba a salir bien...y así fue; que con su optimismo y paciencia me hizo sentir que, sin bien nuestra actividad nos machaca la cabeza, hay otras cosas mucho más importantes. Porque fue y es mi gran continente.

A papá...

INDICE

RESUMEN	7
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCION	11
1. BIOSISTEMATICA DE TOMATE.	11
1.1. Ubicación taxonómica del tomate dentro de la familia Solanaceae.	11
1.2. Composición del género <i>Lycopersicon</i>	12
2. EL CULTIVO DE TOMATE. PROBLEMATICAS FISIOLÓGICAS.	13
3. EL ABA.	16
3.1.¿Cómo esta regulada la respuesta molecular al ABA?.	17
3.1.1. Percepción de la señal hormonal.	18
3.1.2. Segundos mensajeros.....	19
3.2. Genes inducidos por ABA.....	22
4. ACERCA DE ASR1	25
5. METODOS DE TRANSFORMACION VEGETAL.....	27
5.1. Transformación por bombardeo de microproyectiles.	27
5.2. Transformación estable mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
6. OBJETIVOS GENERALES.	30
MATERIALES Y METODOS	31
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
1.1. Genoteca.	31
1.2. Cepas bacterianas.	31
1.2. Plásmidos.....	32
1.3. Material vegetal.....	34
2. PROTOCOLOS CLÁSICOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	35
3. OLIGONUCLEOTIDOS.....	35
4. SECUENCIACION Y ANALISIS DE LA SECUENCIA.....	37
5. ANALISIS DEL ARN MENSAJERO DE ASR2.....	39
5.1. Aislamiento de ARN de fruto.....	39

5.2. "Primer extension"	39
6. EXTRACION DE ADN GENOMICO DE PLANTAS PARA PCR.....	40
7. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	41
8. EXTRACCION DE ADN GENOMICO DE PLANTAS PARA "SOUTHERN BLOT"	42
9. ANALISIS DE LIGAMIENTO POR RFLP.....	42
10. BOMBARDEO CON MICROPROYECTILES.....	43
10.1. Condiciones de bombardeo.	43
10.2. Ensayos de expresion transitoria.	44
10.3. Transformación estable de papaya por bombardeo de microproyectiles.	44
11. TRANSFORMACION VEGETAL VIA AGROBACTERIUM TUMEFACIENS.....	46
11.1. Transformación de las agrobacterias.....	46
11.2. Transformación de tabaco con <i>A. tumefaciens</i>	46
11.3. Transformación de discos de hoja de papa con <i>A. tumefaciens</i>	47
12. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE β -GLUCURONIDASA.	48
RESULTADOS	50
1. ANALISIS DE LA BIBLIOTECA GENOMICA: CLONADO DEL GEN ASR.	50
1.1. Titulación de la biblioteca genómica de EMBL3.	50
1.2. Selección de clones positivos.....	50
2. SUBCLONADOS Y SECUENCIACION DEL GEN ASR.....	51
2.1. Mapa de restricción del clon 911.....	51
2.2. Subclonados y generación de clones con insertos más pequeños mediante deleciones.....	53
2.3. Secuenciación del clon pNM504 y sus deleciones.....	57
2.4. Rescate de la parte 5' del gen <i>Asr</i> : plásmido pNM531 y derivados.....	57
2.5. Secuenciación de pNM531 y sus derivados.	61
3. ANALISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN ASR.....	61
3.1. Características estructurales del gen <i>Asr</i>	61
3.2. Determinación del tamaño aproximado del mensajero de <i>Asr2</i>	64

3.3. Identificación del sitio de iniciación de la transcripción de <i>Asr2</i>	65
3.4. Homología de <i>Asr2</i> con otros genes.	66
4. DISCRIMINACION Y MAPEO DE <i>ASR1</i> , <i>ASR2</i> Y <i>ASR3</i>	67
4.1. Discriminación de <i>Asr1</i> , <i>Asr2</i> y <i>Asr3</i> por análisis de PCR.....	67
4.2. Mapeo de alta resolución de <i>Asr1</i> , <i>Asr2</i> y <i>Asr3</i>	70
5. OBTENCION DE UNA CONSTRUCCION CONTENIENDO LA REGION 5´ DE <i>ASR2</i> Y UN GEN INDICADOR. ANALISIS FUNCIONAL DE LA MISMA POR EXPRESION TRANSITORIA.	73
5.1. Subclonado de la región 5´ de <i>Asr2</i> en un vector plasmídico conteniendo un gen indicador: construcción del plásmido pNM600. ...	73
5.2. Ensayos de expresión transitoria.	76
6. TRANSFORMACION ESTABLE.	77
6.1. Obtención y análisis de plantas de papaya transgénicas con cañón génico.	78
6.1.1. Obtención y chequeo de las plantas.	78
6.1.2. Análisis de las plantas de papaya transgénicas.....	79
6.2. Transformación vegetal vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	84
6.2.1. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el plásmido pNM600.	84
6.2.2. Obtención de tabacos y papas transgénicos vía <i>A. tumefaciens</i>	86
6.2.3. Estudio de la expresión de β -glucuronidasa en los tabacos y papas transgénicos.	92
DISCUSION	96
CONCLUSIONES	108
BIBLIOGRAFIA	109

RESUMEN

En este trabajo se clonó y se caracterizó estructuralmente un gen de tomate (*Asr2*), homólogo a un cADN inducible por ácido abscísico (ABA), estrés hídrico y maduración (*Asr1*) previamente clonado. Por otro lado, se comprobó la existencia de una familia génica, de por lo menos tres miembros, localizada en el cromosoma 4 a la cuál pertenecen *Asr1* y *Asr2*. Para conocer la funcionalidad de la región 5' de *Asr2* en la expresión génica, estas secuencias fueron fusionadas al gen de la β -glucuronidasa (GUS). Con la construcción resultante, se llevaron a cabo ensayos de expresión transitoria en *Carica papaya* L. mediante cañón génico y se obtuvieron plantas transgénicas de papaya, tabaco y papa vía cañón génico y *A. tumefaciens*. Los resultados muestran que la región 5' de *Asr2* posee funciones de promotor *in vivo* y que además el ABA modula la expresión de GUS en ambos sistemas, transitoria y estable.

Cloning and characterization of an abscisic acid-modulated tomato gene

ABSTRACT

This work reports the cloning and structural characterization of a tomato gene (*Asr2*), homologous to an abscisic acid (ABA), stress and ripening-induced cDNA (*Asr1*) previously cloned. In addition, the results obtained were able to define a gene family of at least three closely linked loci located to chromosome 4 to which *Asr1* and *Asr2* belong. To assess the role of the 5'-upstream DNA sequences from *Asr2* in gene expression, they were fused 5' to the reporter β -glucuronidase (GUS) gene. The resulting chimeric construct was used for transient expression assays in *Carica papaya* L. with gene gun and to obtain papaya, tobacco and potato transgenic plants via gen gun and *A. tumefaciens*. The results show that *Asr2* upstream DNA sequences posses promotor functions *in vivo* and furthermore, exogenous ABA stimulates GUS expression in both transient and stable transformation systems.

Key Words: *Asr*, ABA, tomato, RFLP mapping, gene family, gene expression, transgenic plants.

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en los siguientes artículos:

- Rossi M. y Iusem N.D. (1994). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) genomic clone homologous to a gene encoding an abscisic acid-induced protein. *Plant Physiology* 104:1073-1074.

- Rossi M. y Iusem N.D. (1995). Sequence of *Asr2*, a member of a gene family from *Lycopersicon esculentum* encoding chromosomal proteins: homology to an intron of the polygalacturonase gene. DNA sequence, *The Journal of Sequencing and Mapping* 5:225-227.

- Rossi M., Lijavetzky D., Bernacchi D., Hopp E. y Iusem N.D. (1996). *Asr* genes belong to a tomato gene family of at least three closely linked loci located to chromosome 4. *Molecular and General Genetics* 252:489-492.

ABREVIATURAS

3': río abajo.

5': río arriba.

ABA: ácido abscísico (hormona vegetal).

ADN: ácido desoxiribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

BrEt: Bromuro de Etidio.

cM: centimorgans.

F₂: segunda filial.

GUS: β-glucuronidasa.

Kb: kilobases.

KD: kilodalton.

p.f.u.: unidades formadoras de placa.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PPT: fosfinotricina.

RFLP: restriction fragment length polimorfism.

rpm: revoluciones por minuto.

X-Gal: 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galactopiranosido (sustrato de la β-galactosidasa).

X-Glu: 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-glucurónido (sustrato de la β-glucuronidasa).

INTRODUCCION

1. BIOSISTEMATICA DE TOMATE.

1.1. Ubicación taxonómica del tomate dentro de la familia Solanaceae.

Las variedades de tomate comercial son incluidas dentro de la especie *Lycopersicon esculentum*.

Lycopersicon es un género relativamente pequeño dentro de la extensa y diversa familia Solanaceae. Esta familia contiene alrededor de 90 géneros que están divididos en dos grandes sub-familias, *Solanoideae* y *Cestroideae*. Esta división se basa en los diferentes patrones de desarrollo embrionario: *Solanoideae* posee embriones enrollados, mientras que *Cestroideae* tiene embriones típicamente derechos o apenas curvados. Existen numerosas diferencias morfológicas, químicas y citogenéticas que acompañan esta división básica.

Solanoideae muestra uniformidad citogenética ya que todos sus miembros tienen un número básico de $n=12$; en cambio *Cestroideae* tiene números básicos variables, raramente 12. El género *Lycopersicon* es un típico integrante de la sub-familia *Solanoideae*, todos sus miembros poseen una fórmula $2n=24$.

La sub-familia *Solanoideae* está subdividida en tribus, *Lycopersicon* pertenece a la tribu *Solaneae* que es la más extensa y contiene 18 géneros. *Lycopersicon* es el género más pequeño y el más próximo al género *Solanum* el cual es el más extenso dentro de la familia. *Solanum* incluye 1500 especies y es el género más diverso y complejo dentro de las plantas vasculares, lo cual genera problemas a los taxónomos y distorsiona el estado de género independiente de *Lycopersicon*.

1.2. Composición del género *Lycopersicon*.

Actualmente la clasificación sub-genérica aceptada es la que divide al género en dos complejos. El complejo *esculentum* el cuál incluye seis especies (*Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Lycopersicon cheesmanii*, *Lycopersicon parviflorum*, *Lycopersicon chmielewskii* y *Lycopersicon hirsutum*) y el complejo *peruvianum* con dos especies (*Lycopersicon chilense* y *Lycopersicon peruvianum*). A continuación se detallan algunas características de las especies utilizadas en este trabajo.

Debido a su valor como cultivo, *Lycopersicon esculentum* ha sido diseminada por todo el mundo. El lugar original de su domesticación es incierto aunque las evidencias sugieren que fue en México. El tomate cereza (*L. esculentum* var. *cerasiforme*) es el ancestro directo de las variedades modernas cultivadas y es el único tomate salvaje que se encuentra fuera de Centroamérica y América del Sur.

Todos los representantes de esta especie son autocompatibles y extremadamente endocriados. La domesticación involucró la selección continua para frutos de mayor tamaño. A pesar de esto, las variedades modernas de tomate están altamente relacionadas a las especies salvajes, como *L. esculentum* var. *cerasiforme* y ambos grupos se inter cruzan libremente.

Lycopersicon hirsutum se distingue del resto de las especies porque sus frutos son verdes. Esta especie es la que se encuentra en zonas más altas, entre los 500 y 3300 metros sobre el nivel del mar. Es autoincompatible, aunque algunos biotipos pueden ser autofecundados artificialmente. Semillas fértiles y plantas híbridas pueden obtenerse utilizando *L. esculentum* como madre (el cruzamiento reverso no da frutos). *Lycopersicon hirsutum* posee características importantes desde el punto de vista agronómico, como resistencia a lepidópteros, arácnidos, bacterias, hongos y virus.

Respecto a *Lycopersicon pennelli*, su ubicación taxonómica no ha sido muy clara e históricamente se la incluyó en el género *Solanum* (Correll, 1962).

Actualmente existen evidencias morfológicas, quimiotaxonómicas y genéticas por las cuales se ha incluido esta especie dentro del género *Lycopersicon*, particularmente dentro del complejo *esculentum*, ya que es sexualmente compatible con las especies que lo componen y no con las pertenecientes al complejo *peruvianum*. Existen biotipos autocompatibles y autoincompatibles, los cuales con *Lycopersicon esculentum* producen híbridos fértiles que pueden ser fácilmente retrocruzados (siempre usando a *Lycopersicon esculentum* como madre). *Lycopersicon pennelli* habita las áreas más calientes y secas, además posee gran proporción de los estomas en la cara adaxial de la hoja, lo cual le permite aprovechar la humedad atmosférica. Por su adaptación a los ambientes secos, esta especie es utilizada en mejoramiento como dador de caracteres de resistencia a sequía.

2. EL CULTIVO DE TOMATE. PROBLEMAS FISIOLÓGICAS.

El tomate es uno de los cultivos económicamente más importantes y está mundialmente distribuido. Son muchas las regiones sometidas a sequía donde se cultiva tomate. El estado hídrico de la planta es dinámico y depende de una combinación de factores del suelo, atmósfera y de la planta misma. La disponibilidad de agua no sólo depende de la retención en el suelo sino que también del sistema radicular de la planta, lo cual involucra el tamaño, densidad y actividad del mismo. Por otro lado, la pérdida de agua depende de la humedad ambiente, área foliar, actividad estomatal y de la capacidad de absorber agua del suelo. Fluctuaciones en la radiación, humedad y temperatura producen alteraciones en el estado hídrico de la planta. Frente a estos cambios, la planta responde disparando mecanismos metabólicos que le permiten adaptarse a los cambios

ambientales. Estas respuestas afectan al tomate en su capacidad de crecer, desarrollarse y producir fruto. Debido al rol determinante del agua en la producción de tomate, es muy importante el estudio de los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta al estrés hídrico y osmótico, los cuales serán abordados más adelante.

El otro tema importante en el cultivo de tomate es la maduración del fruto, ya que implica un problema durante la comercialización y el almacenamiento. En este sentido, el tomate se ha convertido en el cultivo modelo para el estudio de la fisiología molecular de la maduración. Esta involucra cambios en la actividad de enzimas en todas las partes de la célula, como consecuencia de cambios en la expresión de genes. Esto conduce a alteraciones en el color, textura, sabor, aroma y en la susceptibilidad del fruto a patógenos oportunistas. El cambio de color del fruto se debe a la transición de cloroplastos a cromoplastos; durante este proceso la clorofila es degradada y se acumulan carotenoides. El ablandamiento es consecuencia de la actividad de enzimas que degradan la pared celular disminuyendo la rigidez del fruto. Los niveles de azúcares, ácidos y compuestos volátiles también se alteran durante la maduración, dando el aroma y sabor del fruto maduro. Existen muchas evidencias que sugieren que la maduración de los frutos climatéricos (como el tomate, manzana y banana) se inicia por un aumento de la concentración de etileno, que es sintetizado a partir de S-adenosil metionina vía ACC (ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato) sintetasa y ACC oxidasa. Por ejemplo, la aplicación de etileno (o análogos) induce la maduración de frutos verdes mientras que la aplicación de inhibidores de la acción o percepción del etileno retardan la maduración. Se ha comprobado que el etileno actúa a nivel transcripcional induciendo y reprimiendo la expresión de genes involucrados en el proceso de maduración (Gray et al., 1994). Debido a que este fenómeno comprende alteraciones en muchas diferentes rutas bioquímicas, la investigación se ha focalizado en la identificación de genes que controlan estos procesos y en

conocer sus funciones y regulación. La técnica de la expresión de genes antisentido ha sido exitosa para el estudio de la función de muchos genes y en algunos casos se ha logrado hasta el retardo de la maduración. Dos puntos han sido atacados con el fin de retrasar el proceso de maduración: genes del metabolismo de la pared celular y genes involucrados en la síntesis de etileno.

El primer gen que se estudió en profundidad fue el de la poligalacturonasa (PG), proteína que degrada la pectina de la pared celular y su expresión es inducida por etileno, aumentando 100 veces durante la maduración (DellaPenna et al., 1986). Tomates transgénicos expresando el gen antisentido de la PG (Smith et al., 1990) mostraron una leve pero significativa diferencia de consistencia con los tomates salvajes (Grierson y Schuch, 1993) y algunas características comercialmente valiosas como consecuencia de la alteración del metabolismo de la pectina debida a los bajos niveles de poligalacturonasa (Schuch et al., 1991). Estos frutos fueron más resistentes al daño mecánico, lo cuál permitió su cosecha en un estado más avanzado de la maduración resultando un fruto más sabroso y por otro lado, los extractos tenían mayor viscosidad y mayor contenido de sólidos solubles (estos tomates fueron comercializados por Calgene, USA).

Hamilton et al. (1990) produjeron plantas transgénicas con el clon TOM 13 en orientación antisentido que producían sólo el 5% de los niveles normales de etileno durante la maduración. Estudios posteriores confirmaron que TOM 13 codificaba para la enzima ACC oxidasa (Hamilton et al., 1991). Los frutos de estas plantas no sobremaduraban ni se marchitaban como los controles sin transformar, mientras que la germinación, desarrollo y crecimiento eran normales (Picton et al., 1993). Una vez identificada la ACC sintetasa (Sato y Theologis, 1989), también se obtuvieron plantas transgénicas de tomate con su gen en orientación antisentido que mostraron una reducida síntesis de etileno, hasta un 95% respecto de los controles (Oeller et al., 1991); en este caso, los frutos mostraron un patrón de maduración extremadamente anormal con retraso en el ablandamiento y un comportamiento climatérico muy disminuido. Tanto en las plantas transgénicas que llevaban los genes de ACC

oxidasa o ACC sintetasa antisentido, el fenotipo era revertido ante la aplicación exógena de etileno.

3. EL ABA.

El ácido abscísico (ABA) fue descubierto en la década del cincuenta siendo el primer nombre que se le dio "abscisina II" ya que se lo relacionó al control de la abscisión de los capullos de algodón. Casi simultáneamente, otro grupo lo llamó "dormina" por estar involucrado en la dormición de las yemas. Poco tiempo después, fue caracterizado como un sesquiterpeno que es sintetizado a partir del ácido mevalónico en raíz y hojas, aunque ciertos pasos de su biosíntesis en plantas son aún desconocidos (Li y Walton, 1987; Zeevaart y Creelman, 1988; Parry y Horgan, 1991). Tal e Imber (1970) demostraron que la pérdida de agua causaba una rápida acumulación de ABA en toda la planta y especialmente en hojas jóvenes y que aparentemente existiría un potencial de agua umbral por debajo del cual se produciría dicha acumulación.

Esta fitohormona participa en el control de importantes aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Giraudat, 1995) modificando los patrones de expresión de genes a nivel transcripcional (Bray, 1988; Skriver y Mundy, 1990; Bray, 1993). En las semillas, el ABA regula procesos esenciales para la viabilidad y la germinación junto a otros factores de desarrollo aún no identificados. Estos procesos incluyen la morfogénesis del embrión (Quatrano, 1987), acumulación de proteínas y lípidos de reserva (Finkelstein et al., 1985), la inducción de la dormición (Koornneef et al., 1989) y la adquisición de la tolerancia a la desecación (Kermode y Bewley, 1987). En tejidos vegetativos, el ABA es un mediador necesario para disparar respuestas

adaptativas -fisiológicas y moleculares- de la planta frente a condiciones ambientales adversas, como por ejemplo estrés hídrico y osmótico.

3.1.¿Cómo esta regulada la respuesta molecular al ABA?.

La respuesta molecular de las plantas al estrés hídrico y osmótico es un rompecabezas: ¿cómo es que la célula reconoce la pérdida de agua y responde a eso?, ¿cómo es que un fenómeno fisiológico como la pérdida de agua de la célula causa una respuesta bioquímica como la inducción de genes específicos?. No tenemos aún la respuesta a estas preguntas. Se piensa que la pérdida de la turgencia o el cambio del volumen celular como resultado de diferentes condiciones de estrés determinan la percepción de la pérdida de agua a nivel celular. Estos cambios pueden activar canales iónicos, alterar la conformación de proteínas críticas o causar modificaciones en la pared celular y membrana plasmática (Ding y Pickard, 1993), disparando un sistema de transducción de señales que induce la expresión de genes. Diferentes tipos de estrés podrían activar el mismo o similar sistema de transducción de señales. De la/s vía/s de inducción es muy poco lo que se sabe; sin embargo, de las evidencias se desprende que la ruta es más de una. El ABA es acumulado en respuesta al fenómeno físico de la pérdida de agua causada por diversos tipos de estrés y el aumento de las concentraciones endógenas de ABA induce genes blanco, por lo tanto, la acumulación de ABA no es más que un paso en la transducción de señales hasta la inducción de genes durante el déficit de agua.

3.1.1. Percepción de la señal hormonal.

El receptor del ABA no ha sido identificado aún. Se observó que en embriones de trigo distintos genes inducidos por ABA requieren diferentes variantes estereoquímicas de ABA para su inducción (Walker-Simmons et al., 1992). Esto sugiere que la expresión de genes debe estar regulada por más de un tipo de receptor.

La primera incertidumbre en la búsqueda del receptor ha sido en donde buscar, es decir si se trata de un receptor intra o extracelular. Existen distintas evidencias experimentales realizadas con células oclusivas de los estomas foliares que apoyan una u otra alternativa. Por ejemplo, Schwartz et al. (1994) y Allan et al. (1994) demostraron que la microinyección de ABA en el citoplasma de células oclusivas provoca el cierre de los estomas e inhibe el influjo de K^+ a través de los canales, apoyando la idea de la localización intracelular del receptor de ABA. En cambio, Anderson et al. (1994) reportaron que la aplicación de ABA al interior de las células oclusivas inicialmente cerradas no inhibía la habitual apertura del estoma en respuesta a la luz blanca; sin embargo, los estomas permanecían cerrados con la aplicación externa de ABA, sugiriendo la existencia del receptor en la membrana plasmática.

La posibilidad de que el receptor de ABA se encuentre exclusivamente en la superficie externa de las células es prácticamente descartada debido a que los experimentos de Schwartz et al. (1994) y Allan et al. (1994) son concluyentes. Una segunda opción sería la coexistencia de receptores intra y extracelulares. Ya que el cerrado y la inhibición de la apertura de los estomas involucran mecanismos relativamente separados, estos podrían estar disparados por la ocupación de receptores de ABA internos y externos respectivamente. Sin embargo, la alternativa de que el ABA es percibido sólo intracelularmente es la opción más aceptada, la cual sería obviamente compatible con los estudios mencionados sobre el cerrado de los estomas. Para conciliar la idea de un receptor exclusivamente intracelular y los resultados de Anderson et al. (1994) es necesario hacer algunas consideraciones

cinéticas. El ABA estimula el cerrado de los estomas por lo menos hasta los 30 (Allan et al., 1994) o 60 minutos (Schwartz et al., 1994) luego de la microinyección; esta respuesta podría ser el resultado de una breve activación de los receptores internos por aumento de la concentración de ABA por cortos períodos (2 minutos). En cambio, para inhibir la apertura inducida por la luz blanca podrían ser requeridas altas concentraciones de ABA durante períodos más largos. En este sentido, Anderson et al. (1994) monitorearon la apertura de los estomas a partir de 45 minutos después de la microinyección, período durante el cual, es probable que las concentraciones citoplasmáticas de ABA hayan descendido por degradación, conjugación y/o compartimentalización y por lo tanto los estomas se hayan abierto; mientras que con la aplicación externa de ABA, su incorporación al citoplasma haya sido gradual y más prolongada, impidiendo la apertura de los estomas por más tiempo.

3.1.2. Segundos mensajeros.

La existencia de segundos mensajeros de ABA intracelulares ha sido muy estudiada en células oclusivas de los estomas. Hay muchas evidencias de que el ABA produce un aumento en la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma, ya sea por un aumento en la incorporación o por liberación a partir de reservorios intracelulares, que precede el cerrado de los estomas (Lemtiri-Chlieh y MacRobbie, 1994). No obstante, McAinsh et al. (1992) observaron cerrado de los estomas sin aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático. Esta discrepancia pudo deberse a limitaciones técnicas o a que efectivamente el Ca^{2+} no es intermediario en la señal del ABA. Allan et al. (1994) dio una respuesta a estas observaciones: observó que en plantas crecidas por sobre los 25°C , el cerrado de los estomas inducido por el ABA estaba asociado a un aumento en la concentración de Ca^{2+} , mientras que en

plantas crecidas entre 10-17°C, el Ca^{2+} no aumentaba en respuesta al ABA a pesar de que los estomas se cerraban. En plantas sometidas a estrés hídrico también se observó una respuesta a ABA independiente del Ca^{2+} . Estos resultados sugieren que las células oclusivas poseen sistemas de transducción de señales redundantes para el ABA uno de los cuales involucra el Ca^{2+} , y que el uso diferencial de estos sistemas permite a la planta integrar factores ambientales como la temperatura y la disponibilidad de agua.

La concentración de H^+ es otro de los candidatos para segundo mensajero de ABA actuando en la vía independiente de Ca^{2+} (Blatt y Thiel, 1993). El ABA provoca una alcalinización del citoplasma de las células oclusivas (Blatt y Armstrong, 1993), pero no se ha establecido aún si dicha alcalinización es suficiente para promover el cerrado de los estomas. Por otro lado, los canales de K^+ localizados en la membrana plasmática, responsables del eflujo de K^+ durante el cerrado de los estomas, son extremadamente sensibles a variaciones del pH (Lemtiri-Chlieh y MacRobbie, 1994).

La aplicación de tecnologías modernas que permiten el estudio de células aisladas permitirán pronto dilucidar el rol exacto del pH en la transducción de la señal del ABA y clarificar la interacción entre los dos potenciales segundos mensajeros propuestos.

Otro punto importante a ser esclarecido es de que manera el Ca^{2+} y el H^+ , y otros posibles segundos mensajeros, modulan la actividad de los canales iónicos. Hay varias evidencias de que proteínas kinasas (Lee y Assmann, 1991; Anderberg y Walker-Simmons, 1992), fosfatasas (Luan et al., 1993; Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994; Thiel y Blatt, 1994) y proteínas que pegan GTP (Fairley-Grenot y Assmann, 1991; Lee et al., 1993; Wu y Assmann, 1994) regulan varios canales iónicos en las células oclusivas.

Sin bien se sabe bastante sobre la regulación por ABA de los canales iónicos de las células oclusivas, es muy poco lo conocido sobre putativos segundos mensajeros que transducen los efectos del ABA a la expresión de genes. En este

sentido, la caracterización de secuencias de nucleótidos actuantes en *cis* involucradas en la activación o represión de la transcripción por ABA (Hetherington y Quatrano, 1991; Giraudat, 1995) y la identificación de proteínas que actúen en *trans* sobre dichos elementos en el ADN (Guiltinan et al., 1990; Oeda et al., 1991) permitirá entender como dichos factores de transcripción están ligados a anteriores instancias en la transducción de la señal del ABA.

El análisis de mutantes ofrece una alternativa interesante para la identificación de genes involucrados e la transducción de la señal del ABA. En particular, se han analizado mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensibles al ABA y se identificaron alrededor de diez loci ABI (ABA-insensitive) involucrados (Koornneef et al., 1984; Finkelstein, 1994). Mutaciones en ABI3 produce numerosos defectos durante la embriogénesis tardía, incluyendo la reducción de la expresión de múltiples genes y problemas durante el desarrollo de la tolerancia a desecación de la semilla (Ooms et al., 1993; Parcy et al., 1994). La secuencia de aminoácidos de ABI3 presenta características de factor de transcripción (Giraudat et al., 1992) y se observó que la expresión ectópica de ABI3 en tejidos vegetativos de plantas transgénicas activa la transcripción desde varios promotores (específicos de semilla) en respuesta al ABA (Parcy et al., 1994). Recientemente, se han descrito los loci ABI4 y ABI5 (Finkelstein, 1994), que parecen controlar también la respuesta a ABA en semilla y no en tejido vegetativo, sumando evidencias de la existencia de una vía de transducción de señal de ABA específica de semilla. Por otro lado, mutantes en ABI1 y ABI2 son defectivas en la regulación de los estomas y en otras respuestas moleculares a ABA en tejido vegetativo (Finkelstein, 1990; Gosti et al., 1995). ABI1 tiene un dominio aminoterminal que presenta estructuras "EF-hand" que pegan calcio y otro carboxiterminal con actividad de fosfatasa en serina y treonina (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994). El alelo mutante impide tanto la activación de genes inducibles por ABA en tejidos vegetativos como la fosforilación de proteínas que se sabe regulan la formación o actividad de complejos transcripcionales en otros sistemas vegetales (Harter et al., 1994). Finalmente, en las plantas mutantes ABI1, se observó

una excesiva pérdida de agua (Koornnef et al., 1984) y un aumento en la apertura de los estomas (Leung et al., 1994), sugiriendo que ABI1 participa en la regulación de la turgencia de las células oclusivas. Como se describió anteriormente, existen varias evidencias que sostienen que el calcio intracelular actúa como segundo mensajero en al menos una de las rutas del ABA en las células oclusivas y que la actividad de los canales iónicos de estas células es sensible a la fosforilación. Por lo tanto, ABI1 podría transducir la señal de ABA o de calcio modificando directamente o indirectamente (a través de otras kinasas), el nivel de fosforilación de las proteínas que forman los canales iónicos. ABI2 controlaría sólo una parte de las respuestas dependientes de ABI1 ya que la acumulación de varios mensajeros inducibles por ABA se ven inhibida en las mutantes *abi1* pero no en las *abi2*.

Se está aún lejos de dilucidar el mecanismo molecular completo de la intrincada red involucrada en la transducción de señales del ABA, pero algunos pasos están siendo descritos estudiando combinadamente aspectos fisiológicos, genéticos y moleculares.

3.2. Genes inducidos por ABA.

Son muchos los genes descritos que muestran inducción por ABA y en cambio es muy poco lo que se sabe sobre la función que cumplen las proteínas codificadas por dichos genes.

Uno de los grandes grupos de genes inducidos por ABA es el de los *lea* (late embryogenesis abundant gene), que fueron identificados como genes que se expresan durante la maduración y desecación de la semilla en algodón y en cebada (Baker et al., 1988; Bartels et al., 1988, Straub et al., 1994). Se observó también que se expresan en tejido vegetativo sometido a condiciones de estrés y se describieron en trigo (Marcotte et al., 1988), en arroz (genes *rab*, Mundy y Chua, 1988; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1990), *Craterostigma plantagineum* (Michel et al.,

1993) y en tomate (Imai et al., 1995). Los productos de los genes *lea*, son en su mayoría hidrofílicos, no poseen Cys ni Trp y se propone que están localizadas en el citoplasma (Dure et al., 1993b). Basándose en la secuencia de aminoácidos y su posible conformación, se cree que estas proteínas poseen funciones de secuestradoras de iones, protección de otras proteínas o membranas y actividad de chaperoninas. Para algunos casos, la estructura secundaria indicaría que poseen alta capacidad de retener moléculas de agua.

Algunas proteínas inducidas por ABA demostraron tener actividad de unión a ácidos nucleicos (Mundy y Chua, 1988; Iusem et al., 1993). Un caso particular de estos es el de la proteína de maíz ABAI (Gómez et al., 1988) la cual posee una secuencia consenso de unión a ARN (Bandziulis et al., 1989) y se une a cadenas de poli rU y poli rG. Esto indica que ciertos genes que responden a ABA codificarían proteínas capaces de regular a moléculas de ARN que participan en eventos del desarrollo o adaptación de las plantas.

Además de la protección celular para contrarrestar el déficit de agua, es importante la protección contra patógenos. Con respecto a este punto en particular, se han clonado diferentes genes que se inducen frente a condiciones de estrés. La osmotina fue el primer miembro descrito de una familia de proteínas que permeabilizan a las membranas plasmáticas de los hongos, funcionando como antifúngicas (Kononowicz et al., 1993). Las "nonspecific lipid transfer proteins" son también inducidas por sequía y bajas temperaturas e inhiben el crecimiento de las hifas (Plant et al., 1991; Terras et al., 1992). Recientemente, Chen et al. (1994) clonaron el cADN de una endoquitinasa de *Lycopersicon chilense* que demostró inducirse en condiciones de estrés hídrico, osmótico y en presencia de ABA.

En los últimos años, se ha publicado mucho sobre el clonado de nuevos genes inducidos por estrés y por ABA que se obtienen de genotecas diferenciales o de genotecas de diferentes tejidos rastreadas con ARN mensajeros diferenciales. Actualmente, una faceta álgida de la investigación consiste en el estudio de los

promotores de dichos genes mediante el estudio de la expresión de genes quiméricos entre dichos promotores y un gen indicador (generalmente de la β -glucuronidasa). De esta manera, se han descrito una serie de secuencias consenso en el ADN involucradas en la inducción por ABA, algunas de las cuales se detallan en la tabla a continuación.

Nombre del consenso	Secuencia	Cita
G-Box	XXXACGTXXX	Shen y Ho, 1995
CE-1	XXXCACCCXX	Shen y Ho, 1995
GT/GC motif	TTGGTTT/GGGG	Dolferus et al., 1994
ABRE (ABA-responsive element)(G-Box)	CCACGTGG	Pla et al., 1993

De lo discutido anteriormente, se desprende que existen dos grandes áreas de investigación de la expresión de genes en respuesta al déficit de agua y al ABA. La primera involucra el estudio de la función de las proteínas para las cuales codifican estos genes. Este aspecto conducirá a la comprensión de los mecanismos de la tolerancia al estrés hídrico y osmótico y aporta caracteres de importancia agronómica a la biotecnología. Por ejemplo, estudios estructurales de las proteínas LEA revelaron su actividad como osmoprotectores (Dure, 1993a). Por otro lado, es menos lo que se sabe de genes cuya función tiene que ver con cambios en el metabolismo (Dolferus et al., 1994; Chen et al., 1994) o en eventos de regulación (Ludevid et al., 1992; Gultinan et al., 1990). El estudio de plantas transgénicas antisentido o que sobreexpresen estos genes puede proveer información acerca de la función de las proteínas, además de permitir la producción de plantas con mayor tolerancia al déficit de agua. También estos genes podrían utilizarse como sondas en programas de mejoramiento asistido. La segunda área y la menos desarrollada es la interesada en dilucidar los mecanismos por los cuales la expresión de genes está controlada por el estrés y el ABA. La caracterización de la transducción temprana de la señal desencadenada por el ABA involucra el estudio de receptores (Hornberg

y Weiler, 1984), segundos mensajeros (Giraudat, 1995) y factores de transcripción (Guiltinan et al., 1990; Parcy et al., 1994).

4. ACERCA DE ASR1.

El punto de partida de este trabajo fue el clon de cADN *Asr1* (ABA, stress y ripening). *Asr1* fue aislado por Iusem et al. (1993) a partir de una genoteca de cADN de fruto de tomate la cual fue rastreada con clones de cADN diferenciales de hojas de tomate bajo estrés hídrico vs. hojas no estresadas. *Asr1* presenta un marco de lectura abierto de 116 codones con una G consenso en la posición 85 contigua al codón de iniciación de la traducción (Lütcke et al., 1987). La región 5' no codificante es de 81 nucleótidos y la 3' de 351 nucleótidos con una secuencia señal de poliadenilación en el nucleótido 744 y la correspondiente cola de poli (A). La proteína resultante es un polipéptido básico de 13 KD, el cual fue sobreproducido en *E. coli* para luego obtener anticuerpos. Estos anticuerpos detectaron la presencia de la proteína ASR1 en hojas de tomate sometidas a estrés hídrico y en pericarpio de fruto. Experimentos de fraccionamiento celular demostraron que ASR1 está localizada principalmente en el núcleo y demostró tener actividad de pegado al ADN.

Análisis posteriores más exhaustivos por "Northern" y "Western" (Amitai-Zeigerson et al., 1995) demostraron que la expresión de *Asr1* se induce en hoja y raíz luego de tratamientos de estrés salino (NaCl) y estrés osmótico (PEG), así como también en presencia de ABA (cuyos niveles aumentan en condiciones de estrés). Las concentraciones de la proteína ASR1 correlacionaron con el incremento en los niveles del ARN mensajero (entre las 12 y las 24 h posteriores al tratamiento), sugiriendo que este gen está regulado a nivel transcripcional y no traduccional o

post-traduccionalmente. Thompson y Corlett (1995) mostraron la correlación existente entre las concentraciones de ARN mensajero de *Asr1* y parámetros fisiológicos asociados al estrés hídrico, como son el contenido de agua gravitacional del suelo, potencial de agua de las hojas y conductancia estomatal.

Debido a que la respuesta de las plantas al estrés hídrico y salino involucra una cascada de eventos, las proteínas que intervienen pueden clasificarse en dos grupos. Por un lado, aquellas proteínas que participan en la transducción de señales y por otro, las que son productos finales de estos eventos moleculares. Las pertenecientes potencialmente al primer grupo son, por ejemplo, las ya mencionadas proteínas que se unen a ARN (Gómez et al., 1988; Ludevid et al., 1992), kinasas del tipo serina/treonina (Anderberg y Walker-Simmons, 1992), fosfatasas (Meyer et al., 1994) o proteínas que pegan GTP (Wu y Assmann, 1994). Como la proteína ASR1 está localizada en el núcleo, posee actividad de unión a ADN (posee una estructura secundaria del tipo "helix-loop-helix") y tiene un pico de expresión que declina a pesar de la permanencia del estrés (inducción transitoria) (Amitai-Zeigerson et al., 1995), se duda que esté involucrada directamente en la supervivencia de la planta en condiciones de estrés (proteínas que confieren osmoprotección, por ejemplo las LEA; Dure, 1993b), sino que más bien constituiría un paso en la cascada de eventos, resultando en la alteración de los patrones de expresión génica en respuesta al estrés. En resumen, la función de la proteína es aún desconocida, pero como ésta se encuentra también en hoja y raíz de plantas no estresadas y durante la maduración del fruto, donde los niveles del mensajero de *Asr1* aumentan considerablemente (Iusem et al., 1993), su actividad no debe estar restringida al estrés.

Actualmente se están llevando a cabo experimentos con plantas transgénicas que expresan el cADN de *Asr1* en orientación normal (Thompson y Iusem, comunicación personal) e invertida (Grierson, comunicación personal) que sumarán evidencias fenotípicas para dilucidar la función biológica de la proteína.

5. METODOS DE TRANSFORMACION VEGETAL.

5.1. Transformación por bombardeo de microproyectiles.

El método de transformación biolístico fue descrito inicialmente por Sanford et al. (1987). Este proceso consta de la introducción de sustancias, como ácidos nucleicos, en células o tejidos intactos por medio de microproyectiles a alta velocidad; de esta manera, las partículas atraviesan la pared celular, la membrana plasmática y eventualmente la membrana nuclear.

El equipo diseñado originalmente consta de una cámara conectada a un tubo de helio obstruida por una o más membranas de ruptura (Kapton 2000, de 50 μm de espesor), cada una de las cuales soporta 400 psi de presión. Cuando la presión de helio supera la resistencia de la/s membrana/s, éstas se rompen y el gas impulsa una membrana transportadora (que porta el ADN adsorbido en partículas de tungsteno) ubicada por debajo de las membranas de ruptura. La membrana transportadora se desplaza una distancia variable y es retenida por una malla metálica mientras que los microproyectiles se despegan, ingresan a la cámara con vacío donde están los explantos e impactan en los tejidos blanco. Con este equipo fue posible transformar cebolla, tabaco, maíz, arroz, trigo, soja, papaya, etc (Klein et al., 1988), a partir de diversos tejidos incluyendo embriones inmaduros, callos embriogénicos, suspensiones celulares, meristemas y microsporas.

El cañón génico se ha utilizado no sólo para la transformación de plantas sino también para células animales (Johnson et al., 1991) y bacterias (Smith et al., 1992).

Cuando se comienza a trabajar con un tejido determinado, es necesario poner a punto ciertos parámetros (en forma empírica) para optimizar el proceso. Alguno de los parámetros son: presión de helio (que se da por el número o grosor de las membranas de ruptura), distancia entre las membranas de ruptura y la transportadora, distancia entre la membrana transportadora y la malla de retención,

nivel de vacío de la cámara donde se encuentran los explantos y la distancia entre la malla de retención y el tejido blanco.

Esta técnica presenta la ventaja respecto de la transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* de poder utilizarse como método de transformación transitoria.

5.2. Transformación estable mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria del suelo capaz de infectar una amplia gama de dicotiledóneas al ponerse en contacto con una zona herida de la planta, produciendo una enfermedad que se conoce como agalla de corona (Zambryski, 1992). Este fitopatógeno está involucrado en una forma de parasitismo muy sofisticada a través de la introducción de parte de su información genética a la célula vegetal. En la naturaleza, la porción de ADN transferido por *Agrobacterium* contiene genes que están controlados por secuencias regulatorias que funcionan en plantas y que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de factores de crecimiento vegetales (oncogenes) y nutrientes bacterianos (genes de síntesis de opinas). El crecimiento neoplásico del tejido infectado crea un nicho ecológico para la agrobacteria. En *Agrobacterium*, el ADN que es transferido (T-ADN) está localizado en un megaplásmido (Ti) de aproximadamente 200 Kb, llamado "plásmido inductor de tumores". El T-ADN no codifica para ningún gen necesario para el proceso de transferencia. Los únicos elementos requeridos en cis durante este proceso son dos secuencias repetidas directas (imperfectas) de 25 pb, llamadas "bordes derecho e izquierdo", que delimitan la región del ADN del plásmido Ti a ser escindida. Por este motivo, es posible insertar cualquier secuencia de ADN en las células de las plantas siempre que estén flanqueadas por estos bordes. El resto del plásmido Ti codifica para funciones involucradas en la replicación, catabolismo de opinas, virulencia y conjugación. Los genes de virulencia están organizados en forma de operones.

El proceso de transferencia está dividido en dos grandes etapas, la primera dentro de la bacteria y la segunda dentro de la célula vegetal (Ream, 1989; Zupan y Zambryski, 1995). El proceso dentro de la bacteria incluye los eventos que llevan a la producción y a la exportación de un "vector" funcional conteniendo la información genética del T-ADN (el complejo T), siendo los componentes y mecanismos que involucra muy similares a los de la conjugación bacteriana (Lessl y Lanka, 1994). En la célula vegetal, el proceso incluye los eventos hasta el momento de la integración del ADN bacteriano en el genoma nuclear.

El tejido vegetal herido libera compuestos fenólicos (entre ellos acetosiringona) que inducen al receptor bacteriano *VirA*, que activa a *VirG*, que a su vez estimula la expresión de diferentes proteínas *Vir* involucradas en el proceso de transferencia. Las proteínas *VirD2* (endonucleasa) y *VirD1* (topoisomerasa) escinden la simple cadena de T-ADN del plásmido *Ti*. *VirD2* permanece unida covalentemente al extremo 5' protegiéndolo de la degradación exonucleolítica. Esta molécula es exportada a la célula vegetal a través de un canal de membrana probablemente formado por las proteínas del operón *VirB*. Por este canal, también se exporta *VirE2* que se une inespecíficamente a la simple cadena cubriéndola y evitando el ataque de nucleasas en la célula vegetal, formando el complejo T (T-ADN, *VirD2* y *VirE2*). *VirD2* y *VirE2* median, además, la entrada del T-ADN al núcleo, a través de los poros nucleares, donde finalmente se integra al genoma.

Cuando se descubrió que los genes contenidos en el T-ADN no eran necesarios para la transferencia de dichas secuencias al genoma de la planta (Zambryski et al., 1983), se construyó un plásmido *Ti* al cual se le delecionaron los genes responsables del fenotipo tumoral del T-ADN, reemplazándolos por secuencias del plásmido de *E. coli* pBR322. Por otro lado, se construyeron vectores con genes de interés, origen de replicación *colE1* y un marcador de selección en *E. coli* y se introdujeron por conjugación o métodos directos en *A. tumefaciens* conteniendo el *Ti* desarmado. Debido a que los replicones tipo *colE1* no se mantienen en *A. tumefaciens*, sólo las agrobacterias donde hubiese ocurrido integración por

recombinación homóloga serían capaces de sobrevivir en presencia del marcador de selección. A este último tipo de vectores Ti se los llamó cointegrados y contenían el gen de interés entre los bordes del T-ADN. Una vez que se observó que la región T no requería estar ligada físicamente a los genes *Vir* (Hoeckema et al.,1983) se desarrollaron los vectores binarios. En este caso, la agrobacteria porta un plásmido Ti al cual se le deleccionó por completo el T-ADN pero conserva los genes de virulencia que actúan en *trans* sobre otro plásmido (capaz de replicar en *E. coli* y en *A. tumefaciens*) que contiene el T-ADN con el gen de interés y marcadores de selección para plantas y bacterias.

6. OBJETIVOS GENERALES.

En este marco, la finalidad de este trabajo fue el clonado y caracterización del gen *Asr* de tomate correspondiente al cADN previamente clonado por Iusem et al. (1993) cuya expresión es inducida por ABA, estrés hídrico y maduración.

El objetivo de la primer etapa comprendió el aislamiento y la caracterización estructural del gen y la identificación de su localización cromosómica mediante técnicas de mapeo con marcadores moleculares, en particular RFLPs.

En la segunda etapa, el objetivo fue el estudio de la funcionalidad del promotor de *Asr* a través de la obtención de una construcción con un gen indicador que permitiera detectar su actividad *in vivo*. Para esto último, se utilizaron métodos de expresión transitoria y además se obtuvieron plantas transgénicas de distintas especies por diferentes métodos de transformación.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1. Genoteca.

Se utilizó una biblioteca genómica comercial de *Lycopersicon esculentum* var. Ailsa Craig de Clontech, construida en fago Lambda EMBL3. EMBL3 es un vector derivado de Lambda 1059 (Karn et al.,1980) por inserción de un sitio de clonado múltiple entre los brazos y las regiones prescindibles del genoma del fago (Frischauf et al.,1983). La capacidad de clonado de EMBL3 es entre 9 y 23 Kb. Los insertos están incorporados en los sitios Bam HI. En la Fig.1.1.1. se esquematiza el genoma de un fago recombinante. El título supuesto fue de 10^9 p.f.u./ml.

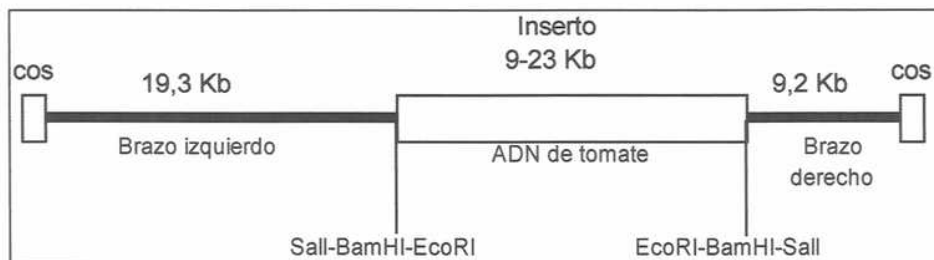


Fig.1.1.1: Genoma de un clon de fago EMBL3 recombinante. Se muestran los sitios múltiples de clonado, sitios cos y tamaños de los brazos.

1.2. Cepas bacterianas.

Las cepas de *Escherichia coli* usadas fueron: NM538 para la titulación y selección de clones positivos de la genoteca, LE392 para la purificación de ADN de fago lambda y DH5 α para todos los subclonados. Todos los cultivos se hicieron en medio LB (triptona 5 g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 10 g/l, según Sambrook et al., 1989) a 37°C con agitación a 250 rpm.

Para la transformación estable de tabaco y papa, se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 pAL4404 (Hoeckema et al., 1983) que porta resistencia cromosómica a rifampicina (100 µg/ml) y plasmídica a estreptomicina (100 µg/ml). Las agrobacterias se cultivaron en medio YEB (extracto de carne 5 g/l, extracto de levadura 1 g/l, peptona 5 g/l y sacarosa 5g/l) suplementado con MgSO₄ 1M 2 ml/l y los antibióticos que correspondan a 28°C con agitación a 250 rpm.

1.2. Plásmidos.

El plásmido portador del clon de cADN *Asr1* (Iusem et al., 1993) fue pN402 (3,78 Kb). Este plásmido está formado por pBluescript más el inserto de cADN de 780 pb. El inserto usado como sonda se liberó por restricción con BamH I o por PCR con los oligos universales T₃ y T₇.

El plásmido utilizado como vector para los subclonados y secuenciación fue pBluescript (3 Kb) (Stratagene), portador del gen β-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (100 µg/ml). Este vector contiene una porción del gen *lacZ* permitiendo α-complementación en cepas conteniendo *lacZ*ΔM15 en F' (como DH5α). Este sistema facilita la identificación de plásmidos recombinantes (colonias blancas) respecto del vector religado sin inserto (colonias azules) cuando se plaquea en presencia de IPTG y X-gal.

El promotor de *Asr2* fue clonado en el vector binario para *Agrobacterium tumefaciens* pBI101.2 (Clontech). Este vector de 12 Kb porta dos genes de resistencia a kanamicina (NPTII): uno para bacterias (bajo promotor procarionte) y otro para eucariontes (bajo promotor de la nopalina sintetasa). El sitio múltiple de clonado está 5' de la región codificante del gen indicador *uidA* (GUS) de la β-glucuronidasa (Jefferson et al., 1987). La resistencia a kanamicina para plantas y el gen GUS están flanqueados por los bordes derecho e izquierdo (RB y LB) constituyendo el T-ADN

(Fig.1.2.1.A). Los bordes son reconocidos por la maquinaria de transferencia del T-ADN, cuya información está codificada en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*.

Como control positivo en los ensayos de expresión transitoria se utilizó el plásmido PBI426 (Dalta et al., 1991). Este vector de 6,5 Kb porta el gen de una proteína de fusión NPTII-GUS bajo la actividad del promotor doble 35S y el enhancer traduccional AMV (Fig.1.2.1.B).

Como portador de un marcador de selección adicional para la transformación estable de papaya se usó el plásmido pGPTV-Bar (Becker et al., 1992), que contiene la región codificante del gen *bar* que confiere resistencia a fosfotricina (PPT) bajo el control del promotor de la nopalina sintetasa (Fig.1.2.1.C).

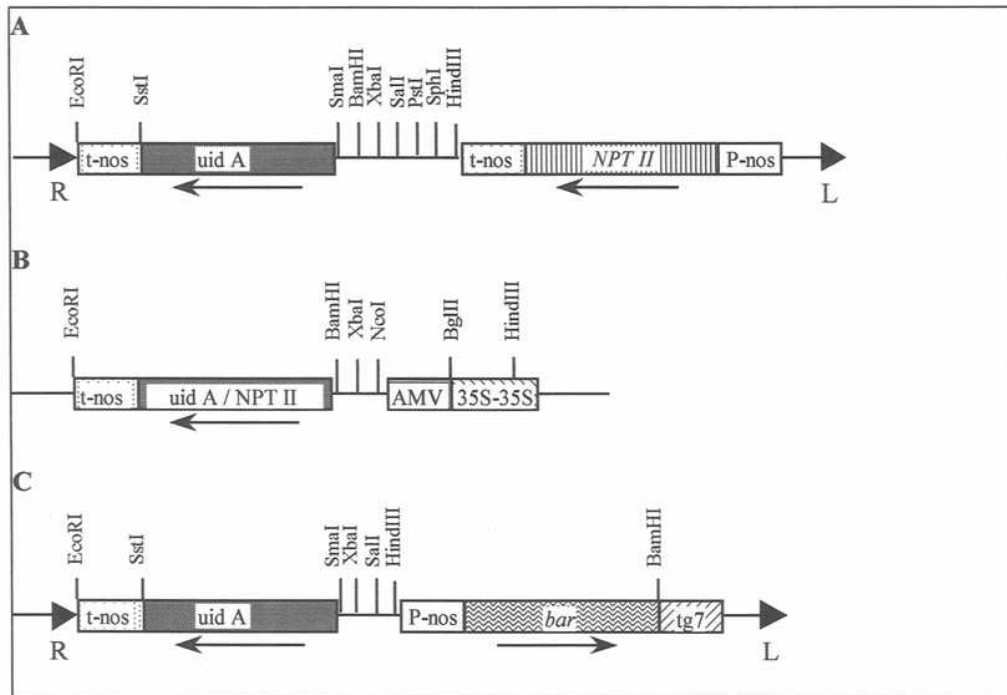


Fig.1.2.1: Mapas parciales de los plásmidos pBI101.2 (A), pBI426 (B) y pGPTV-Bar (C). Se señalan los sitios de corte únicos para enzimas de restricción. *uidA*: gen de la β -glucuronidasa. NPTII: gen de resistencia a kanamicina. P-nos: promotor de nopalina sintetasa. t-nos: terminador de la nopalina sintetasa. 35S-35S: doble promotor del virus del mosaico del coliflor. AMV: enhancer traduccional del virus del mosaico de la alfalfa. *bar*: gen de resistencia a fosfotricina. tg7: terminador del gen 7. R y L: bordes derecho e izquierdo del T-ADN.

1.3. Material vegetal.

Los frutos de tomate maduro utilizados para el aislamiento de RNA fueron de la variedad platense.

Para la discriminación de los genes *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* por análisis de PCR, se utilizó la línea pura *Lycopersicon esculentum* E6203 (*esc/esc*) y "Near Isogenic Lines" (NILs) derivadas del cruzamiento *L. esculentum* E6203 X *L. hirsutum* LA1777. Estas NILs contienen una introgresión de *L. hirsutum* en el cromosoma 4 sobre un fondo genético *L. esculentum*/*L. esculentum*. Dicha introgresión se encuentra en estado homocigota (*hirs/hirs*) o en estado heterocigota (*esc/hirs*). Las NILs se construyeron por selección asistida con marcadores moleculares a partir de lotes de semillas BC₃F₂ (tercer ciclo de retrocruza a partir de una F₂) y fueron completamente caracterizadas genotípicamente por medio de RFLPs (Bernacchi, 1996).

Los clones *Asr* fueron mapeados usando una población F₂ de mapeo derivada del cruzamiento interespecífico *Lycopersicon esculentum* cv VF36-Tm2a X *Lycopersicon pennelli* LA716 para la cual ya existía un mapa de RFLPs de alta resolución construido. Este mapa fue desarrollado usando sondas al azar que hibridan con loci de bajo número de copias obtenidas a partir de bibliotecas genómicas y de cADN de tomate y papa (Tanksley et al, 1992).

Las hojas y callos embriogénicos de papaya usados para los ensayos de expresión transitoria y para la obtención de plantas transgénicas fueron obtenidos a partir de *Carica papaya* variedad Maradol. Los callos embriogénicos se obtuvieron según Cabrera-Ponce et al., 1995.

Las plantas de tabaco y papa utilizadas para la transformación fueron *Nicotiana tabacum* variedad Xanthi y *Solanum tuberosum* variedad Huinkul respectivamente.

El material vegetal se cultivó en cámaras de cría bajo fotoperíodo de 16 hs luz- 8 hs oscuridad a 18-22°C.

2. PROTOCOLOS CLASICOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

Las técnicas tales como titulación y selección de clones positivos de la genoteca por hibridación en playas de lisis; maxipreparación de ADN de fago; digestión con enzimas de restricción; tratamientos con Ligasa, Klenow, Exonucleasa III, Nucleasa S1 y Polinucleótido quinasa; obtención de *E.coli* competentes; transformación de *E.coli*; minipreparaciones y maxipreparaciones de plásmido; purificación de plásmido por gradiente de CICs; electroforesis en geles de agarosa nativos (ADN) y desnaturalizantes (ARN); "Southern blot" y "Northern blot" se realizaron según describe Sambrook et al., 1989.

Los fragmentos de restricción y los vectores a clonar se purificaron por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión (Sambrook et al., 1989) o por GeneClean (Bio101, USA).

Los productos de PCR que posteriormente se utilizaron para clonar y los que se usaron como sonda se purificaron por columnas Wizard Minipreps de Promega.

La marcación de sondas con $\alpha^{35}\text{P}$ -dCTP por "Random priming" y la secuenciación por el método de Sanger et al., 1977 se realizaron con "kits" de Promega según especificaciones del fabricante.

3. OLIGONUCLEOTIDOS.

Los oligonucleótidos empleados fueron provistos por la compañía Midland y Universal DNA y previamente diseñados usando el programa Oligo 4,0 (para Macintosh), que permitió también el cálculo de la correspondiente temperatura de hibridación con el molde.

Para la secuenciación del plásmido pNM504 y sus derivados con deleciones, se utilizaron los iniciadores universales T₃ y T₇ (comerciales) que hibridan a ambos lados del sitio múltiple de clonado de pBluescript.

T₃: 5' ATTAACCCTGACTAAAG 3'.

T₇: 5' AATACGACTCACTATAG 3'.

En la secuenciación de pNM531 y sus derivados, además de T₃ y T₇ se utilizaron dos oligonucleótidos (NM1 y NM2) diseñados sobre la secuencia de pNM534:

NM1 (orientación directa): 5' GACACGTTGAGGAATTTCA 3'.

NM2 (orientación inversa): 5' CATGTCAAAAATATTAGCCAGCG 3'.

Para la reacción de "Primer Extension" se diseñó un oligonucleótido (NM10) comprendido entre las bases 113 y 132 del clon genómico a 50 bases 3' del codón ATG (inicio de traducción) con orientación inversa al ARN mensajero.

NM10: 5' CTGGTCCACCCTCATCCTCC 3'.

Para amplificar por PCR las secuencias genómicas correspondientes a cada uno de los tres clones *Asr*, se diseñaron los siguientes tres pares de oligonucleótidos específicos cuyos productos de amplificación fuesen de diferente tamaño para facilitar su identificación:

Asr1-directo: 5' GATAGATTATTGTTTCAGATGGAG 3'.

Asr1-inverso: 5' GACACAACACTTATAACCAATATGG 3'.

Asr2-directo: 5' TTAAGAGAAGCAATACAATATGGCT 3'.

Asr2-inverso: 5' CGGGCTCAAAGTATTACATAGTGAG 3'.

Asr3-directo: 5' GTTTGGTCGAATTTCTCGTCCTTC 3'.

Asr3-inverso: 5' CTATTCCAATTCCAATTTATGTGAC 3'.

Los fragmentos amplificados para cada clon estuvieron contenidos entre los siguientes nucleótidos: 63 y 480 del clon de cADN *Asr1* (Iusem et al., 1993), 41 y 678

del clon genómico *Asr2* (Fig.3.1.1 de resultados) y 703 y 1183 del clon genómico *Asr3* (inédito, número de acceso al GenBank X74908, 1993).

Para obtener la sonda *Asr2* 3' para el mapeo por RFLP, se diseñaron dos oligonucleótidos (N5 y N6) capaces de amplificar el fragmento entre los nucleótidos 80 y 468 del clon genómico *Asr2*.

N5 (orientación directa): 5' ACACCATCACCAATTGTTTTCC 3'.

N6 (orientación inversa): 5' CTTCTTGGCATCTTTTTCTG 3'.

Con el objetivo de clonar el promotor de *Asr2* en el vector pBI101.2, se diseñaron dos oligonucleótidos (NM8 y NM9) para amplificar por PCR el fragmento genómico comprendido entre los nucleótidos -1180 al 59.

NM8 (orientación directa): 5' CTCGAGATCCTGCTTACTCA 3'.

NM9 (orientación inversa): 5' ATTGTATTGCTTCTCTTAAATTAATGTC 3'.

Para el chequeo por PCR de las plantas de tabaco y papa transformadas, se sintetizaron dos oligos cuyo producto de amplificación fue un fragmento de 1010 pb: TRA1 que fue diseñado sobre la secuencia del promotor de *Asr2* y TRA2, sobre la región codificante del gen *uidA* (*GUS*) a 540 pb del ATG.

TRA1 (orientación directa): 5' CTGATGTTGGTCCTAATCGCCAC 3'.

TRA2 (orientación inversa): 5' TCGTCCACCCAGGTGTC 3'.

4. SECUENCIACION Y ANALISIS DE LA SECUENCIA.

La secuenciación de los clones pNM504, 12A, 13B, 14D, 13A, 14B, 15C, pNM531, pNM532, pNM533 y pNM534 se realizó por el método de Sanger et al., 1977. Las reacciones se llevaron a cabo usando el "kit" de Promega TaqTrack con los

oligonucleótidos anteriormente descritos en el punto 3., se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 6 %, fijaron y expusieron según Sambrook et al., 1989. En la Fig.4.1 se muestra, a manera de ejemplo, una autorradiografía de la secuencia de los clones pNM534 y pNM533.

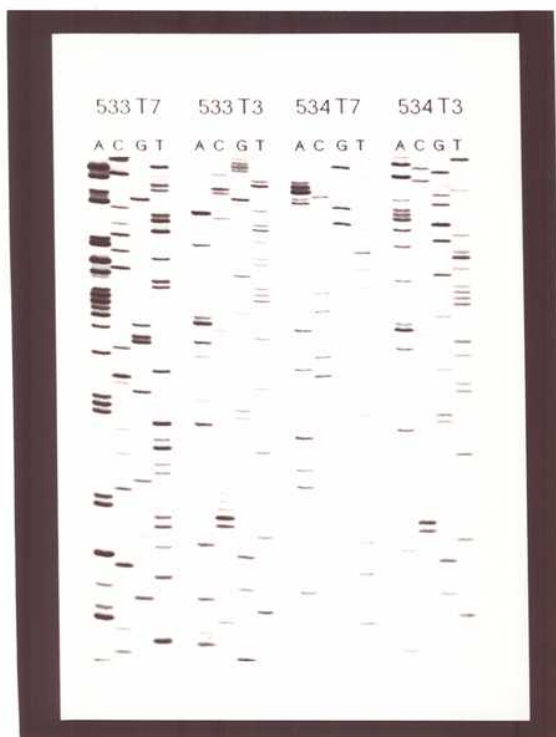


Fig.4.1: Autorradiografía del gel de secuencia de los clones pNM533 y pNM534 a partir de los oligonucleótidos T3 y T7.

La secuencia del clon genómico *Asr2* se comparó con la base de datos GenBank usando el programa GCG (para UNIX en una terminal Vax) y se analizaron las homologías con el programa Lasergene navigator (para Macintosh). Los porcentajes de similitud se calcularon con matriz de identidad y parámetros por defecto del programa.

5. ANALISIS DEL ARN MENSAJERO DE ASR2.

5.1. Aislamiento de ARN de fruto.

Para el "Northern blot" y la reacción de "Primer Extension", se obtuvo ARN de fruto de tomate maduro a partir del siguiente protocolo (López-Gómez et al., 1992):

Se pulverizaron 10 mg de mesocarpio del fruto con nitrógeno líquido. Se agregaron 3 ml/gr de tejido de buffer de extracción (2 % SDS, 1 % β -mercaptoetanol, 50 mM EDTA y 150 mM Tris-base pH 7,5) y se homogeneizó. Al homogenato se le adicionó 0,25 volúmenes de etanol 100 % y 0,11 volúmenes de AcK 5M y se mezcló por inversión. Se extrajo con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Se centrifugó a 20.000 g durante 10 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa que se extrajo con 1 volumen de fenol-cloroformo. Se centrifugó 10 minutos a 20.000 g a 4°C y a la fase acuosa se le realizó una nueva extracción con cloroformo-alcohol isoamílico. Se centrifugó 10 minutos a 20.000 g a 4°C. El ARN se precipitó con 3 M de LiCl durante una noche a -20°C. Se recuperó centrifugando durante 1,5 hs a 20.000 g a 4°C y se resuspendió en aproximadamente 200 μ l. La cuantificación se realizó espectrofotométricamente y se corroboró la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % en buffer TAE.

5.2. "Primer extension"

Para localizar el sitio de iniciación de la transcripción se reprodujo el siguiente protocolo (Goldman et al., 1992):

Se mezclaron 100 ng de oligonucleótido fosforilado con polinucleótido quinasa y γ -(³²P)-ATP con 50 μ g de ARN total. Se precipitó con 0,1 volúmenes de NaAc 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 100 % 10 minutos a -70°C. Se centrifugó 15 minutos a 12.000

rpm a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado sobre papel absorbente. Se resuspendió en 20 μ l de buffer de hibridación 5 X (2 M NaCl, 50 Mm PIPES pH6,4, 5 mM EDTA) más 80 μ l de formamida deionizada. La mezcla se desnaturalizó 15 minutos a 80°C. Se incubó durante toda una noche a 55°C (temperatura de hibridación del oligonucleótido). Se precipitó con 0,1 volúmenes de NaAc 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 100 % 10 minutos a -70°C.- Se centrifugó 15 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente y se lavó con etanol 70 % (v/v). El precipitado se secó y se resuspendió en 26,5 μ l de H₂O-DEPC. Se agregó: 1 μ l de dNTPs 10 mM, 2 μ l de Tris-HCl 1M pH8,2, 4 μ l de DTT 100 mM, 2 μ l MgCl 120 mM, 1 μ l Actinomicina D 1 mg/ml, 2 μ l de ARNsin y 1,5 μ l de Transcriptasa reversa (Mu-MLV, 200 U/ μ l) y se incubó 90 minutos a 45°C. Se agregó 1 μ l de ARNasa pancreática 10 mg/ml y se incubó 1,5 hs a 37°C. Se agregaron 60 μ l de H₂O-DEPC y se extrajo con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y posteriormente con 1 volumen de cloroformo. Se precipitó la fase acuosa con 0,1 volúmenes de NaAC 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 100 %, 30 minutos a -70°C. El precipitado se lavó con etanol 70 % (v/v), se secó y se resuspendió en buffer de siembra de secuencia (con formamida). Se analizó en gel de poliacrilamida 6 %.

6. EXTRACION DE ADN GENOMICO DE PLANTAS PARA PCR.

El protocolo utilizado para aislar ADN de plantas es una modificación del descrito por Dellaporta et al., 1983. Este protocolo se usó para la discriminación de los clones *Asr* y para el chequeo de las plantas transgénicas de tabaco y papa.

Se machacaron con un vástago de punta cónica 3 o 4 hojas con 700 μ l de buffer de extracción (Tris-HCl pH8 50 mM, EDTA pH8 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 10 % y β -mercaptoetanol 10 mM) y se incubó 10 minutos a 65°C. Se agregaron 200 μ l de

AcK 5 M y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó durante 20 minutos a 13.000 rpm a 4°C, al sobrenadante se le agregó 1 volumen de isopropanol y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 2 minutos en microcentrífuga de mesa. El precipitado se resuspendió en 200 µl de agua deionizada y se extrajo con fenol-cloroformo. Se reprecipitó con 20 µl de AcNa 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 100 %, se centrifugó 15 minutos a 13.000 rpm a 4°C y se lavó con etanol 70 %. Finalmente se resuspendió en TE y se cuantificó en fluorómetro. La integridad se verificó en gel de agarosa 0,8 %.

7. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Las reacciones se llevaron a cabo en 25 o 50 µl con 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,1 µg/50 µl de reacción de cada oligonucleótido, 2U de Taq polimerasa/50 µl de reacción, 1X de buffer para Taq polimerasa y 50-100 ng. de ADN molde (50 ng para amplificar plásmidos y 100 ng para amplificar ADN genómico). Se utilizó un termociclador con el siguiente programa:

- 94°C durante 3 minutos.
- 30 ciclos de: 94°C 1 minuto, X°C (temperatura de hibridación del oligonucleótido) 1 minuto y 72°C 1 minuto.
- 72°C durante 10 minutos.

Posteriormente los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % teñido con Bromuro de Etidio.

8. EXTRACCION DE ADN GENOMICO DE PLANTAS PARA "SOUTHERN BLOT".

El protocolo utilizado para el chequeo de las plantas transgénicas fue el descrito por Hoisington, 1992.

200-400 mg de tejido liofilizado se molieron con nitrógeno líquido. Se agregaron 9 ml de buffer de extracción (Tris-HCl pH7,5 100 mM, NaCl 700 mM, EDTA 10 mM, β -mercaptoetanol 1 % y CTAB 1 %) y se incubó 1 h a 65°C con agitación suave. Se agregó 1/2 volumen de cloroformo-octanol (24:1), se mezcló por 5 minutos y se centrifugó 10 minutos a 2.500 rpm a temperatura ambiente. A la fase acuosa se le realizó otra extracción con cloroformo/octanol y se trató con RNAsa A durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol y se removió el precipitado con un gancho de vidrio. El ADN se lavó con solución de lavado 1 (etanol 76 % y NaOAc 0,2 M) por 20 minutos y posteriormente se enjuagó en solución de lavado 2 (etanol 76 % y NH₄OAc 10 mM). Finalmente el ADN se resuspendió en TE. Se cuantificó espectrofotométricamente y se chequeó la integridad con gel de agarosa 0,8 %.

9. ANALISIS DE LIGAMIENTO POR RFLP.

Para el mapeo de los clones *Asr1*, *Asr2* y *Asr3*, los métodos empleados para la extracción de ADN, preparación de las sondas y los "Southern blots" fueron los descritos por Tanksley et al., 1992.

Las sondas utilizadas fueron: *Asr1*: el cADN completo (obtenido por PCR con los oligos T₃ y T₇); *Asr2* 5': el fragmento comprendido entre los nucleótidos 1 y 1239 amplificado con NM8 y NM9, conteniendo el promotor y la región 5' no codificante;

Asr2 3': el fragmento comprendido entre los nucleótidos 1260 y 1648 obtenido por PCR con los oligos N5 y N6, conteniendo casi toda la región codificante más el intrón y Asr3: el fragmento entre los nucleótidos 703 y 1183 amplificado con los oligos Asr3-directo e inverso conteniendo parte de la región 5' no codificante, el primer exón y el intrón. Las enzimas utilizadas fueron EcoR I para Asr1, Asr2 3' y Asr3 y Hind III para Asr2 5', ya que fueron las que evidenciaron polimorfismo entre los padres *L. esculentum* y *L. pennelli*.

La población F₂ de 49 individuos fue caracterizada genotípicamente con las cuatro sondas descritas. Los datos de segregación fueron analizados con el programa MAPMAKER (Lander et al., 1987) y comparados con el mapa de tomate (Tanksley et al., 1992). Para determinar el ligamiento entre los clones *Asr* y los marcadores de RFLP previamente mapeados, se utilizó un umbral de LOD \geq 3. Las unidades del mapa (cM) fueron calculadas usando la función Kosambi.

10. BOMBARDEO CON MICROPROYECTILES.

10.1. Condiciones de bombardeo.

Se utilizó un cañón de microproyectiles de alta presión de helio de la compañía Pioneer (Sanford et al., 1987).

Tanto para los ensayos de expresión transitoria sobre callos embriogénicos y hojas como para la transformación estable de papaya, el bombardeo de microproyectiles se realizó de acuerdo al protocolo de Cabrera-Ponce et al., 1995.

El ADN plasmídico purificado por gradiente de CICs se precipitó junto con las micropartículas de tungsteno M10 (0,73 μ m) como describe Klein et al., 1988. Previo al bombardeo, los microproyectiles cubiertos con ADN se resuspendieron en 250 μ l

de etanol 100 %. Alícuotas de 10 μ l (1,66 μ g de ADN asociados a 125 μ g de tungsteno) se depositaron sobre cada membrana transportadora (disco de Kapton), y se dejó secar al aire para remover el etanol. La distancia entre la membrana de ruptura y la membrana transportadora fue de 1,2 cm y esta última se desplazó durante el disparo 1,2 cm hasta la malla de acero de retención. La placa de Petri con el tejido blanco se ubicó a 7 cm del lugar del disparo. El bombardeo se llevó a cabo a una presión de 800 psi de helio (dos membranas de ruptura) con la cámara a un vacío de una atmósfera.

10.2. Ensayos de expresión transitoria.

Cinco cajas de Petri cada una conteniendo 50 mg de peso fresco de callos embriogénicos en fase globular y cinco cajas conteniendo 20 explantos de hojas de plantas de papaya crecidas *in vitro* fueron cultivadas en medio A10 (sales y vitaminas del medio Murashige and Skoog, 1962, 0,4 mg/l de glutamina, 2,4-D 10 mg/l, sacarosa 6 %, agar 8 g/l y pH5,8) y G (sales y vitaminas de MS suplementado con BAP 0,2 mg/l, kinetina 0,1 mg/l, sacarosa 3 %, gelrite 2,5 mg/l y pH5,7) respectivamente tres días antes del bombardeo. Los medios se suplementaron o no con ABA 0,5 mg/l. Los callos embriogénicos se bombardearon con el plásmido pNM600 (promotor *Asr2*-GUS) y las hojas con pNM600 y pBI426 (doble 35S-GUS) como control positivo. Al tercer día después del bombardeo se midió la actividad de GUS por el método histoquímico.

10.3. Transformación estable de papaya por bombardeo de microproyectiles.

La transformación de papaya con cañón génico se realizó según el protocolo de Cabrera-Ponce et al., 1995.

Callos embriogénicos de papaya (50 mg) fueron bombardeados con una mezcla equimolar de los plásmidos pNM600 y pGPTV-Bar en medio de propagación A10 (sales y vitaminas del medio MS, 0,4 mg/l de glutamina, 2,4-D 10 mg/l, sacarosa 6%, agar 8 g/l y pH5,8). Después de la transformación, los explantos se pasaron a medio A10 fresco y se incubó durante 2 semanas. Posteriormente se repicaron a medio A10 suplementado con kanamicina 100 mg/l y PPT 4 mg/l y se incubó durante 4 semanas en oscuridad. Para una mejor selección de las células transformadas, se realizaron repiques a medio fresco semanalmente hasta que las células control dejaron de crecer y los callos embriogénicos resistentes se hicieron visibles. Luego, se subcultivaron los explantos a medio de diferenciación G (sales y vitaminas de MS suplementado con BAP 0,2 mg/l, kinetina 0,1 mg/l, sacarosa 3 %, gelrite 2,5 mg/l y pH5,7) con kanamicina 100 mg/l y PPT 4 mg/l. Después de 2 o 3 meses, los embriones somáticos transgénicos (Fig.10.3.1) se separaron del explanto original y se cultivaron en medio G con agentes selectivos para permitir su desarrollo. Las plantas finalmente se mantuvieron por micropropagación.



Fig.10.3.1: Embrión somático de papaya. Embrión que desarrolló en presencia de kanamicina y PPT al que se le realizó el ensayo de detección de actividad de GUS por el método histoquímico.

11. TRANSFORMACION VEGETAL VIA AGROBACTERIUM TUMEFACIENS.

11.1. Transformación de las agrobacterias.

El protocolo fue el descrito por Hofgen et al., 1988.

Para la obtención de bacterias competentes, se partió de 5 ml de cultivo líquido saturado de la cepa LBA4404 pAL4404 crecido a 28°C en medio LB con rifampicina 100 mg/l y estreptomicina 100 mg/l en agitación. Se inocularon 2 ml del cultivo saturado a 200 ml de LB sin antibióticos y se incubó a 28°C con agitación hasta una D.O. de 0,5 a 550 nm. Se centrifugó el cultivo 5 minutos a 6.000 rpm a 4°C y se lavó una vez con agua estéril. Finalmente se resuspendió en 1 ml de glicerol 10 % y se guardó en alícuotas a -80°C.

Para la transformación, a 50 µl de bacterias se le agregaron 5 µg del plásmido pNM600 (promotor *Asr2*-GUS) y 50 µl de LB. Se congeló en nitrógeno líquido durante 5 minutos y luego se mantuvo a temperatura ambiente 25 minutos. Este procedimiento se repitió tres veces. Luego se agregaron 15 ml de LB y se permitió la recuperación de las bacterias durante una noche a 28°C sin agitación. Se centrifugaron a 6.000 rpm 5 minutos y se resuspendieron en 200 µl de LB. Finalmente se plaqueó en LB con rifampicina 100 mg/l, estreptomicina 100 mg/l y kanamicina 100 mg/l. Se incubó durante tres días. Una vez que se visualizaron colonias, se chequearon realizando mini preparaciones de plásmido.

11.2. Transformación de tabaco con *A. tumefaciens*.

Se diseccionaron explantos de 5 mm X 5mm de hoja de tabaco de plantas crecidas *in vitro*. Se colocaron aproximadamente 15 explantos con el envés hacia arriba en una placa de Petri conteniendo 10 ml de medio MS líquido suplementado

con sacarosa 20 g/l. Se adicionó la cantidad necesaria de cultivo de agrobacterias (saturado) para llegar a una concentración de 1×10^8 bacterias/ml y se incubó durante 10 minutos. Los explantos se subcultivaron en medio de regeneración (medio MSS, AIA 0,35 $\mu\text{g/ml}$ y 0,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 hs. Posteriormente se cultivaron por aproximadamente 3 meses en medio de regeneración suplementado con kanamicina 100 $\mu\text{g/ml}$ y cefotaxime $\mu\text{g/ml}$ (con pasajes semanales a medio fresco) hasta que se diferenciaron brotes. Finalmente los brotes se crecieron en medio de micropropagación (medio MSS: sales MS, sacarosa 20 g/l, agar 7 g/l y pH5,6) suplementado con cefotaxime y kanamicina. Las plantas se mantuvieron por micropropagación periódica.

11.3. Transformación de discos de hoja de papa con *A. tumefaciens*.

El procedimiento utilizado fue básicamente el descrito por del Vas et al., 1993.

Las hojas a transformar se obtuvieron de plantas de 4 semanas de edad. Se hirieron las hojas haciendo un corte perpendicular al pecíolo con un bisturí. Se colocaron aproximadamente 15 explantos con el envés hacia arriba en una placa de Petri conteniendo 10 ml de medio MS líquido suplementado con glucosa 1 %. Los explantos se cocultivaron con 30 μl de un cultivo de *A. tumefaciens* en fase logarítmica tardía. Se incubó a 22°C en oscuridad durante 48 hs. Los explantos se colocaron en tubos con medio de regeneración (sales y vitaminas de MS, glucosa 10 g/l, zeatina 2 $\mu\text{g/ml}$, cefotaxime 300 $\mu\text{g/ml}$, kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, agar 6 g/l y pH5,7). Se subcultivaron a medio fresco semanalmente, reduciendo a la mitad la concentración de cefotaxime al cabo de 1 mes. Luego de aproximadamente 3 meses, se separaron los brotes diferenciados (de más de 0,5 cm de altura) y se transfirieron individualmente a medio de micropropagación (MSS) suplementado con cefotaxime y kanamicina. Las plantas se mantuvieron por micropropagación periódica.

12. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE β -GLUCURONIDASA.

Para la medición de la actividad de β -glucuronidasa, los explantos fueron incubados en medio MSS con o sin ABA durante diferentes tiempos según se indica.

En el ensayo de expresión transitoria y en el análisis de las plantas transgénicas de papaya, se detectó actividad de la enzima por el método histoquímico (Mc Cabe et al., 1988). Este método se basa en la conversión enzimática por la β -glucuronidasa del 5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-glucurónido (X-GLU) a 5-Br-4-Cl-3-indólico, que es de color azul. Los explantos se sumergieron en reactivo X-GLU (para 200 ml de solución: Na_2PO_4 pH7 100 mM, EDTA pH8 10 mM, ferrocianato de potasio 0,05 mM, Triton X-100 0,1 % y 100 mg de X-GLU disuelto en 2 ml de DMSO) durante 18 hs a 37°C. Los explantos de hoja posteriormente se destiñeron con etanol 70 %. La observación y cuantificación de los puntos azules se realizó bajo lupa.

La medición de la actividad de GUS en las plantas transgénicas se hizo por el método fluorométrico (Jefferson et al., 1987). La β -glucuronidasa convierte el 4-Metil umbeliferil β -D-glucurónido (MUG) en 4-Metil umbeliferona (MU), que es un producto fluorescente. Trozos de hojas se homogeneizaron con vástagos de punta cónica en 500 μl de buffer de extracción de proteínas (Na_2PO_4 pH7 50 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, Na_2EDTA pH8 10 mM, sarcosil 0,1 % y Triton X-100 0,1 %). Se centrifugó 20 minutos a 12.000 rpm a 4°C y se guardó el sobrenadante a -70°C. A 50 μl de extracto proteico se le adicionaron 500 μl de buffer de ensayo (buffer de extracción con MUG 1 mM) y se incubó a 37°C. Luego de 10 minutos, se tomó una alícuota de 100 μl para considerar como blanco de reacción por lisis espontánea del MUG y se detuvo adicionándole 2,4 ml de Na_2CO_3 0,2 M. A los 60 y 120 minutos de incubación se retiraron alícuotas para seguir el desarrollo de la reacción que fueron detenidas también con Na_2CO_3 . Se midieron los niveles de fluorescencia en cada muestra con un fluorómetro (absorción: 365 nm y emisión: 455 nm) y se convirtieron los valores de fluorescencia a concentraciones nM de MU a partir de una curva estándar (MU en

Na₂CO₃) construida con concentraciones conocidas. Por otro lado, se midió la concentración de proteínas de cada extracto por el método de Bradford, 1976. El criterio para considerar que una planta expresaba β-glucuronidasa fue que la pendiente (± su error) de la recta de actividad por mg de proteína vs tiempo fuera significativamente superior a la del control sin transformar. La actividad para cada planta se expresó finalmente en pmoles de 4-MU por mg de proteínas por minuto.

RESULTADOS

1. ANALISIS DE LA BIBLIOTECA GENOMICA: CLONADO DEL GEN ASR.

1.1. Titulación de la biblioteca genómica de EMBL3.

Se tituló la genoteca comercial de tomate (Clontech) para poder calcular el número de clones de fago EMBL3 recombinantes por ml. Teniendo como referencia el título supuesto de 10^9 p.f.u./ ml, se infectaron células *E.coli* de la cepa NM538 con 10 μ l de una dilución 10^{-3} de la biblioteca genómica (ver Materiales y Métodos). Se obtuvieron 760 placas de lisis con lo cual se corrigió el título a $7,6 \cdot 10^7$ p.f.u./ ml.

1.2. Selección de clones positivos.

Considerando que el tamaño del genoma haploide de tomate está en el orden de las 10^9 pb y que cada clon de fago lleva en promedio 10^4 pb de ADN foráneo, se decidió chequear 300.000 clones de fago, que representarían 3 veces el genoma de tomate. Se aplicó la técnica de hibridación en playas de lisis (ver Materiales y Métodos) y se usó como sonda el cDNA completo del gen *Asr1* liberado del plásmido pN402 con BamH I. Del primer chequeo se detectaron cuatro clones positivos denominados 2,4,91 y 92; a partir de los fagos recuperados de estas cuatro playas de lisis, se realizó un segundo chequeo del que se seleccionaron dos clones que se llamaron 911 y 912 (Fig.1.2.1). El chequeo de estos dos clones dio todas playas de lisis positivas, con lo cual se seleccionó el clon 911 para continuar con el clonado de *Asr*, ya que fue el clon que dio la señal de mayor intensidad de hibridación en el segundo chequeo.

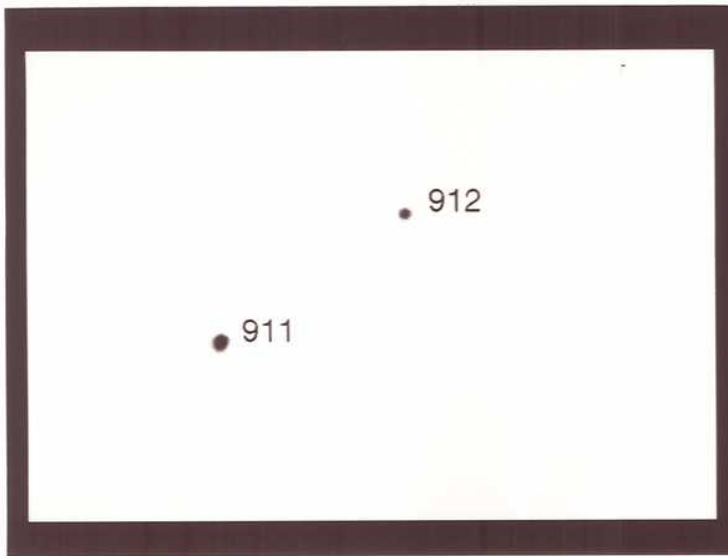


Fig.1.2.1: Autorradiografía del segundo chequeo revelando los clones 911 y 912.

2. SUBCLONADOS Y SECUENCIACION DEL GEN ASR.

2.1. Mapa de restricción del clon 911.

Seleccionado el clon 911, se preparó ADN de dicho clon utilizando la cepa de *E. coli* LE392 y con el objetivo de discriminar la región del genoma del fago homóloga a la sonda *Asr1*, se construyó un mapa de restricción. Para eso, se digirió ADN del fago con las siguientes combinaciones de enzimas de restricción: *Sal I*, *Hind III*, *Eco RI*, *Xho I*, *Sal I-Hind III*, *Sal I-Eco RI*, *Sal I-Xho I*, *Hind III-Eco RI*, *Hind III-Xho I* y *Eco RI-Xho I*. El análisis de las restricciones (Fig.2.1.1.A) y del posterior "Southern blot" con la sonda *Asr1* completa (Fig.2.1.1.B) permitió armar el mapa del clon 911, sobre el cual se diseñaron los subclonados posteriores (Fig.2.1.2).

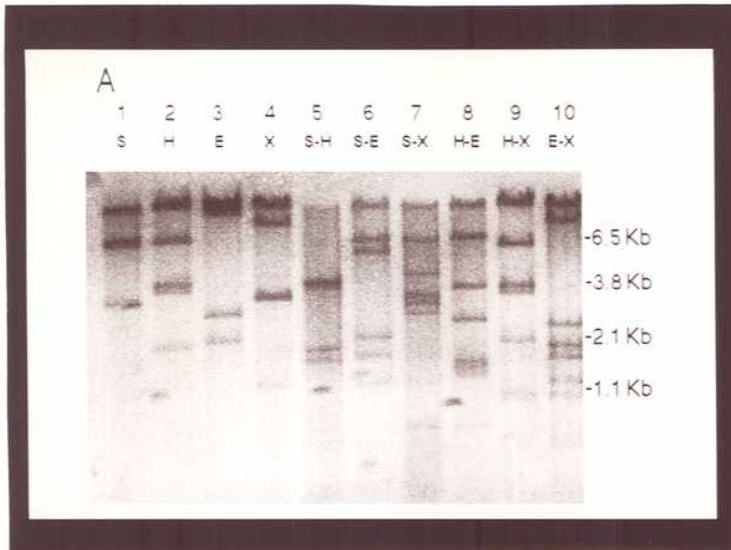


Fig.2.1.1: Resultados de la digestión enzimática del clon 911 para la confección del mapa de restricción. **A.** Gel de agarosa 0,6% teñido con BrEt. Se digirió 1 µg de ADN de fago por calle con las siguientes enzimas: 1: Sal I, 2: Hind III, 3: Eco RI, 4: Xho I, 5: Sal I-Hind III, 6: Sal I-Eco RI, 7: Sal I-Xho I, 8: Hind III-Eco RI, 9: Hind III-Xho I y 10: Eco RI-Xho I. **B.** Autorradiografía del "Southern blot" del gel A. La sonda utilizada fue el cADN Asr1 completo.

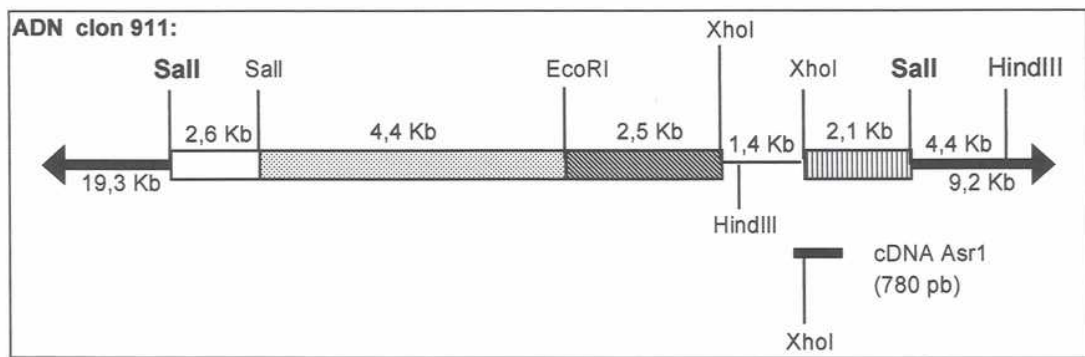


Fig.2.1.2: Mapa de restricción del clon de fago 911. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción tenidos en cuenta en el diseño de los subclonados posteriores y la zona que comparte homología con el clon de cADN Asr 1. Los sitios Sal I del sitio múltiple de clonado del fago se señalan en negrita.

2.2. Subclonados y generación de clones con insertos más pequeños mediante deleciones.

Se subclonó en el plásmido de *E. coli* Bluescript SK el fragmento Xho I-Hind III de 6.5 Kb. que demostró ser homólogo a *Asr1* (Fig.2.1.2). Para ello, se digirió ADN del clon 911 y del plásmido Bluescript con las enzimas Xho I y Hind III, se purificaron tanto el plásmido como la banda deseada mediante agarosa de bajo punto de fusión y se trataron con Ligasa (ver Materiales y Métodos). A partir de las colonias resultantes de la transformación con el producto de ligación se realizaron minipreparaciones de plásmidos y se analizaron por digestión con las enzimas Xho I-Hind III. Al nuevo plásmido se lo llamó pNM501 (9,5 Kb) y la existencia del inserto esperado se corroboró por "Southern blot" (Fig.2.2.1).

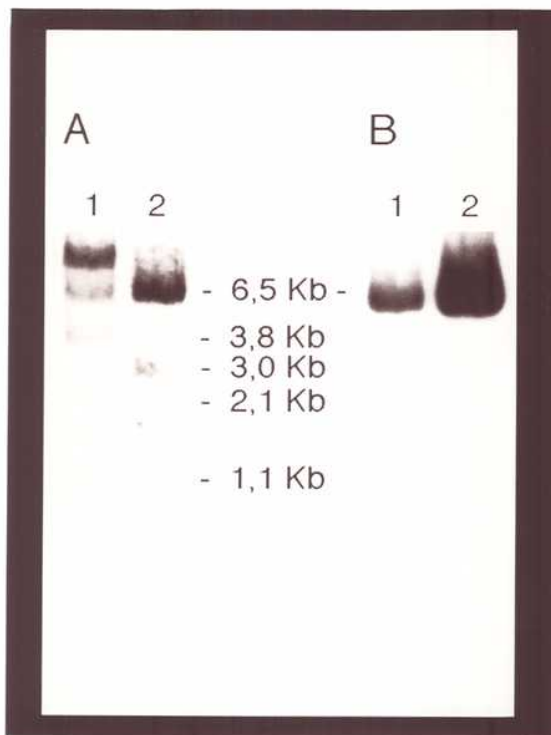


Fig.2.2.1: Análisis del subclonado del fragmento Xho I-Hind III del clon genómico en pBluescript. **A.** Gel de agarosa 0,6 % teñido con BrEt. 1: ADN del clon 911 digerido con Xho I-Hind III, 2: ADN del plásmido pNM501 digerido con Xho I-Hind III. **B.** Autorradiografía del "Southern blot" del gel A con la sonda *Asr1* completa.

Esta construcción contenía un fragmento de 4,4 Kb. del brazo derecho del fago que fue delecionado digiriendo con Sal I-Eco RI, rellenando con Klenow (ver

Materiales y Métodos) y tratando con Ligasa. La delección fue chequeada por restricción y posterior "Southern blot". El plásmido resultante se llamó pNM504 (5,1 Kb), llevando un inserto más pequeño de 2,1 Kb. Para facilitar la secuenciación del clon 504, se generaron clones más pequeños mediante delecciones con exonucleasa III desde ambos extremos del inserto. Dado que la exonucleasa III posee actividad exonucleolítica de 3' hacia 5' sobre hebras simples de ADN comenzando en extremos 3' recesivos, para proteger las secuencias del vector, fue necesario hacer dobles digestiones sobre cada lado del inserto, que dejaran un extremo 3' protruyente hacia el vector (no atacado por la enzima) y uno 5' protruyente, hacia el inserto, blanco de la enzima. Se seleccionaron los pares de enzimas Kpn I-Xho I, que cortaron de un lado del inserto y Sac I-Bam HI, que cortaron del otro. Durante las digestiones con exonucleasa III, se tomaron 20 alícuotas (una por minuto). Las alícuotas se trataron con nucleasa S1 y se analizaron corriendo una parte en un gel de agarosa 0,8 % (Fig.2.2.2.A) a partir del cual se realizó un "Southern blot" (Fig.2.2.2.B). Los clones delecionados a partir del extremo Kpn I-Xho I mostraron pérdida de homología con *Asr1* ya a tiempos muy cortos de actividad nucleolítica. Por el contrario, los clones delecionados a partir del extremo Bam HI-Sac I mantenían la homología con *Asr1* hasta la delección casi completa del inserto, de lo que se dedujo que la región codificante del clon genómico estaba contigua al sitio Xho I.

Se seleccionaron, de acuerdo a su tamaño, los clones delecionados a partir del extremo Sac I-BamH I de los tiempo 12, 13, 14 y 15, dado que al tiempo 16 ya había delección total del inserto. Previo tratado con Klenow y Ligasa, se realizaron transformaciones y se chequearon por minipreparaciones de plásmido cinco colonias correspondientes a cada tiempo. El tamaño de los distintos clones generados en cada tiempo no fue homogéneo. Se seleccionaron seis clones (12A, 13B, 14D, 13A, 14B y 15C) de tamaño decreciente. El esquema de los subclonados y delecciones hechos hasta este momento se muestra en la Fig.2.2.3.

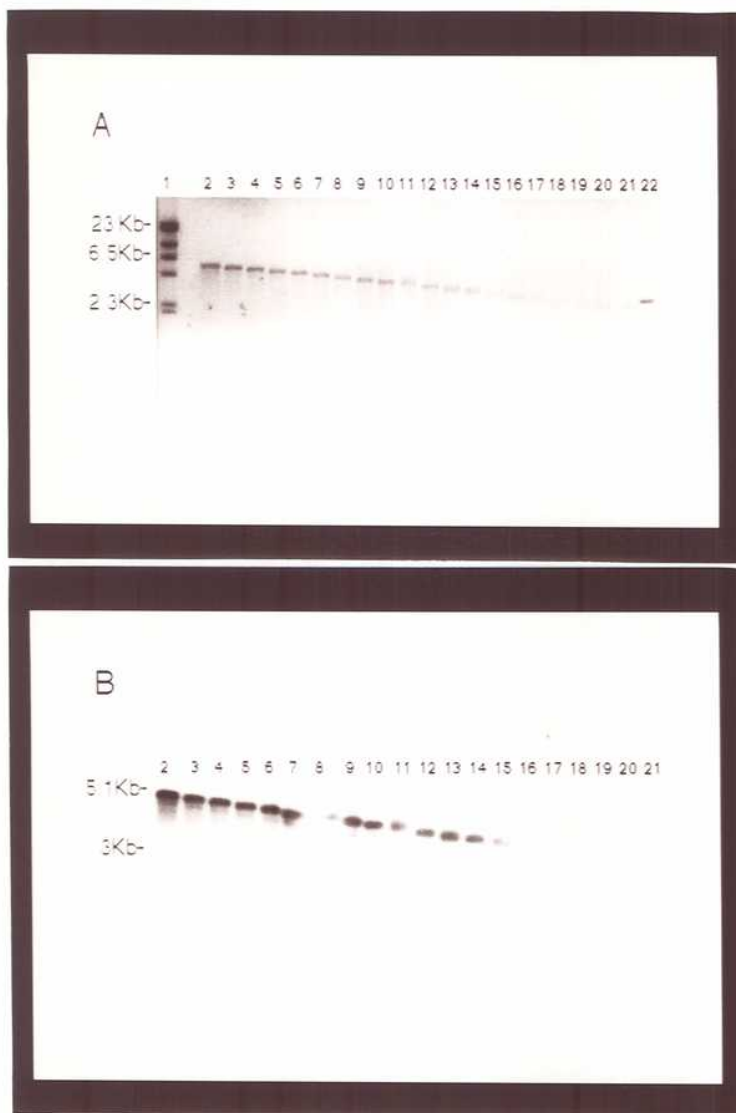


Fig.2.2.2: Análisis de los clones delecionados derivados de pNM504. **A.** Gel de agarosa 0,8% teñido con BrEt. Plásmido pNM504 tratado con exonucleasa III a partir del extremo Sac I-Bam HI. Calle 1: marcador de peso molecular (λ Hind III), calles 2. a 21: tiempos 1 al 20 de digestión y calle 22: plásmido Bluescript linearizado con Sac I-Bam HI. **B.** Autorradiografía del "Southern blot" del gel A con la sonda Asr1 completa donde se observa que la homología con la sonda se mantiene hasta la deleción casi completa del inserto.

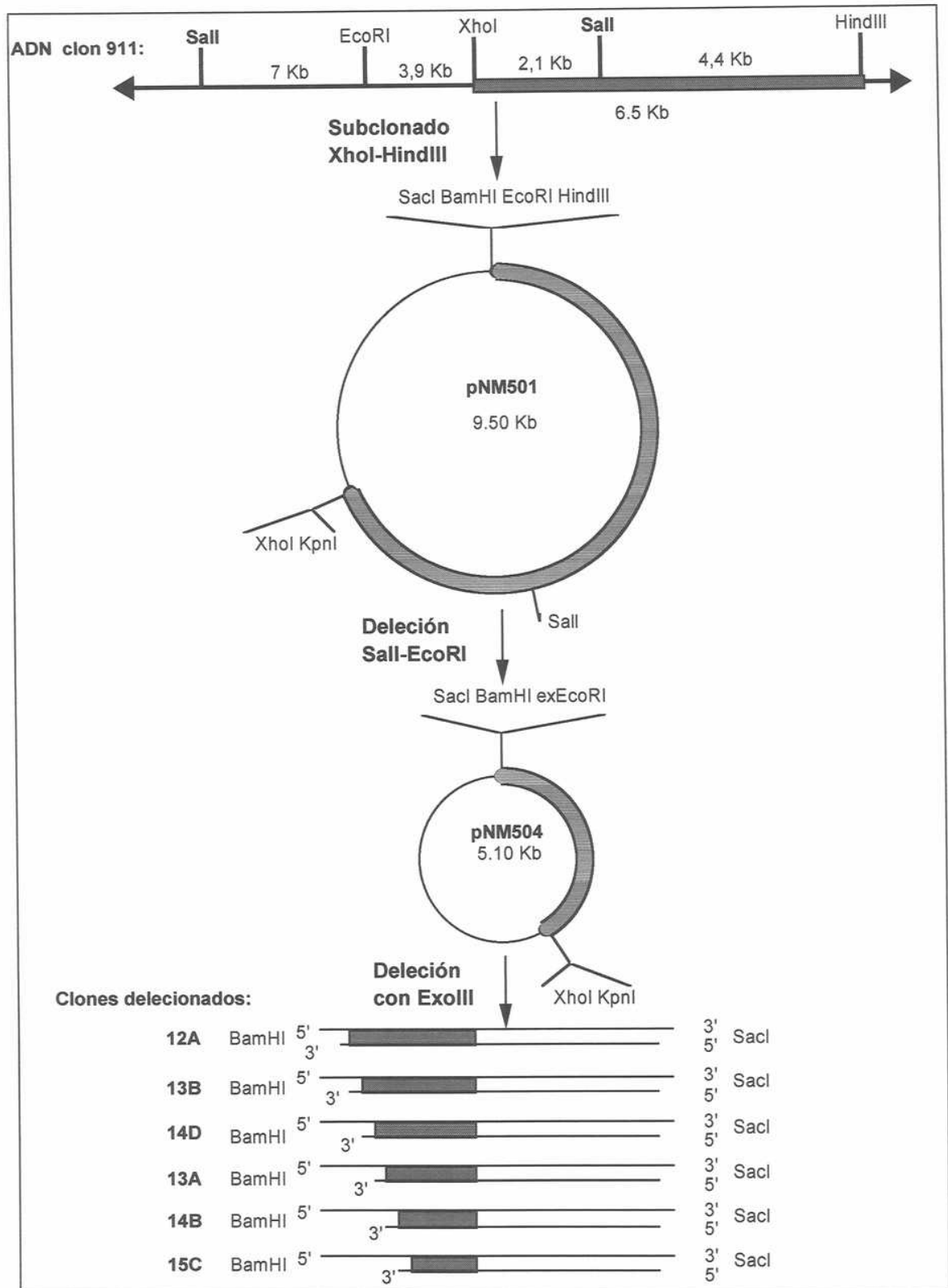


Fig.2.2.3: Esquema de la estrategia de subclonado de pNM501 y sus deleciones. Los sitios Sal I del sitio múltiple de clonado del fago se señalan en negra.

2.3. Secuenciación del clon pNM504 y sus delecciones.

La secuenciación se realizó por el método de Sanger et al.,1977. Para el clon pNM504 se utilizó el "primer" T7 que permitió comenzar la secuenciación por el extremo Xho I del subclonado, ya que sobre ese extremo estaba la región homóloga a la sonda. A continuación fue posible superponer las secuencias de los clones 14B, 13A, 13B y 12A a partir del "primer" T3. La secuencia del clon 15C quedó contenida entre las secuencias de pNM504 (T7) y 14B (T3). De estos cinco clones se obtuvo una secuencia de 694 bases. El análisis de esta secuencia mostró que el sitio Xho I del clonado de pNM504 correspondía al sitio Xho I de la base 184 del clon Asr1 (Fig.2.1.2), indicando que había quedado dentro del clon de fago 911 la parte 5' del gen (5' respecto al sitio Xho I), no analizada hasta ese momento.

2.4. Rescate de la parte 5' del gen Asr: plásmido pNM531 y derivados.

A partir de un minucioso estudio del mapa de restricción del clon 911 (Fig.2.1.2) y de un "Southern blot" de ADN del clon 911 digerido con Bgl II y Eco RI (Fig.2.4.1), se decidió subclonar el fragmento Eco RI-Bgl II de 6,9 Kb en el plásmido Bluescript. Dicho fragmento contenía todo el inserto del clon pNM504, un fragmento de 870 pb del brazo derecho del fago lambda y 3,9 Kb adyacentes al sitio Xho I de clonado de pNM504 conteniendo la región 5' del gen.

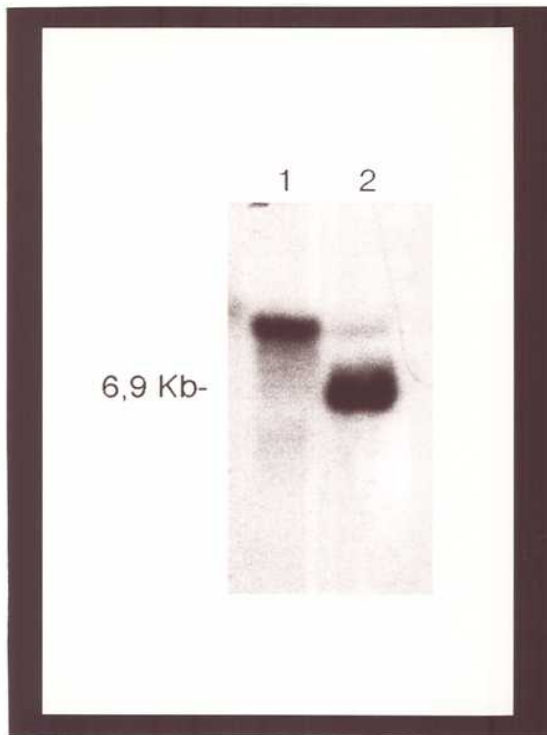


Fig.2.4.1: Análisis de fragmento Bgl II-EcoR I del clon 911. Autorradiografía del "Southern blot" con la sonda Asr1 completa de ADN del clon de fago 911 digerido con: 1.Bgl II y 2.Bgl II-Eco RI.

Si bien el "polilinker" del plásmido no tiene sitio de corte para Bgl II, se cortó con Bam HI que deja extremos compatibles con Bgl II. Se digirió, entonces, ADN del clon 911 con Bgl II-Eco RI y pBluescript con Bam HI-Eco RI, se purificaron los fragmentos con agarosa de bajo punto de fusión y se ligaron entre sí. Se transformaron bacterias, se hicieron minipreparaciones de plásmido a partir de ocho colonias y se analizaron linearizando con Eco RI (Fig.2.4.2). Se llamó a este nuevo plásmido pNM531 (9,9 Kb) (Fig.2.4.3). Para facilitar la secuenciación de la región 5' al sitio Xho I del inserto de pNM531, se hizo una delección Hind III-Hind III y se subclonaron los fragmentos Xho I-Hind III (0,2 Kb) y Hind III-Xho I (1,2 Kb) obteniéndose los plásmidos más pequeños pNM532 de 7,2 Kb, pNM533 de 3,2 Kb y pNM534 de 4,2 Kb respectivamente (Fig.2.4.3). Un esquema del subclonado de pNM531 y sus derivados se muestra en la Fig.2.4.3..



Fig. 2.4.2: Análisis del subclonado del fragmento Bgl II-Eco RI del clon genómico en pBluescript. Gel de agarosa 0,8 % teñido con BrEt. ADN plasmídico fue digerido con Eco RI. Calle 1: Marcador de peso molecular (λ Hind III), calles 2. a 7: clones positivos, calles 8. y 9: clones negativos.

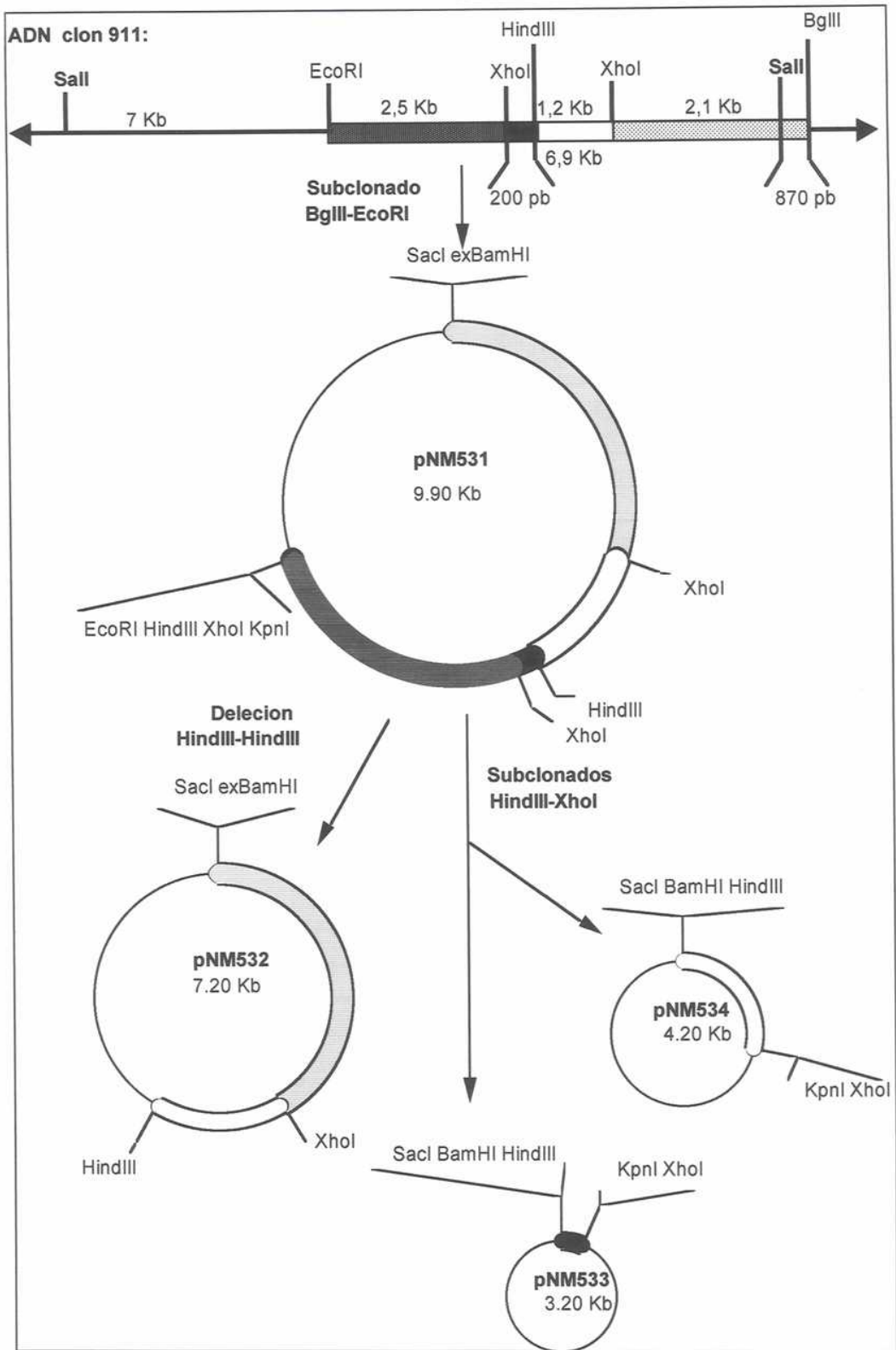


Fig.2.4.3: Esquema de la estrategia de subclonado del plásmido pNM531 y sus derivados. Los sitios Sal I del sitio múltiple de clonado del fago se señalan en negrita.

2.5. Secuenciación de pNM531 y sus derivados.

Sobre los plásmidos pNM532, pNM533 y pNM534 y usando los "primers" T3, T7, NM1 y NM2 (los dos últimos diseñados sobre la secuencia de pNM534), se terminó de secuenciar la zona codificante del gen más 1.240 pb 5`del sitio de iniciación de la traducción. El total de las bases secuenciadas finalmente fue de 2044 pb. A continuación se detallan los plásmidos y "primers" a partir de los se secuenció cada fragmento: del nucleótido -1180 al -985 sobre pNM533 a partir de T3 y T7; del -984 al -757 sobre pNM532 a partir de T7 y sobre pNM534 con T3; del -756 al -506 sobre pNM534 con NM1; del -505 al -89 sobre pNM534 con NM2; del -88 al 170 sobre pNM534 con T7; del 171 al 449 sobre pNM504 con T7; del 450 al 498 sobre el clon 14B con T3; del 499 al 607 sobre el clon 13A con T3; del 608 al 782 sobre el clon 13B con T3 y del 783 al 864 sobre el clon 12A con T3. En la Fig.3.1.1 se muestra la secuencia completa del clon genómico *Asr*.

3. ANALISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN ASR.

3.1. Características estructurales del gen *Asr*.

Comparando la secuencia del cADN *Asr1* y la nueva secuencia genómica obtenida, fue posible identificar la región codificante constituida por dos exones, entre los nucleótidos 60-218 y 330-515 y un intrón de 111 pb (Fig.3.1.1).La proteína resultante tiene un peso aproximado de 13 KD (114 aminoácidos) y es rica en aminoácidos básicos (21 % de histidina y 16 % de lisina). La estructura secundaria de la proteína muestra α -hélices interrumpidas por un número variable de aminoácidos. En el nucleótido 63 presenta una G consenso detrás del codón de iniciación de

traducción (Lüctcke et al., 1987). El intrón respeta el consenso 5'GT---AG3'. Sobre la región 5' del gen se localizaron varias posibles TATA (nucleótidos: -225, -122, -87 y -39) y CAAT (-816, -775, -765, -683, -330, -309 y -102) "boxes", estas últimas sólo en orientación inversa. Sobre la región 3' se encontraron dos secuencias de poliadenilación en las posiciones 567 y 692.

En plantas se han descrito diversas secuencias consenso involucradas en la regulación de la transcripción de genes inducidos por ABA. Los dos elementos más comunmente observados son la "G-box" (Gultinan et al., 1990) y el elemento "CE1-like" (Shen y Ho, 1995). La "G-box" consta de un centro ACGT flanqueado por diferentes secuencias, que interactúa con proteínas del tipo "leucine zipper", las cuales se pegan al ACGT con diferentes grados de afinidad de acuerdo a la secuencia entorno (Foster et al., 1994). En la región 5' de *Asr* se encontraron tres "G-box" en las posiciones -1149 y -804. En el nucleótido -834 se encontró la secuencia consenso CCACGTGG descrita por Pla et al., 1993 (7 nucleótidos iguales de 8) que es una "G-box", pero en *Asr*, la G del ACGT está sustituida por una T (Fig.3.1.1). El elemento "CE1-like" posee un centro CACC rodeado de secuencias variables y actuaría conjuntamente con la "G-box" determinando la especificidad de la respuesta inducida por ABA (Shen y Ho, 1995). *Asr* presentó secuencias "CE1-like" en los nucleótidos -1090, -932, -216 y -90.

Otras de las secuencias consenso que se encontraron sobre la región 5' de *Asr* son la "HEX box" (Osley, 1991; posición -640, con 5 nucleótidos iguales de 6), "GATCC" (Hentschel y Birnstiel, 1981; posiciones -598 y -1175) y "AC box" (Dalton y Wells, 1988; posición -262, con 6 nucleótidos iguales de 7), que corresponden a elementos encontrados en promotores de genes de histonas de plantas y animales (Wei y O'Connell, 1996).

La homología con *Asr1* sobre la región codificante fue de 79,1 % a nivel de ADN y de 70,4 % a nivel de aminoácidos. Hacia 5' y 3' de la región codificante, la homología con *Asr1* se pierde. Tal alto grado de divergencia hizo pensar en el clon genómico como un nuevo miembro de una familia génica, más que una variante

alélica polimórfica. De aquí en más, se llamó al nuevo clon genómico *Asr2*, dada la sospecha de la existencia de un segundo miembro de una familia multigénica.

-1180	ctcga GAATC tgcttactcaagatcatgtta ACGT tcttctaaagcctgacggagaaaaa	-1121
-1120	ttacatcaactcttcagattacatcctctt CACC atgtctcttttgcatgccatcctgaca	-1061
-1060	cttgcttctgcatacaaaagtctctgttaagtgaactgctggccctagacccccgaaggccat	-1001
-1000	gaacatcaaaccaaagcttttagtcttagtagaaagagtgcagcatattccttggttgctt	-941
-940	gcaggtgc CACC cagcatttattagaatccgagtcttctctcattgtgcctgtatcaaat	-881
-880	ttttggatgactgctggtgagactctactaagtcttgtcagaagct CCACTTGGG aactta	-821
-820	cttt caat ggaaagac ACGT tgaggaaattttcattttcgtcgcacat caat ttgtgg caat g	-761
-760	cacactgcttgatataagtttagagataaaatttgccgattgtcatgatgaaaatgcagag	-701
-700	tttgctgatgtaactag ccaat ttttgagttgtgtaccgatacaacatcaaaaatctgg	-641
-640	GATTC ctcacaaggaaggtggttacttgaagtagttgaa GAATC cattaacttttaga	-581
-580	tggcttgggagtaggatgccatccttttagtcagtttgcaactcatgcaacaagtoctagt	-521
-520	gcagacaaaacagattctggattggaagcagaagataatcacaacgagatacgggtaaac	-461
-460	ttgttctgcttggatcactgcttaatctatggagctttttgtcaactgatgtttggtcc	-401
-400	taatgccactcatgtctaagttgaaagcttcttagtgcgaaggtattctgaacgggt	-341
-340	aacttaagcc attgg ttgctcaaaatccct attg tgtaaatgccaacacatattgttac	-281
-280	ctgttttgtgatttaggt AAACGCA aggaaattttcaaaactaaacattttcacagt tataa	-221
-220	catc CACC agtcaaaacctcacttagttggaataatttgtttgaaattttctaaacgctca	-161
-160	cacaagtatatacacatccagatgaaatcaaactatac tatataaaaa atcataata at	-101
-100	tga aggttc CACCTaataata gaaatccccatcacacattttctcatacactcacgctgg	-41
-40	ctaata tttttggacattgtctatacaactataaataatgGacattttggagaagaaaat	20
21	atctgtgaattgacattaatttaagagaagcaatacaat ATGGCTGAAGAGAAACACCAA	80
		M A E E K H Q 7
81	CACCATCACCATTTGTTCCACCACAAGAACAAGGAGGATGAGGGTGGACCAGTTGATTAT	140
8	H H H H L F H H K N K E D E G G P V D Y	27
141	GAAAAAGAAGTGAAGCACCACAGCCATCTCGAGAAGATTGGTGAACCTGGTGTCTGTGCT	200
28	E K E V K H H S H L E K I G E L G A V A	47
201	GCTGGTGTCTTTGGCCTTAGtatgtaaataataacatataatgcatattttgtttttata	260
48	A G A L A L	53
261	tacgttacatttgatacaagtccttctttaattttcttacgccgtttgtggttgaattatta	320
321	aatatatagCATGAGAAACACAAGGCAAAGAAGGACCCAGAGCATGCACACAAGCACAAG	380
54	H E K H K A K K D P E H A H K H K	70
381	ATAGAGGAAGAGATTGCAGCTGTTGCTGCAGTTGGGGCAGGTGGATTTCATTCATGAA	440
71	I E E E I A A V A A V G A G G F A G F H E	90
441	CATCATCAGAAAAAAGATGCCAAGAAAGAAAAAAGGAAGTTGAGGGTGGACACCACCAC	500
91	H H Q K K D A K K E K K E V E G G H H H	110
501	CACCACCACTACTAAtcaaatttaacttttttaggcacctatggactctatgttttgtct	560
111	H H H Y *	114
561	aatataaataaataaaaagctactactatataatgtgttttgtatccaatattaatctctct	620
621	ctagattgtatgatttgggtgtttctatgttaatctcactatgtaatactttgagcccgtt	680
681	tggatgggcttaataaaaagcagctttaaaggtacttttgaaagtgtgaaacttattt	740
741	ttaaaataagtagttatgctgtttggataaaaaggttgaagttaaaaaaaagttgttgat	800
801	gtatttggcaataagtgctgataaacaactttttaaatcaaatgtctgaaataccatc	860
861	aaaa	

Fig.3.1.1: Secuencia completa del clon genómico *Asr2*. La región codificante se indica en mayúscula junto con la secuencia de aminoácidos. Los sitios de iniciación (ATG) y terminación (TAA) de la traducción están subrayados. **aataaaa**: secuencias de poliadenilación. **G**: posición +1 (inicio de transcripción). **tataa**: "TATA boxes". **attg**: "CAT boxes". **ACGT**: "G boxes". **CACC**: "CE1-like boxes". **GATTC**: "HEX box". **GAATC**: "GATCC boxes". **AAACGCA**: "AC box".

3.2. Determinación del tamaño aproximado del mensajero de *Asr2*.

Para conocer el tamaño del mensajero de *Asr2* se realizó un "Northern blot". Se usó ARN de fruto de tomate maduro, ya que en ese órgano se demostró que *Asr1* tenía altos niveles de expresión (Iusem et al.,1993). Debido a la gran homología sobre la región codificante entre ambos clones, se eligió una sonda que contuviera la parte 5' del transcrito no codificante para revelar preferentemente a *Asr2*. Se utilizó como sonda un fragmento Hind III-Xho I (1,2 kb) del plásmido pNM531. Luego de tres días de exposición se reveló una banda de aproximadamente 800 pb semejante al tamaño del clon de *Asr1* (Fig.3.2.1). Este resultado demostró que el gen *Asr2* se expresa en fruto de tomate maduro.

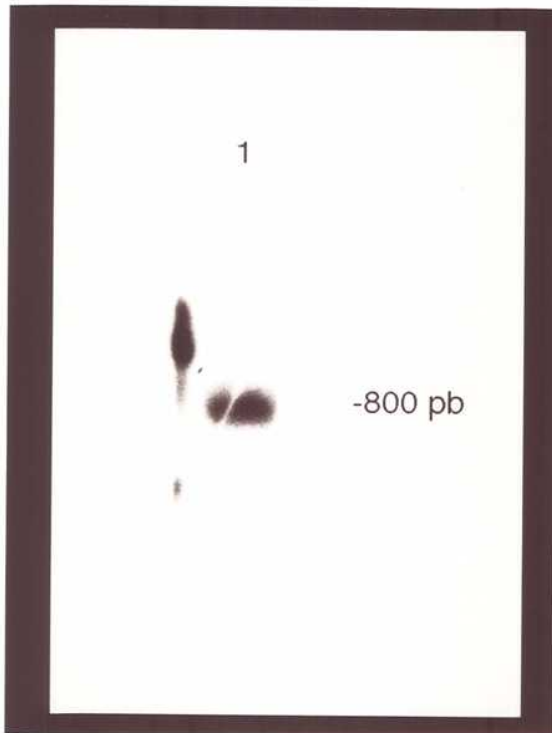


Fig.3.2.1: "Northern blot" de *Asr2*. Autorradiografía del "Northern blot" con sonda de *Asr2*. Calle 1: ARN de fruto de tomate, donde se observa una banda de aproximadamente 800 pb.

3.3. Identificación del sitio de iniciación de la transcripción de *Asr2*.

Dada la ausencia de homología entre las regiones transcriptas 5' no codificantes de *Asr1* y *Asr2*, fue necesario aplicar la técnica de "Primer Extension" (ver Materiales y Métodos) para conocer el sitio +1 (sitio de iniciación de la transcripción) del gen. Se diseñó un oligonucleótido de 20 bases (NM10) complementario al ARN mensajero a 50 pb 3' del sitio de iniciación de la traducción. Dada la confirmación de la presencia del ARN mensajero de *Asr2* en mesocarpio de fruto maduro de tomate por "Northern blot" se utilizó como molde de la reacción ARN de este tejido. El producto de la reacción de Transcriptasa Reversa se corrió en paralelo junto con la secuencia del plásmido pNM531 a partir del mismo oligonucleótido, pudiendo localizarse exactamente la base en donde comienza el mensajero del gen *Asr2* (Fig.3.3.1). De esta manera, se localizó el sitio de iniciación de la transcripción en el nucleótido número 1181, ubicado a 59 bases 5' del ATG iniciador de la traducción (Fig.3.1.1).

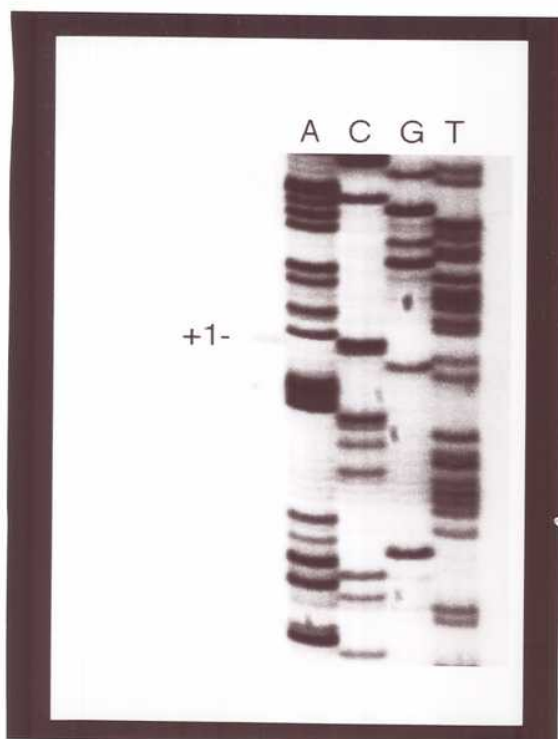


Fig.3.3.1: Reacción de "Primer Extension". Gel de poliacrilamida 6%. Calles A, C, G, T: reacciones de secuencia del clon pNM531 a partir del oligonucleótido NM10. Con +1 se señala el sitio de iniciación de la transcripción.

3.4. Homología de *Asr2* con otros genes.

La secuencia de *Asr2* fue comparada con la base de datos del GenBank, lo cual permitió conocer todas las secuencias conocidas homólogas al gen. Una vez localizado el sitio de iniciación de la transcripción, se pudieron discriminar las diferentes regiones del gen y comparar por separado cada región respecto a las equivalentes de los genes homólogos. Se identificó una secuencia genómica de tomate incompleta llamada *Asr3* (secuencia inédita, número de acceso al GenBank X74908), que fue aislada a partir de una biblioteca genómica utilizando *Asr1* como sonda, que podría corresponder a otro miembro de la posible familia génica. Una comparación exhaustiva entre *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* permitió conocer los porcentajes de similitud que comparten sobre las diferentes regiones génicas. A nivel de nucleótidos, la región codificante de *Asr2* es homóloga en un 79,1 % a *Asr1* y 86,4 % a *Asr3*, mientras que *Asr3* y *Asr1* comparten un 76,2 % de homología. A nivel de aminoácidos, los porcentajes de homología de *Asr2* con *Asr1* y *Asr3* son de 70,4 % y 79,5 % respectivamente, en tanto que *Asr1* y *Asr3* son 65,4 % homólogos. Las regiones 5' no transcritas de *Asr1* y *Asr2* son un 40,7 % similares. Los promotores de *Asr2* y *Asr3* comparten un 54 % de homología. Y por último los intrones de *Asr2* y *Asr3* son 49,5 % similares. De este análisis se desprende que *Asr2* es más similar a *Asr1* y *Asr3* que estos últimos entre sí.

Dos clones de cADN resultaron compartir cierta homología con *Asr2*, uno de *Citrus maxima* (cm) (secuencia inédita, número de acceso al GenBank U18972) y otro de *Solanum chacoense* (sc) (secuencia inédita, número de acceso al GenBank U12439) con un 69,4 % y 44,1 % respectivamente a nivel de nucleótidos y sobre la región codificante.

Otro dato interesante fue la homología de 92 % que mostró un fragmento de 107 pb de la región 3' no codificante con el sexto intrón del gen de la poligalacturonasa (PG) de tomate (Bird et al.,1988) (Fig.3.4.1). Por otro lado, el promotor de la PG y el de *Asr2* resultaron 53,2 % homólogos.

	676		735
Asr2	CCGTTTGGATGGGCTTAATAAAAGCAGCTTTAAAAAAGTACTTTTGAAAGTGCTGAAACT		
PG	CCGTTTGGATGGGCG?AATAAAAGCAGCTTTAAAAAAGTACTTTTAAAAAGTGTGAAACT		
	4798		4856
	736		782
Asr2	TATTTTTAAAATAAGTAGTTATGCG?TTTGGATAAAAGTGTTGAAGTT		
PG	TATTTTTAAAATAAGCAGTTAT?CGGTTTGGATAAAAGTGCTGAAGTT		
	4857		4903

Fig.3.4.1: Homología con el intrón 6 del gen de la poligalacturonasa. Secuencia de la región 3' no codificante de *Asr2* alineada con el fragmento homólogo del sexto intrón de la poligalacturonasa. La numeración de *Asr2* responde a la de la Fig.3.1.1 y la de la poligalacturonasa, al clon inscripto en el GenBank.

4. DISCRIMINACION Y MAPEO DE ASR1, ASR2 Y ASR3.

4.1. Discriminación de *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* por análisis de PCR.

Debido a que el tomate es diploide, por individuo no se pueden encontrar más de dos formas alélicas para el mismo locus. Por lo cual, si *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* correspondieran a formas alélicas del mismo gen, en un individuo totalmente homocigota se debería detectar la presencia de sólo uno de estos clones, mientras que en un individuo heterocigota, a lo sumo dos. De lo contrario, *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* serían diferentes genes, miembros de una familia multigénica. Con el objeto de dilucidar, entonces, si el clon de cADN *Asr1*, y los clones genómicos *Asr2* y *Asr3* son alelos del mismo locus o diferentes loci, se realizó un ensayo de PCR. Se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos para cada clon, que dieran productos de amplificación de diferente tamaño para facilitar su identificación (ver Materiales y Métodos). Las líneas que se utilizaron para este experimento fueron *L. esculentum*

E6203 y NILs (Near Isogenic Lines) (ver Materiales y Métodos). Se extrajo ADN de individuos homocigotas *L. esculentum*/*L. esculentum* (*esc/esc*) y *L. hirsutum*/*L. hirsutum* (*hirs/hirs*) y de uno heterocigota *L. esculentum*/*L. hirsutum* (*esc/hirs*). La amplificación para cada clon del ADN genómico de *esc/esc*, *esc/hirs* y *hirs/hirs* mostró una única banda independientemente del estado alélico del individuo a partir del cual se extrajo el ADN. Los tres pares de oligonucleótidos usados amplificaron fragmentos de aproximadamente 1000, 640 y 480 pb para *Asr1*, *Asr2* y *Asr3*, respectivamente (Fig.4.1.1). Estos valores son consistentes con los tamaños esperados, de acuerdo al diseño de los oligonucleótidos, de más de 417 pb para *Asr1*, 638 para *Asr2* y 481 para *Asr3*. La diferencia observada entre la banda de aproximadamente 1000 pb (Fig.4.1.1 calles 5, 8 y 11) amplificada a partir de ADN genómico con los oligonucleótidos para *Asr1* y la de 417 pb (Fig.4.1.1 calle 1) obtenida a partir del clon de cADN revela la presencia de un fragmento de aproximadamente 580 pb que corresponden al intrón/es de *Asr1*, cuyo tamaño era desconocido hasta el momento. Estos resultados permitieron concluir que estos tres clones corresponden a tres diferentes loci y no a alelos de un mismo locus.

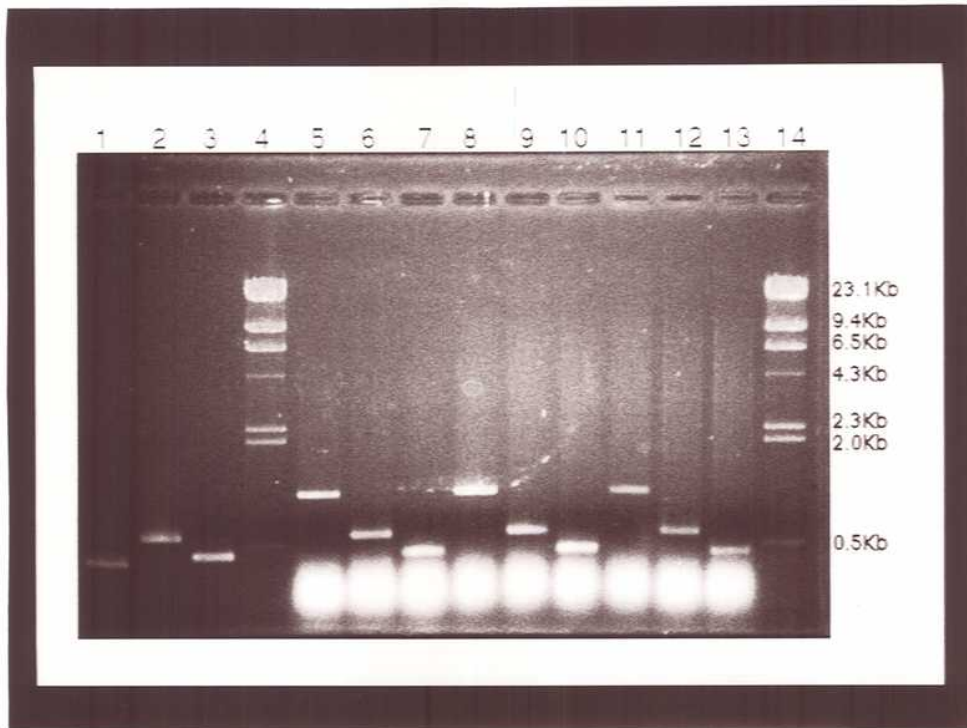


Fig.4.1.1: Amplificación por PCR de *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* a partir de NILs con diferente estado alélico. Los ADN utilizados como molde fueron: 1. ADN plasmídico control conteniendo el clon de cADN *Asr1*; 2. ADN plasmídico control conteniendo el clon genómico *Asr2*; 3. ADN genómico control de *L. esculentum* var. UC82; 5,6 y 7. ADN genómico de línea homocigota *esc/esc*; 8,9 y 10. ADN genómico de línea heterocigota *esc/hirs* y 11, 12 y 13. ADN genómico de línea homocigota *hirs/hirs*. Los oligonucleótidos utilizados fueron: 1, 5, 8 y 11. *Asr1*-directo y *Asr1*-inverso; 2, 6, 9 y 12. *Asr2*-directo y *Asr2*-inverso y 3, 7, 10 y 13. *Asr3*-directo y *Asr3*-inverso. 4 y 14. marcador de peso molecular (λ Hind III). Las bandas que se observan en la zona inferior del gel ausentes en los controles positivos corresponden a ARN presente en las preparaciones de ADN genómico.

4.2. Mapeo de alta resolución de *Asr1*, *Asr2* y *Asr3*.

Con el objeto de determinar la localización cromosómica de estos tres genes, se mapearon por RFLPs los clones *Asr1*, *Asr2* y *Asr3*. Como sonda, se utilizaron fragmentos de cada uno de los tres clones obtenidos por PCR (ver Materiales y Métodos). Debido a la alta homología entre las regiones codificantes de estos genes, la hibridación cruzada podía llevar a errores en el mapeo, enmascarando los resultados en el caso de que los loci no estuvieran ligados. Para evitar este problema, se diseñaron dos sondas de *Asr2*, una conteniendo la mayor parte de la región codificante más el intrón (*Asr2* 3') y otra conteniendo la región promotora y la secuencia 5' no codificante (*Asr2* 5'). Esta última sonda no presentaría, en principio, hibridación cruzada.

El análisis de segregación de *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* respecto del mapa de tomate de Tanksley et al. (1992) determinó que los tres genes cosegregan, no encontrándose ningún individuo recombinante entre las 49 plantas de la F2 examinadas. Los tres genes aparecen formando un "cluster" a 3,6 cM del marcador TG208 y a 0,9 cM de TG75A (Fig.4.2.1), que mapea en el cromosoma 4. Los datos ajustan a los resultados esperados para una segregación 1:2:1 mendeliana (prueba de χ^2 : $p>0,1$).

Las autorradiografías de los RFLPs mostraron múltiples bandas cuando el ADN fue cortado con EcoR I. *Asr1* reveló dos bandas (10,5 Kb y 8,4 Kb) en *L. penelli* y dos (13,3 Kb y 4,8 Kb) en *L. esculentum* (Fig.4.2.2.A). *Asr2* 3' presentó tres bandas (10,5 Kb, 8,4 Kb y 4,4 Kb) en *L. penelli* y cuatro (13,3 Kb, 8,4 Kb, 5,6 Kb y 4,8 Kb) en *L. esculentum* (Fig.4.2.2.B). Para *Asr3* se observaron tres bandas (10,5 Kb, 8,4 Kb y 4,4 Kb) en *L. penelli* y dos (13,3 Kb y 8,4 Kb) en *L. esculentum* (Fig.4.2.2.C). En un análisis más exhaustivo, se observó que los patrones de restricción de *Asr1* y *Asr3* están contenidos en el de *Asr2* 3'. Sin embargo, cada clon hibrida diferencialmente presentando distinta intensidad en la señal para diferentes bandas, lo cual demuestra la especificidad de las hibridaciones y confirma la existencia de tres diferentes loci.

Para *Asr2 5'* la enzima que reveló polimorfismo fue *Hind III* y por lo tanto, los patrones no pueden ser comparados con los de las otras sondas (Fig.4.2.2.D). Sin embargo, *Asr2 5'* cosegregó con *Asr2 3'*, *Asr1* y *Asr3*, descartando errores en la evaluación de los polimorfismos debido a hibridación cruzada.

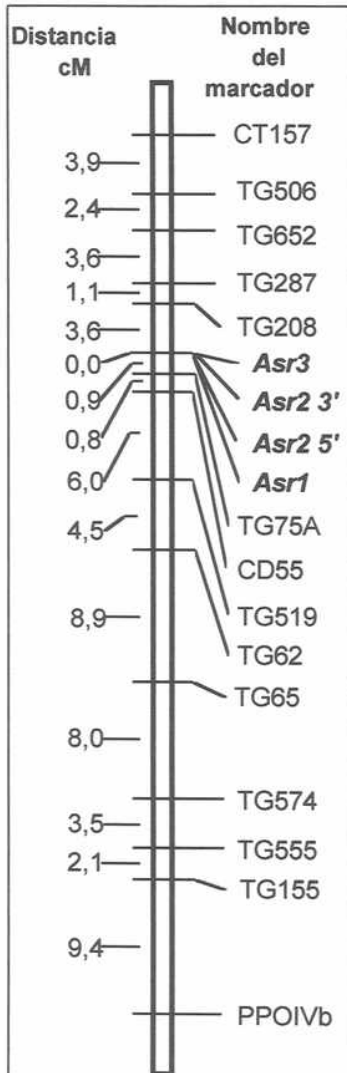


Fig.4.2.1: Mapa de ligamiento de un fragmento del cromosoma 4. Se muestra la localización de *Asr1*, *Asr2 5'*, *Asr2 3'* y *Asr3* y de los marcadores vecinos. Los marcadores CT157, TG506, TG652, TG287, TG208, TG75A, CD55, TG519, TG62, TG65, TG574, TG555, TG155 y PPOIVb fueron mapeados anteriormente (Tanksley et al.,1992).

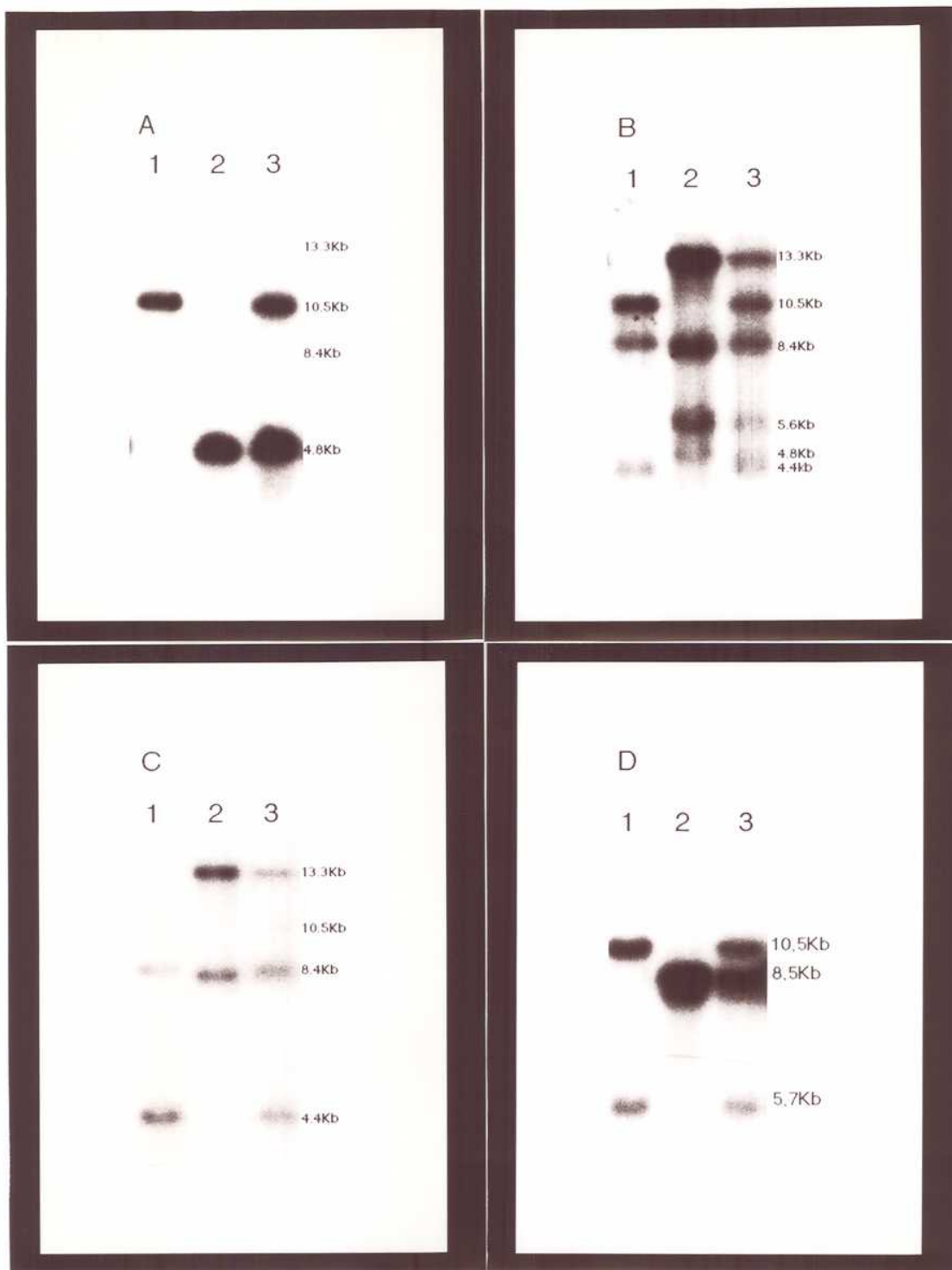


Fig.4.2.2: Patrones de RFLPs de *Asr1* (A), *Asr2* 5' (D), *Asr2* 3' (B) y *Asr3* (C). 1. ADN genómico de un individuo F₂ homocigota como el parental *L. pennelli*. 2. ADN genómico de un individuo F₂ homocigota como el parental *L. esculentum*. 3. ADN genómico de un individuo F₂ heterocigota. En A, B y C el ADN fue digerido con *EcoR* I y en D con *Hind* III.

5. OBTENCION DE UNA CONSTRUCCION CONTENIENDO LA REGION 5' DE ASR2 Y UN GEN INDICADOR. ANALISIS FUNCIONAL DE LA MISMA POR EXPRESION TRANSITORIA.

5.1. Subclonado de la región 5' de Asr2 en un vector plasmídico conteniendo un gen indicador: construcción del plásmido pNM600.

Para estudiar la actividad promotora de las secuencias 5' de *Asr2* y su posible inducción por ABA, se construyó un vector portando dichas secuencias y el gen *uidA* de la β -glucuronidasa (GUS) fusionado inmediatamente río abajo. Este gen indicador es de uso corriente en ensayos de expresión en tejidos vegetales debido a la relativa sencillez de los métodos para detectar la actividad de la enzima, la estabilidad *in vitro* de la proteína y la mínima actividad basal en las plantas. Se diseñaron dos oligonucleótidos (NM8 y NM9) para PCR (ver Materiales y Métodos) que amplificaban el fragmento comprendido entre las bases -1180 y 59 del clon genómico (Fig.3.1.1.) presente en el plásmido pNM531, conteniendo el posible promotor de *Asr2* y la región 5' transcrita no codificante del ARN mensajero. El producto de PCR se purificó por Wizard PCR (Promega), se trató con Klenow y digirió con Hind III, resultando un inserto de 1023 pb, con un extremo cohesivo (generado por Hind III) y otro romo. Posteriormente, fue subclonado en el vector binario para *Agrobacterium tumefaciens* pBI101.2 (12 Kb) 5' respecto al gen GUS entre los sitios Hind III y Sma I e introducido en *Escherichia coli*. Las bacterias transformantes se seleccionaron con kanamicina, ya que el plásmido pBI101.2 tiene dos copias del gen NPTII que confiere resistencia a este antibiótico, una bajo un promotor eucariota (para selección en plantas) y otra bajo un promotor procariota (para selección en bacterias). Se analizaron 13 colonias, producto del subclonado, mediante digestión con Hind III-Eco RI (Fig.5.1.1). Este nuevo vector se llamó pNM600 (13 Kb). En la Fig.5.1.2 se esquematiza la estrategia del subclonado.

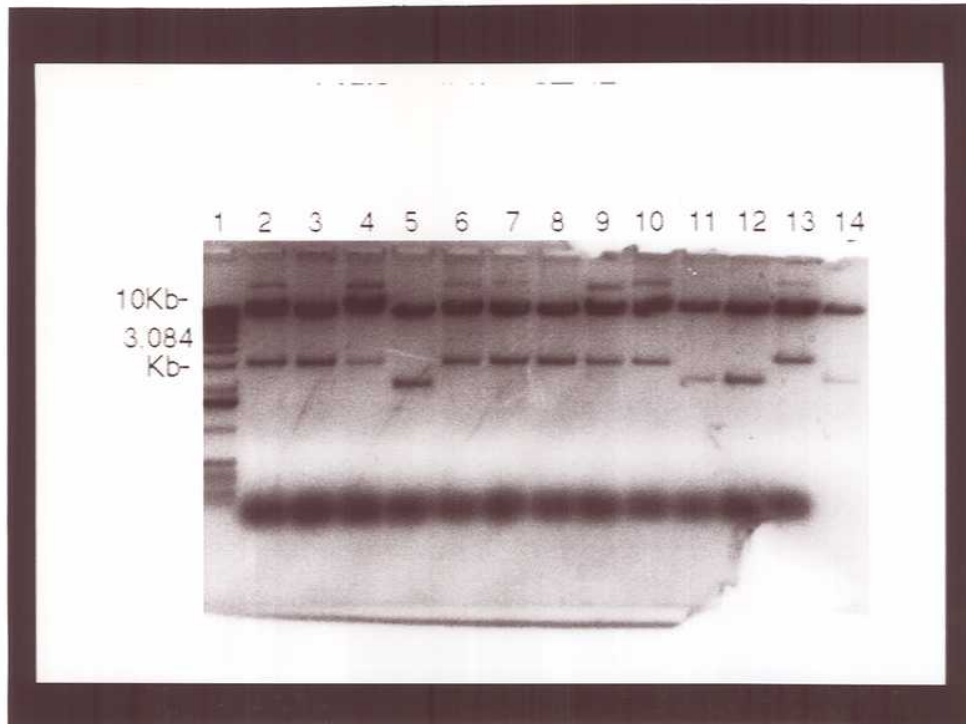


Fig.5.1.1: Chequeo de la construcción pNM600. Gel de agarosa 0,8% teñido con BrEt. ADN plasmídico se digirió con Hind III-Eco RI. Calle 1: marcador de peso molecular (1 Kb ladder), calles 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 13: clones positivos, calles 5, 11 y 12: clones negativos (vector religado) y calle 14: ADN de pBI101.2 digerido con las mismas enzimas.

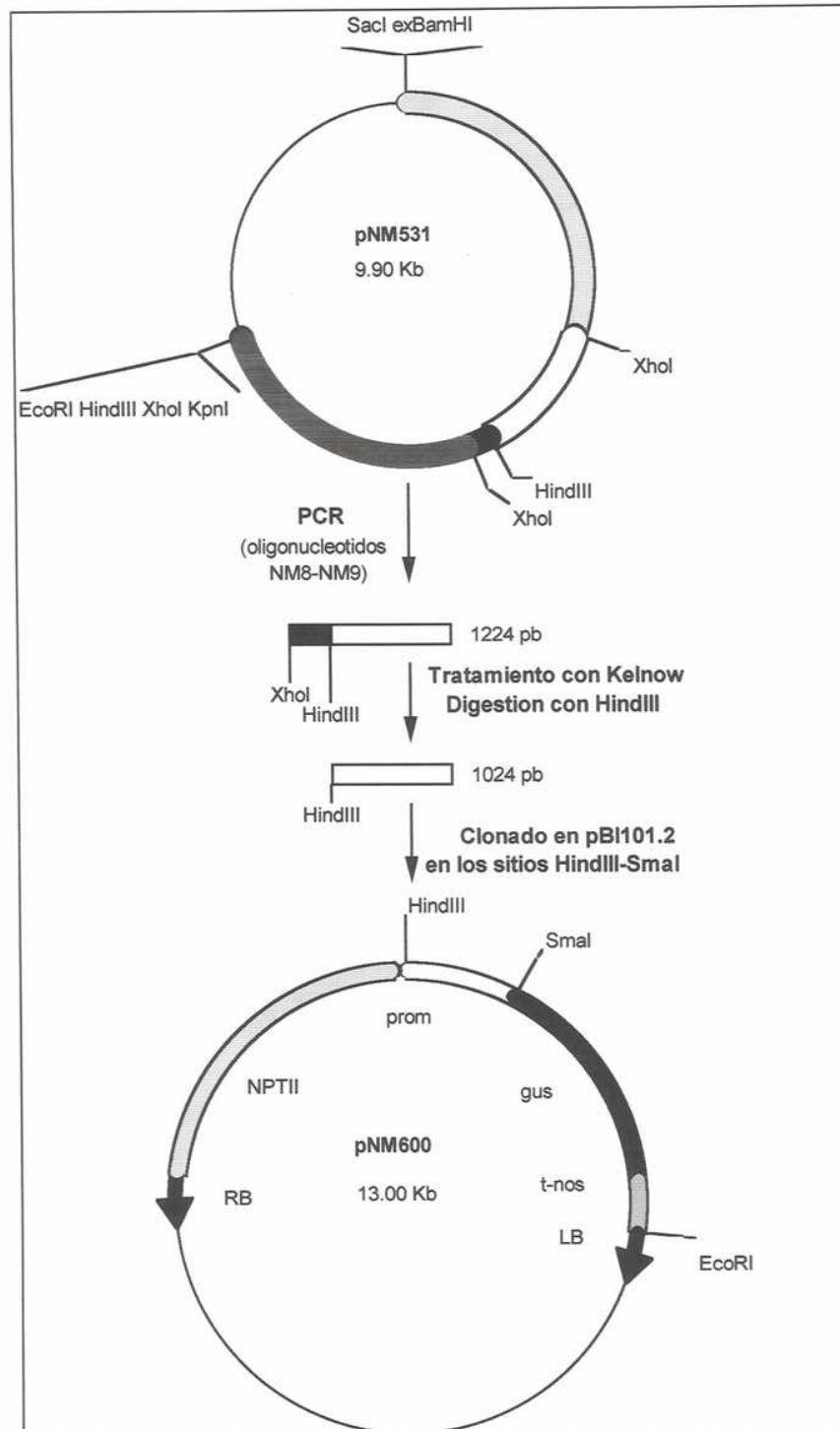


Fig.5.1.2: Esquema del subclonado de la región 5' de *Asr2* en el plásmido pBI101.2.

5.2. Ensayos de expresión transitoria.

Antes de transformar plantas en forma estable, se estudió la funcionalidad de la región 5' de *Asr2* dentro del plásmido pNM600 usando la metodología de cañón génico. Esta técnica permite mediante transformación transitoria, revelar la existencia del producto del gen indicador de una manera rápida, siempre que se tengan puestas a punto las condiciones de bombardeo para un sistema vegetal determinado. Detectando actividad de la enzima β -glucuronidasa, se prueba la existencia de transcripción a partir del promotor y posterior traducción del ARN mensajero. El sistema elegido fue papaya. Las condiciones de preparación de micropartículas, precipitación, bombardeo y revelado se detallan en Materiales y Métodos. Se bombardearon con el plásmido pNM600 callos embriogénicos en fase globular y secciones de hojas. Al desconocerse las condiciones de inducción del promotor de *Asr2*, los tejidos se incubaron tentativamente suplementando o no el medio de cultivo con 0,5 mg/l de ABA. Al tercer día post-bombardeo se realizó el ensayo histoquímico para revelar la actividad de la β -glucuronidasa con sustrato X-GLU. En callos embriogénicos, el promedio de puntos azules fue de 80 puntos/10 mg de peso fresco independientemente de la presencia de ABA, mostrando un comportamiento constitutivo (Fig.5.2.1.a). Por otro lado, las hojas bombardeadas revelaron un promedio de puntos azules de 104 por cm² cuando se las trató con ABA (Fig.5.2.1.b), mientras que no se observó actividad basal en ausencia de ABA (Fig.5.2.1.c). Esto indica que la región 5' de *Asr2* posee actividad de promotor y contiene secuencias que responden a la estimulación por ABA.

Como control positivo, se bombardearon hojas con el plásmido pBI426 (ver Materiales y Métodos), que contiene el gen GUS bajo el control del promotor doble 35S. En este caso, no se observaron diferencias en el número e intensidad de los puntos azules entre las hojas tratadas y no tratadas con ABA (Fig.5.2.1.d), lo cual era esperado debido a la actividad constitutiva del promotor 35S. La cantidad de puntos azules fue similar a lo obtenido con pNM600 en presencia de ABA.

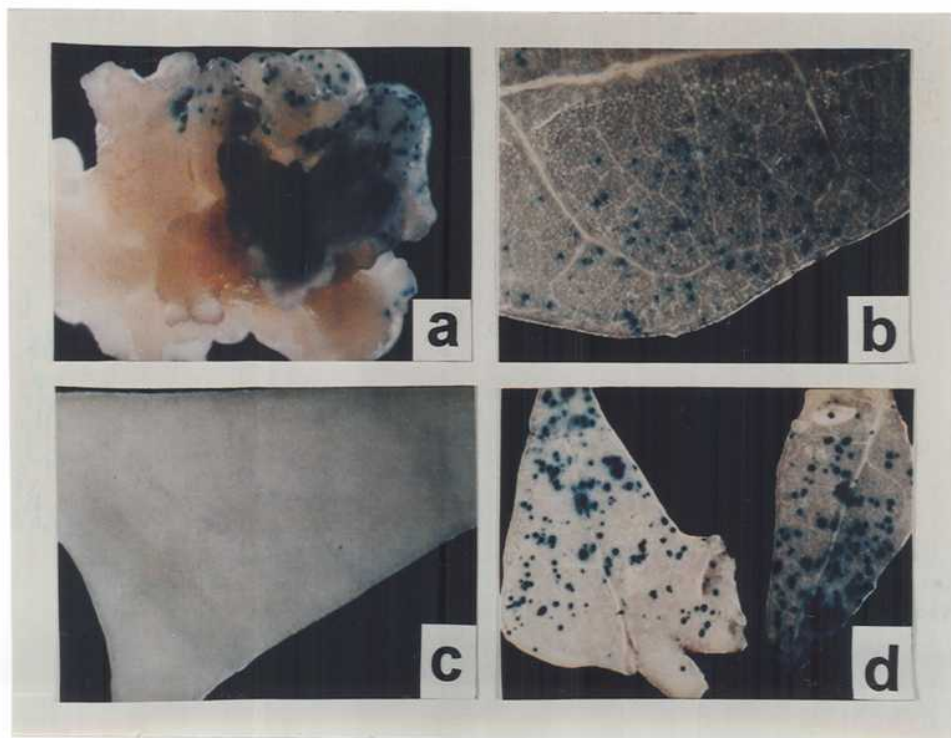


Fig.5.2.1: Expresión transitoria del gen de la β -glucuronidasa en tejidos de papaya bombardeados teñidos con X-GLU. **a.** Callos embriogénicos bombardeados con pNM600. **b.** Hojas tratadas con 0,5 mg/l de ABA bombardeadas con pNM600. **c.** Hojas no tratadas con ABA bombardeadas con pNM600. **d.** Hojas tratadas (izquierda) y no tratadas (derecha) con 0,5 mg/l de ABA bombardeadas con pBI426.

6.TRANSFORMACION ESTABLE.

Los ensayos de expresión transitoria demostraron la actividad promotora de la región 5' de Asr2 y su modulación por ABA. En base a estos resultados, se encaró la producción de plantas transgénicas de tres especies diferentes con el objetivo de

comparar la eficiencia del promotor en sistemas de expresión transitoria y estable, así como también entre diferentes especies vegetales y métodos de transformación.

6.1. Obtención y análisis de plantas de papaya transgénicas con cañón génico.

6.1.1. Obtención y chequeo de las plantas.

La obtención de plantas transgénicas de papaya (*Carica papaya* L.) se realizó utilizando el método del cañón génico según se detalla en Materiales y Métodos. Callos embriogénicos fueron bombardeados con una mezcla de los plásmidos pNM600 y pGPTV-*Bar*. Este último aporta el gen *bar*, el cual confiere resistencia a PPT debido a que la resistencia a kanamicina (aportada por pNM600) no es suficiente para la selección de las plantas transgénicas de papaya. Luego de 4 meses de cultivo en presencia de kanamicina y PPT, se obtuvieron tres clones (1, 3 y 5) que fueron chequeados por "Southern blot" para confirmar la presencia del inserto completo en el genoma. Muestras de ADN de cada uno de los tres clones y de una planta de papaya no transformada fueron digeridas con las enzimas Hind III y EcoR I que liberan el cassette completo promotor *Asr2-GUS*, e hibridadas con el producto de la digestión de pNM600 con las mismas enzimas. En la Fig.6.1.1.1 se observa la presencia de una banda correspondientes al fragmento esperado de 3.084 pb en los clones 1, 3 y 5, ausente en el control negativo.

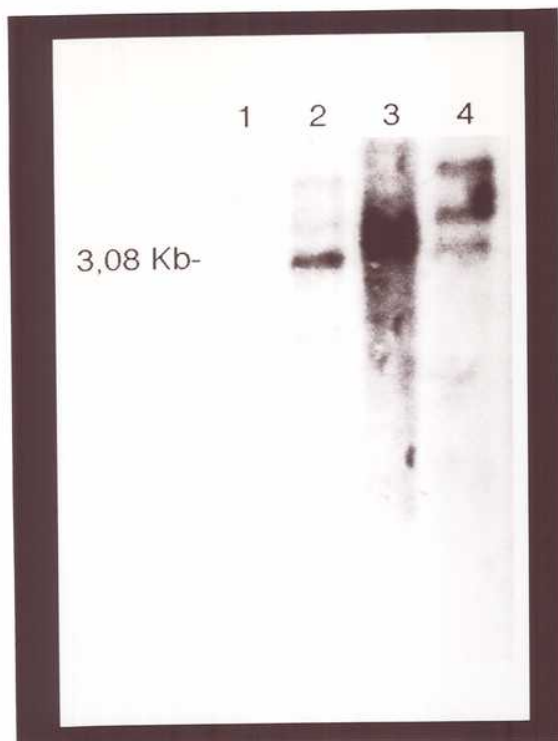


Fig.6.1.1.1: "Southern blot" de las papayas transgénicas. ADN de las papayas fue digerido con Hind III y Eco RI. **1:** ADN de planta de papaya no transgénica (control negativo). **2:** ADN del clon 1. **3:** ADN del clon 3. **4:** ADN del clon 5. La sonda utilizada fue el "cassette" Asr2-GUS obtenido de la digestión de pNM600 con las enzimas Hind III y EcoR I.

6.1.2. Análisis de las plantas de papaya transgénicas.

Para estudiar el comportamiento del transgén en los tres clones y su respuesta al ABA, se midió la actividad de GUS en hojas jóvenes. Las hojas fueron incubadas o no en presencia de 0,5 mg/l de ABA durante 24 hs en medio MSS. Para observar el efecto de la mera incubación, también se incubaron durante 24 hs. sin ABA. Cada hoja fue dividida en dos partes: a una se le hizo ensayo histoquímico de GUS y a la otra, ensayo fluorométrico según se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se observan en la Fig.6.1.2.1.a y b. Los clones 3 y 5 muestran un incremento en la actividad de GUS después de 24 hs. de incubación sin ABA y un incremento adicional con 0,5 mg/l de ABA tanto por el método histoquímico como por el fluorométrico. En el ensayo fluorométrico (Fig.6.1.2.1.b), el clon 1 muestra una actividad basal sin diferencias significativas entre los tratamientos, la cual es

indetectable por el procedimiento histoquímico debido a su escasa sensibilidad. Como valores de referencia, se muestran en la Fig.6.1.2.2 los valores de actividad de GUS en una planta sin transformar (control negativo) y en una planta transformada con el plásmido pBI426 que contiene el gen GUS bajo el doble promotor 35S (control positivo). Estas plantas tuvieron un comportamiento constante independientemente del tratamiento.

Clon	Actividad GUS pmoles 4-MU/mg proteína/minuto
Doble 35S/GUS	4850 ± 865
No transformado	12 ± 1,7

Fig.6.1.2.2: Actividad de GUS en plantas de papaya control. Doble 35S-GUS= planta transformada con el gen GUS bajo el doble promotor 35S del virus del mosaico del coliflor. Los experimentos fueron repetidos dos veces y los errores representan los desvíos estándar

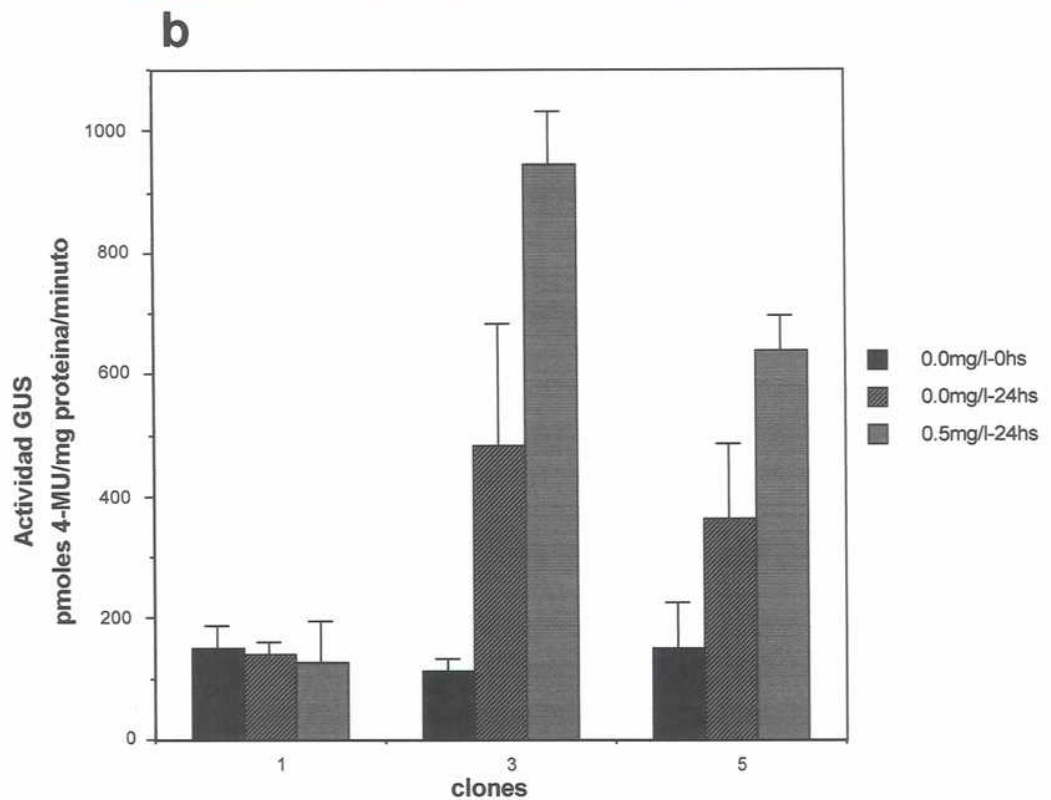
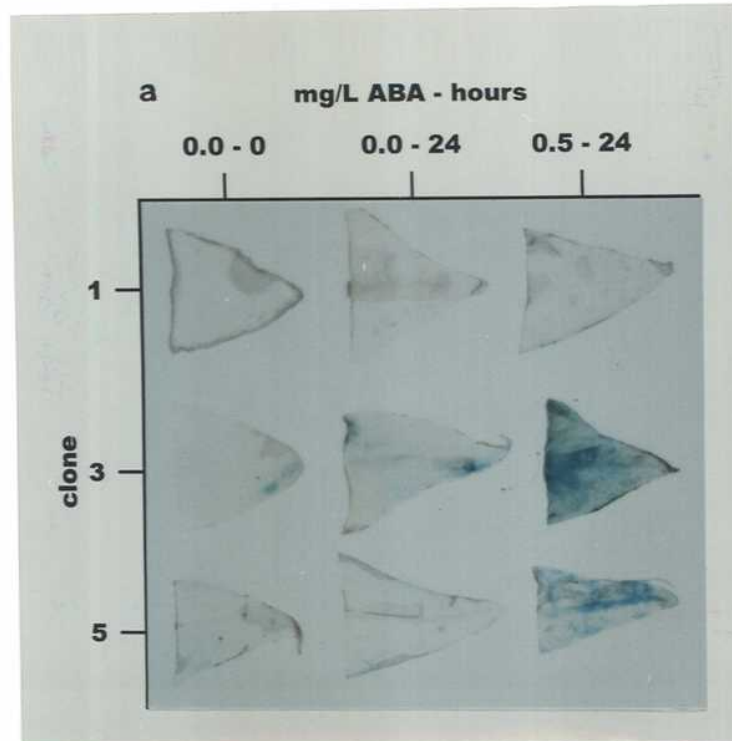


Fig.6.1.2.1: Análisis de la actividad de GUS en tres clones de papaya transgénicos. Ensayos histoquímico (a) y fluorométrico (b) realizados luego de tratamientos con diferentes tiempos de incubación y concentraciones de ABA. Los experimentos fueron repetidos dos veces y las barras representan los desvíos estándar.

Con el fin de conocer las condiciones óptimas de inducción por ABA de la construcción *Asr2-GUS* en papaya, se eligió el clon 3 porque fue el que respondió con niveles más altos de actividad de GUS en el ensayo de la Fig.6.1.2.1. Nuevamente, se realizaron ensayos histoquímico y fluorométrico pero con diferentes tiempos de incubación y concentraciones de ABA. Por el método histoquímico (Fig.6.1.2.3.a), fue posible observar inducción hormonal de la actividad de GUS después de 6 hs de incubación con 50 mg/l de ABA, mientras que con 12 hs la estimulación se detectó en 0,5 mg/l de ABA. Después de 24 y 48 hs. de incubación, la actividad de la enzima fue revelada con aún menor concentración de ABA (0,05 mg/l). En explantos no tratados (0 hs.), se detectó actividad de GUS sólo en nervaduras principales. La medición fluorométrica de estos mismos tratamientos muestra el mismo comportamiento (Fig.6.1.2.3.b). De este último gráfico se desprende la presencia de dos factores disparadores de la inducción de la actividad de GUS: uno, el tiempo de incubación, que se evidencia observando el incremento de la actividad dentro de cada concentración de ABA; y el otro, es el efecto que producen las concentraciones crecientes de ABA para cada tiempo de incubación. La mayor actividad observada fue en presencia de 5 mg/l de ABA después de 12 hs de incubación, resultando en un nivel aproximadamente 3 veces mayor respecto del valor de actividad basal (0 hs. de incubación).

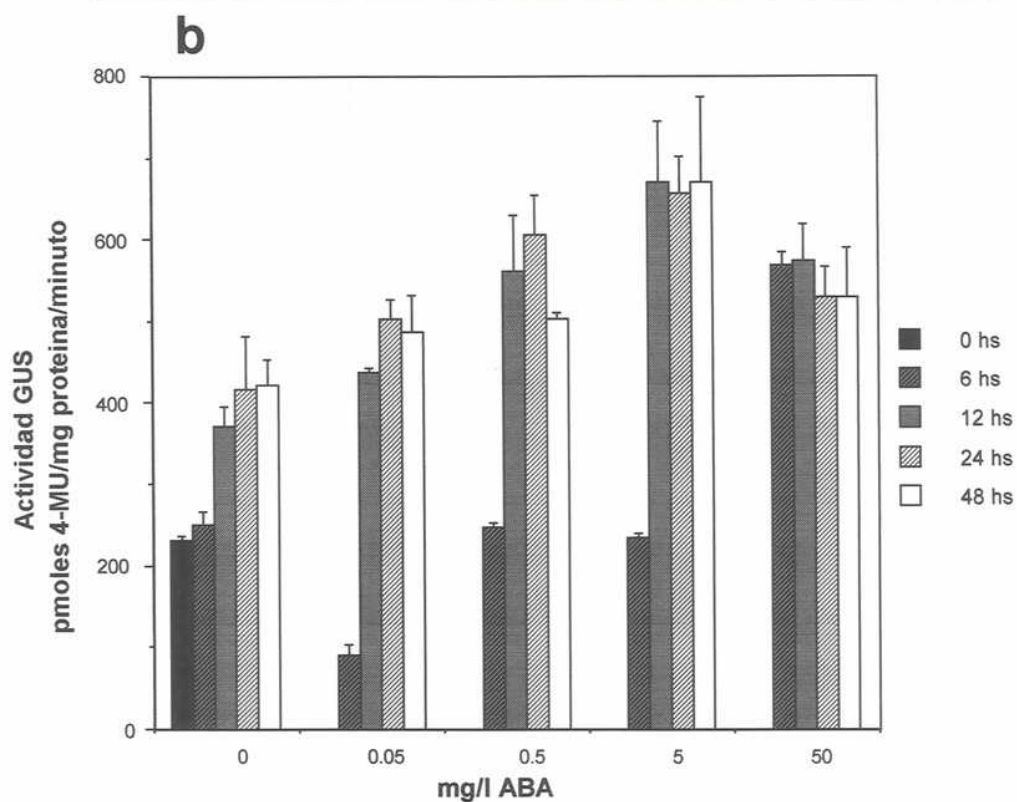
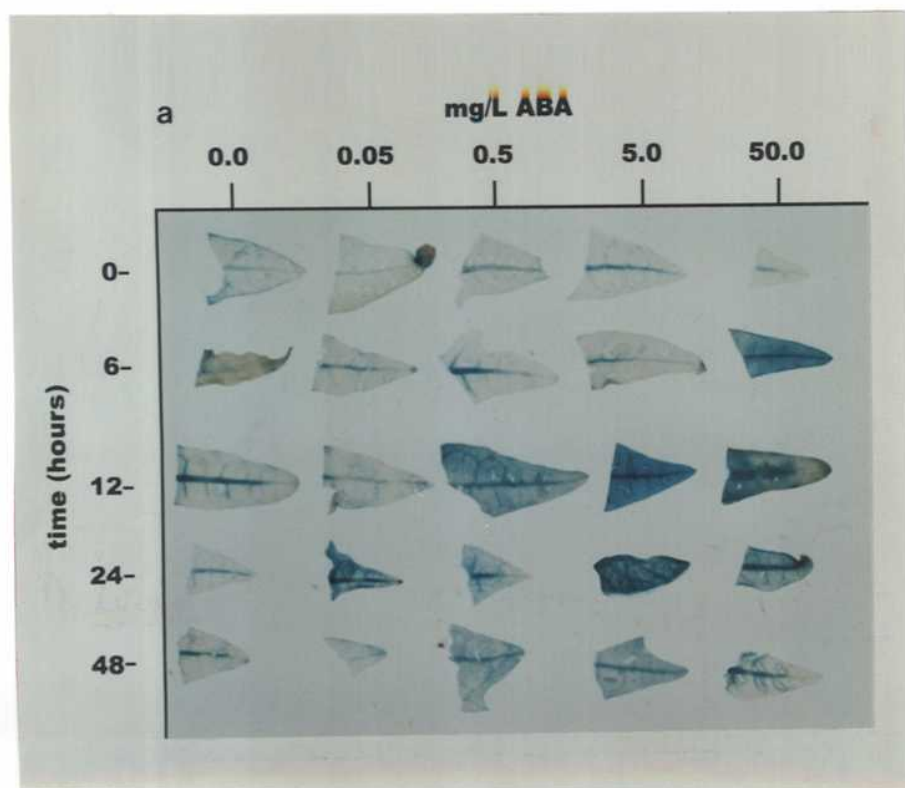


Fig.6.1.2.3: Efecto de los diferentes tiempos de incubación y concentraciones de ABA en la actividad de GUS en el clon 3 de papaya. Ensayos histoquímico (**a**) y fluorométrico (**b**) realizados luego de tratamientos con diferentes tiempos de incubación y concentraciones de ABA. Los experimentos fueron repetidos dos veces y las barras representan los desvíos estándar.

6.2. Transformación vegetal vía *Agrobacterium tumefaciens*.

6.2.1. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pNM600.

Para la posterior transformación vegetal utilizando el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* fue necesario introducir en la bacteria el vector pNM600. Para ello, se prepararon bacterias competentes de la cepa LBA4404 pAL4404 y se transformaron por el método de congelado y descongelado (ver Materiales y Métodos). Se seleccionó con rifampicina (100 $\mu\text{g/ml}$), estreptomycinina (100 $\mu\text{g/ml}$) y kanamicina (100 $\mu\text{g/ml}$). La resistencia a rifampicina está dada por un gen presente en el cromosoma de la cepa LB4404, la resistencia a estreptomycinina reside en el plásmido pAL4404 y la resistencia a kanamicina es aportada por pNM600. Para confirmar la presencia de pNM600 en las agrobacterias, se extrajo ADN plasmídico de 10 colonias y se digirió con las enzimas Hind III y EcoR I. Posteriormente se analizó la digestión en un gel de agarosa (Fig.6.2.1.1) y se observó en las calles 4, 7, 8, 10, 11 y 12 la presencia de las bandas esperadas para el plásmido pNM600.



Fig.6.2.1.1: Chequeo de la transformación de *Agrobacterium*. Gel de agarosa 0,8 % teñido con BrEt. Calle 1: Marcador de peso molecular (1 Kb ladder), calle 2: ADN del plásmido pBI101.2 cortado con Hind III y EcoR I, calles 3 a 12: ADN plasmídico de colonias de *Agrobacterium*. Calles 3, 5, 6 y 9 colonias negativas y calles 4, 7, 8, 10, 11 y 12 colonias positivas.

Con el objeto de corroborar que el "cassette" promotor Asr2-GUS de pNM600 no había sufrido rearrreglos con el paso de *E. coli* a *A. tumefaciens*, se realizó un mapeo por restricción con un posterior "Southern blot". Para esto, se digirieron los plásmidos pBI101.2, pNM600 extraído del clon de *E. coli*, pNM600 extraído de la *A. tumefaciens* y pNM534 con las enzimas EcoR V, Hind III y la combinación de ambas. El patrón de bandas (Fig.6.2.1.2.A) fue el esperado para cada caso. El "Southern blot" (Fig.6.2.1.2.B) se realizó usando como sonda un fragmento obtenido por PCR comprendido entre los nucleótidos 1 y 1224 del clon genómico. En la restricción con EcoR I se observa que la banda de 1,5 Kb de pBI101.2 se incrementa a 2,5 Kb en pNM600 (positiva en Southern) debido a inserción del promotor de Asr2 y con la doble digestión, la banda de 0,6 Kb de pBI101.2 se incrementa a 1,6 para pNM600 (positiva en Southern) por el mismo motivo. Ya que en pNM534 los sitios de corte para EcoR V y Hind III están muy próximos se observa en todos los casos una única banda de 4,2 Kb (positivas en Southern). Los patrones de pNM600 de *E. coli* y de *A. tumefaciens* fueron idénticos. En la autorradiografía se observa ausencia de bandas para el plásmido pBI101.2 debido a la falta de homología con la sonda. Estos resultados confirmaron que pNM600 en la cepa de *Agrobacterium* no había sufrido rearrreglos, por lo cual se prosiguió con la transformación vegetal.

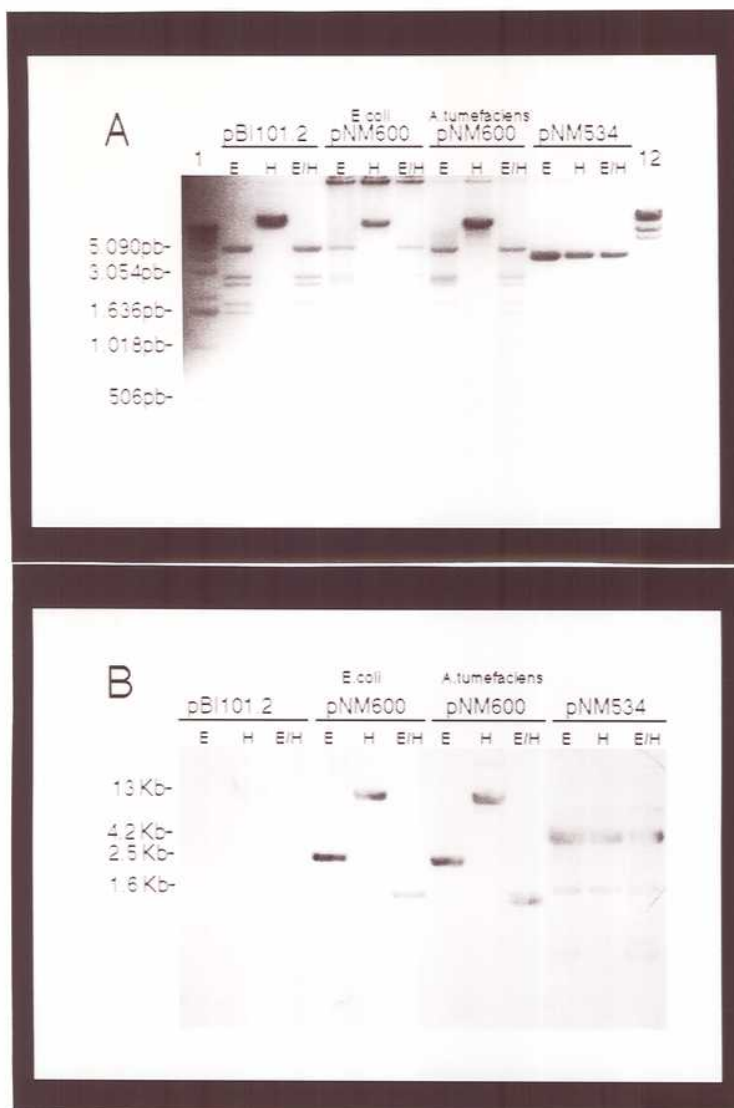


Fig.6.2.1.2: Chequeo del plásmido pNM600 en *A. tumefaciens*. **A.** Gel de agarosa 0,8 % teñido con BrEt. ADN de los plásmidos pBI101.2, pNM600 extraído de *E. coli*, pNM600 extraído de *A. tumefaciens* y pNM534 digerido con Eco RV (E), Hind III (H) y con ambas (E-H). 1.Marcador de peso molecular (1 Kb ladder). 12. Marcador de peso molecular (λ Hind III). **B.** Autorradiografía del "Southern blot" del gel A usando como sonda el fragmento obtenido por PCR, comprendido entre los nucleótidos 1 y 1224 del clon genómico.

6.2.2. Obtención de tabacos y papas transgénicos vía *A. tumefaciens*.

Con la agrobacteria obtenida en 6.2.1. se transformaron tabaco (*Nicotiana tabacum*) y papa (*Solanum tuberosum*) según se detalla en Materiales y Métodos.

De un único experimento de transformación de tabaco, partiendo de 30 explantos de hoja, se obtuvieron 22 clones independientes (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24), que desarrollaron y crecieron en presencia de kanamicina.

Con papa se realizaron dos experimentos de transformación: del primero se aislaron 15 clones (T₂A₁, T₂B₁, T₂C₁, T₂D₁, T₂E₁, T₂E₂, T₂E₃, T₂G₁, T₂G₂, T₂I₁, T₂I₂, T₂I₃, T₂I₅, T₂I₆ y T₂K₂) a partir de 73 explantos de hoja originales y del segundo 31 clones (T₃A₁, T₃A₃, T₃A₄, T₃B₁, T₃C₁, T₃D₁, T₃F₁, T₃E₁, T₃G₁, T₃G₂, T₃K₂, T₃K₃, T₃J₁, T₃I₁, T₃M₁, T₃M₂, T₃M₃, T₃P₁, T₃P₂, T₃Q₁, T₃R₁, T₃R₂, T₃S₂, T₃T₁, T₃T₂, T₃U₂, T₃V₁, T₃V₃, T₃X₁, T₃Y₁ y T₃Z₁) a partir de 98 explantos de hoja originales.

En cada experimento de transformación se incluyeron 10 explantos para realizar cada uno de los siguientes controles:

Control de regeneración, para el cual los explantos no cocultivados con *Agrobacterium* se regeneraron en medio no selectivo. La eficiencia de regeneración fue del 100 %, es decir que todos los explantos regeneraron dando una o más yemas.

Control de toxicidad, en el cual los explantos tratados con las agrobacterias son regenerados en ausencia de medio selectivo. En este caso, la eficiencia coincidió con la anterior, lo cual indica que el tratamiento *per se* no afecta la capacidad regenerativa del explanto.

Control de la capacidad selectiva del marcador utilizado (kanamicina), en el cual los explantos no tratados con las agrobacterias se cultivan en medio selectivo. La eficiencia de regeneración fue de 0 y los explantos se pusieron necróticos al cabo de unas semanas.

Con el objeto de confirmar la presencia de transgén en los individuos transformados, se diseñaron dos oligonucleótidos (ver Materiales y Métodos) para ser usados como "primers" en reacciones de PCR, y así detectar el "cassette" promotor *Asr2-GUS*: el 5' (TRA1) sobre la secuencia del promotor de *Asr2* y el 3' (TRA2) sobre la secuencia codificante del gen de la β -glucuronidasa. Teniendo en cuenta que el producto de amplificación esperado con TRA1 y TRA2 debería tener un tamaño de aproximadamente 1 Kb, se extrajo ADN genómico de cada uno de los clones transformados y de plantas de tabaco o papa no transformadas y se llevaron a

cabo las reacciones de PCR (ver Materiales y Métodos). Además de los oligos TRA1 y TRA2, se utilizó un par de oligos (Its4 y Its5) que amplifican un fragmento de aproximadamente 700 pb del espaciador Its ribosómico, como control interno de PCR.

En la Fig.6.2.2.1 se observa el resultado de la PCR para los tabacos. Los clones 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 16, 17, 18, 19, 21 y 24 presentaron la banda esperada de 1 Kb bien intensa, mientras que en el resto de los clones, se observa el mismo tipo de banda, pero más tenue. Ya que en el control negativo no aparece ninguna banda, se descartaron problemas de contaminación durante la extracción de ADN o en alguno de los reactivos.

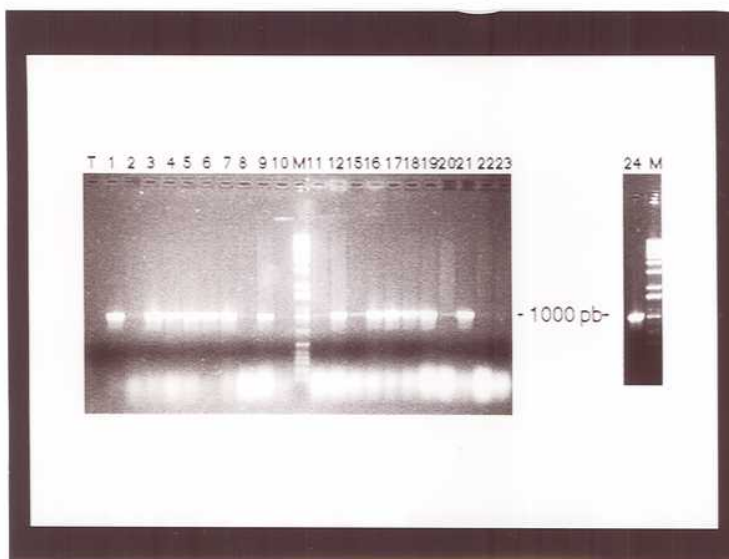


Fig.6.2.2.1: Chequeo de los clones de tabaco por PCR. Gel de agarosa 0,8 % teñido con BrEt. T: PCR con ADN de planta de tabaco sin transformar (control negativo). M: marcador de peso molecular (1 Kb ladder). Las reacciones se realizaron con los oligonucleótidos TRA1 y TRA2. Los números indican el nombre de los clones.

Para corroborar los resultados de la PCR se realizó un "Southern blot" con nuevas preparaciones de ADN de los 22 clones (ver Materiales y Métodos). El ADN fue digerido con las enzimas BamH I y Hind III-EcoR I. Debido a que BamH I no tiene sitios de corte dentro del T-ADN de pNM600, esta digestión permitiría tener idea del número de sitios de inserción en el genoma de cada clon, y la digestión con Hind III-EcoR I liberaría el fragmento de 3.084 pb del "cassette" promotor *Asr2*-GUS en todos los clones transgénicos. Como sonda se usó el fragmento Hind III-EcoR I obtenido a

partir de pNM600. La autorradiografía del "Southern" reveló la presencia de la banda de 3.084 pb sólo en los clones 1, 3, 5, 6, 7, 9, 16, 17, 19, 21 y 24 (la Fig.6.2.2.2 muestra sólo la autorradiografía de los clones 1 al 11), los cuales mostraban bandas fuertes en la PCR, por lo cual las bandas dudosas (tenues) de la PCR pudieron haberse debido a "carry-over" en la siembra del gel. Sin embargo, los tabacos 4, 12 y 18 fueron negativos en el "Southern" a pesar de presentar bandas fuertes en la PCR, lo cual se explica por un problema de sensibilidad del "Southern" (esas calles tuvieron menor cantidad de ADN) o por la existencia de falsos positivos en las reacciones de PCR. Respecto al número de copias, en ninguno de los clones positivos aparece más de una banda clara en la digestión con BamH I que no coincida con bandas de ADN repetitivo, con lo cual parece haber sólo un único sitio de inserción en el genoma por clon. Sólo se mantuvieron los clones que dieron positivos por "Southern blot", el resto fue descartado.

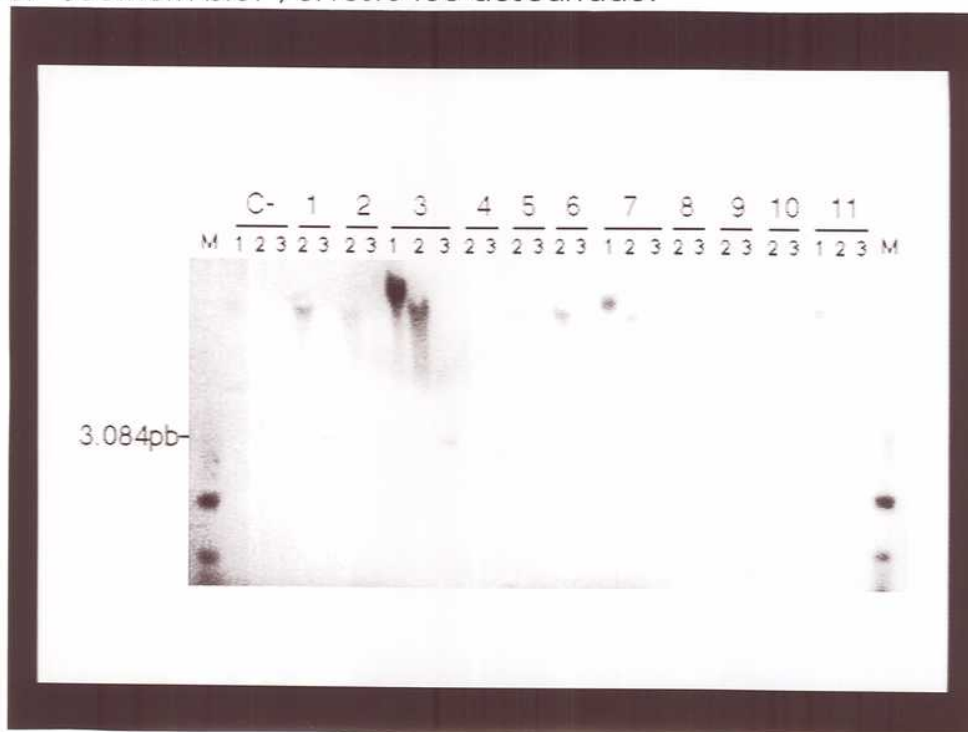


Fig.6.2.2.2: Chequeo de los clones de tabaco por "Southern blot". M: marcador de peso molecular. C-: ADN de tabaco sin transformar. Los números indican el nombre de los clones. En las calles 1 el ADN se sembró sin digerir (control de digestión incompleta), en las calles 2 el ADN fue digerido con BamH I y en las calles 3 el ADN se digirió con Hind III-EcoRI. La sonda utilizada fue el "cassette" Asr2-GUS obtenido de la digestión de pNM600 con las enzimas Hind III y EcoR I.

En el chequeo por PCR de los 46 clones de papa, sólo T₂A₁ y T₃P₁ resultaron negativos. En la Fig. 6.2.2.3 se muestra el resultado para los 15 clones del primer experimento de transformación.

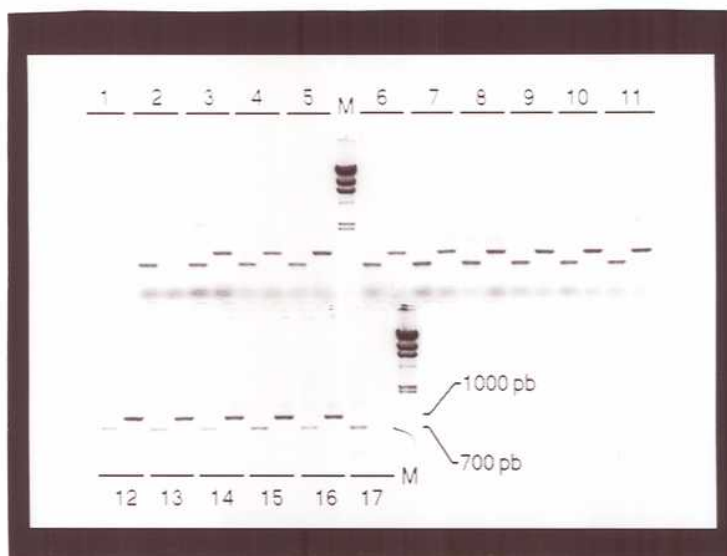


Fig.6.2.2.3: Chequeo de los clones de papa por PCR. Gel de agarosa 0,8 % teñido con BrEt. El ADN usado como templado en cada caso fue de: 1. PCR sin ADN (control de contaminación de reactivos), 2. T₂A₁, 3. T₂B₁, 4. T₂C₁, 5. T₂C₁, 6. T₂E₁, 7. T₂E₂, 8. T₂E₃, 9. T₂G₁, 10. T₂G₂, 11. T₂I₁, 12. T₂I₂, 13. T₂I₃, 14. T₂I₅, 15. T₂I₆, 16. T₂K₂, 17. planta de papa sin transformar (control negativo). La PCR se realizó en las primeras calles de cada clon con los oligos lts4 e lts5, y en las segundas con los TRA1 y TRA2. M: marcador de peso molecular (λ Hind III).

La confirmación por "Southern blot" de la presencia del "cassette" *Asr2-GUS* en las papas, sólo se realizó en aquellas en las que se detectó actividad de β -glucuronidasa, ya que la obtención de ADN suficiente a partir de cada uno de los 46 clones hubiera implicado el manejo de gran cantidad de material *in vitro*. ADN de cada una de las 9 plantas fue digerido con las enzimas Hind III y Eco RI, que liberan el fragmento promotor *Asr2-GUS* y como sonda se utilizó el mismo fragmento

obtenido de la digestión de pNM600. En la Fig.6.2.2.4 se muestra la autorradiografía del "Southern" de los clones seleccionados, los cuales presentan la banda esperada de 3,084 Kb. Las bandas del Southern que no coinciden con la banda esperada se deben a hibridación inespecífica sobre regiones de ADN repetitivo, ya que coinciden en los diferentes clones; o en las calles 4 (T₃X₁) y 7 (T₃R₂) a digestión parcial, por sólo una de las dos enzimas, indicando la probable presencia de más de un sitio de inserción del transgén.



Fig.6.2.2.4: Chequeo de los clones de papa por "Southern blot". ADN de cada uno de los clones fue digerido con Hind III y Eco RI. 1. planta control sin transformar, 2. T2C1, 3.T2D1, 4. T3X1, 5. T2G2, 6. T2G1, 7. T3R2, 8. T3C1, 9. T3D1 y 10. T3V3. La sonda utilizada fue el "cassette" Asr2-GUS obtenido de la digestión de pNM600 con las enzimas Hind III y EcoR I.

6.2.3. Estudio de la expresión de β -glucuronidasa en los tabacos y papas transgénicos.

Trozos de hojas jóvenes de aproximadamente 0,5 X 0,5 cm de cada uno de los clones transgénicos de papa o tabaco y de plantas no transformadas se incubaron en medio MSS en presencia o no de ABA 0,1 mM durante 18 hs. Se eligió esta concentración de ABA y este tiempo de incubación en base a los resultados obtenidos con el clon 3 de papaya (sección 6.1.2 de resultados). Posteriormente, se obtuvieron extractos proteicos de todas las muestras y se midió la actividad de GUS por el método enzimático. Se realizó un primer análisis de todas las plantas y se calculó la pendiente de la recta de regresión de actividad por mg de proteína vs tiempo. En base a este valor, se seleccionaron la plantas cuyo nivel de actividad fuera significativamente mayor al de las plantas control. A las plantas seleccionadas se les realizó una segunda medición; estos últimos resultados coincidieron con los del primer análisis y son los que se muestran en los gráficos descriptos a continuación.

De los 11 clones transgénicos de tabaco, sólo cuatro presentaron actividad de β -glucuronidasa, cuyos valores se grafican en la Fig.6.2.3.1. Estos cuatro clones dieron valores absolutos de actividad variables, pero en todos los casos se observa un aumento luego de 18 hs de incubación con ABA, que alcanza hasta el doble de la actividad basal en el caso de los clones 1 y 24.

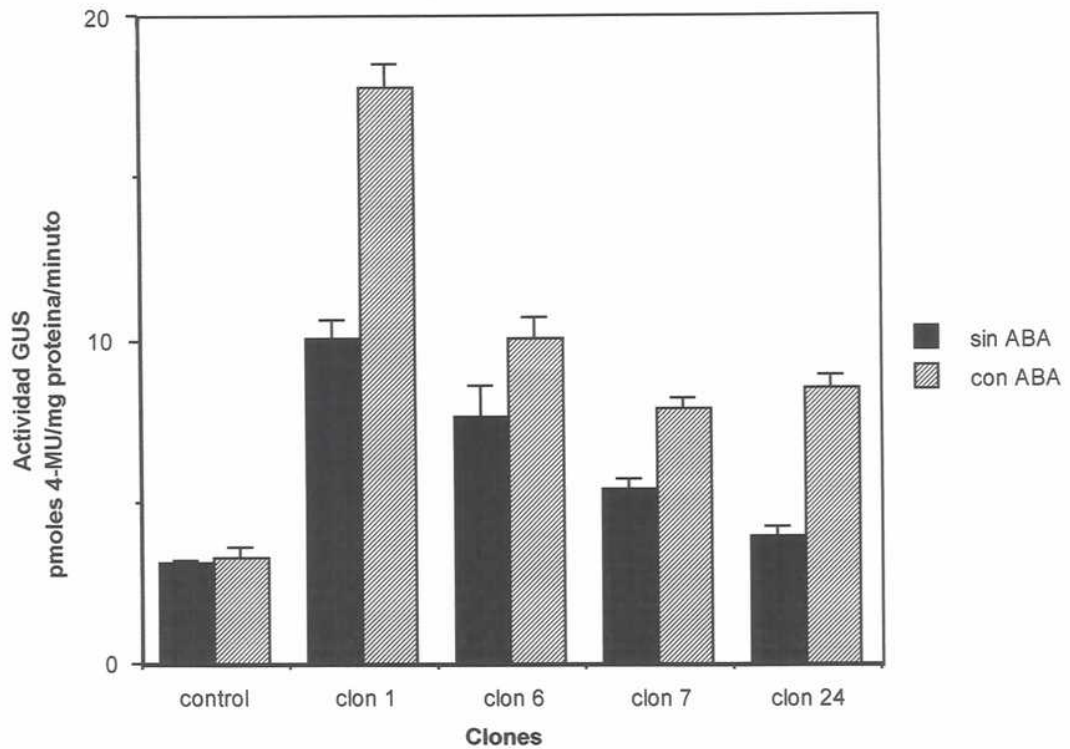
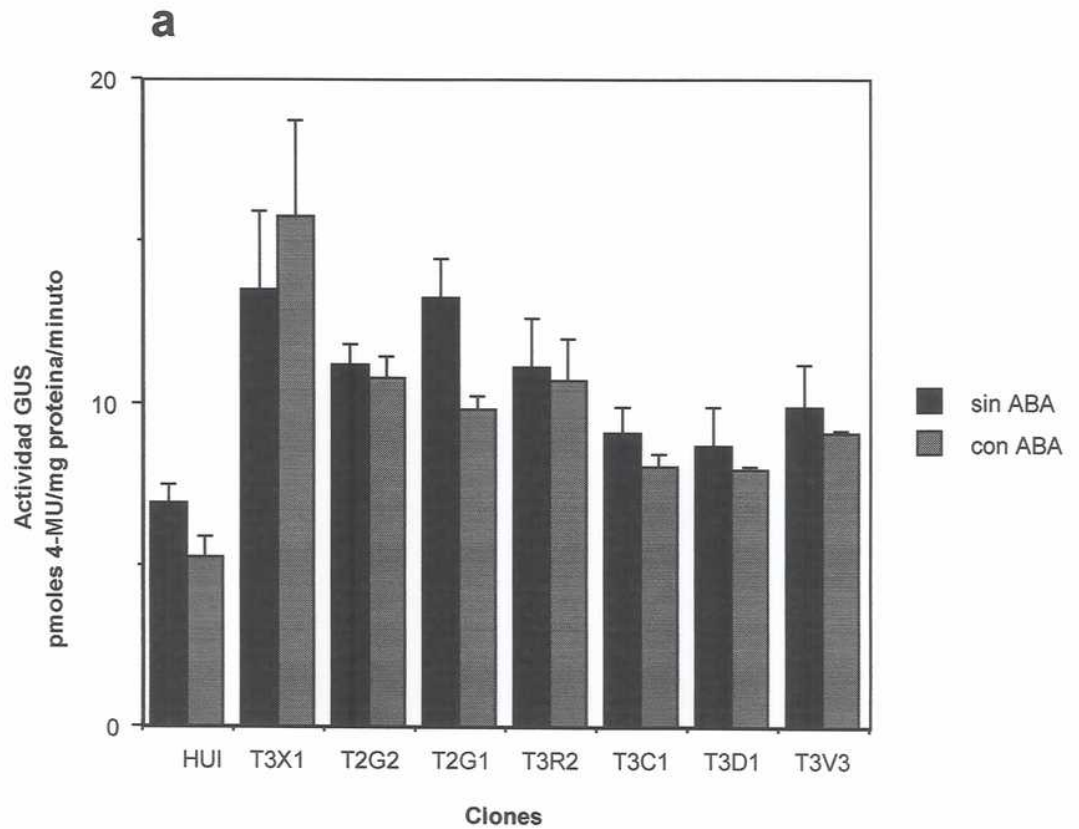


Fig.6.2.3.1: Análisis de la actividad de GUS en cuatro clones de tabacos transgénicos. Ensayo fluorométrico realizado luego de 18 hs de incubación en presencia o no de 0,1 mM de ABA. Se incluyen los valores de actividad de una planta sin transformar (control). Los desvíos corresponden a la suma de los errores respecto de la recta de regresión de las mediciones realizadas para cada tiempo (0, 60 y 120 minutos).

En el caso de las papas, de los 44 clones positivos por PCR, sólo 9 mostraron niveles de actividad significativamente diferentes al del control sin transformar. La presencia del transgén fue corroborada por "Southern" (Fig.6.2.2.4). La variabilidad en los niveles de expresión fue mucho mayor que la observada en tabaco y entonces, se decidió clasificar las nueve plantas en tres grupos para facilitar la visualización gráfica de los resultados: un grupo de siete plantas con actividades bajas (Fig.6.2.3.2.a), T₂C₁ con actividad media (Fig.6.2.3.2.b) y T₂D₁ que presentó, sorprendentemente, una actividad comparable con la de una planta transgénica con 35S-GUS, entre 10 y 20 veces mayor que la observada para las plantas del primer grupo.

A diferencia de los resultados obtenidos en papaya y tabaco, en las condiciones ensayadas, el promotor de *Asr2* en papa no respondió a la presencia de ABA y las plantas exhibieron niveles constitutivos de actividad de GUS.



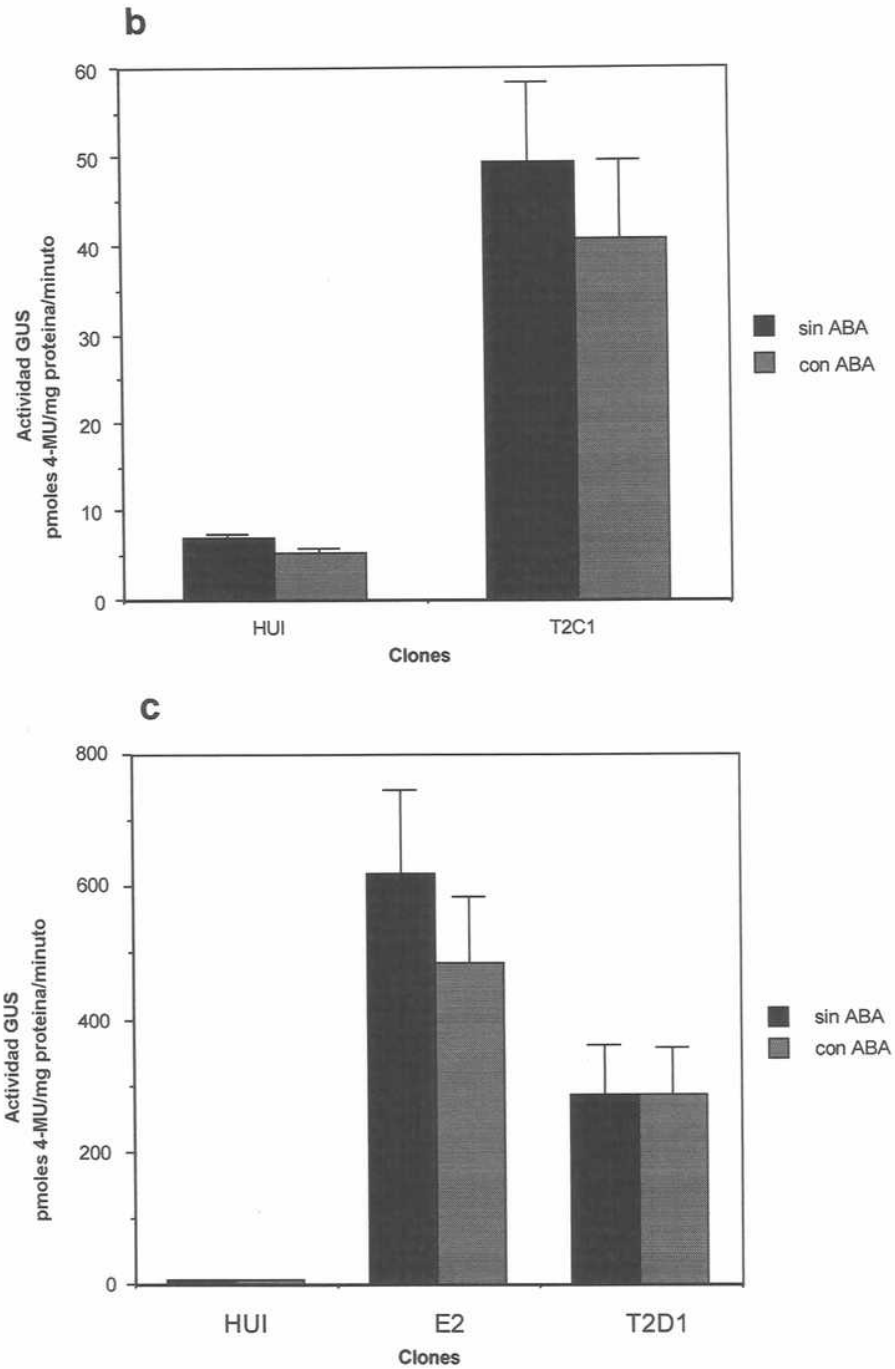


Fig.6.2.3.2: Análisis de la actividad de GUS en clones de papa transgénicos. Ensayo fluorométrico realizado luego de 18 hs de incubación en presencia o no de 0,1 mM de ABA. Los clones están agrupados de acuerdo a sus niveles de expresión: bajo (**a**), medio (**b**) y alto (**c**). Se incluyen los valores de actividad de una planta sin transformar (HUI) y de una planta transformada con 35S-GUS (E2). Los desvíos corresponden a la suma de los errores respecto de la recta de regresión de las mediciones realizadas para cada tiempo (0, 60 y 120 minutos).

DISCUSSION

En este trabajo se clonó y secuenció el gen *Asr2* de tomate, homólogo al clon de cADN *Asr1* (*ABA*, "*stress*", "*ripening*") previamente clonado y caracterizado (Iusem et al., 1993). *Asr1* es inducido por ABA, estrés hídrico y maduración, tal como se describió en la Introducción. La secuencia genómica de *Asr2* reveló la presencia de un marco abierto de lectura de 456 nucleótidos interrumpido por un intrón de 111 bases, lo cual resulta en una proteína de 114 aminoácidos con predominio de los básicos histidina y lisina. Sobre la región 5' se encontraron cuatro "boxes" TATA en diferentes posiciones, alguna de las cuales estaría involucrada en la determinación del sitio de iniciación de la transcripción llevada a cabo por la RNA polimerasa II. El elemento TATA más cercano a la posición consenso -30 es el ubicado en -39/-35. Por otro lado, se han localizado varias "boxes" CAAT en las dos orientaciones posibles seguramente implicadas en conferir eficiencia al proceso de transcripción del gen *Asr2*. Dada la ubicuidad de este elemento, es imposible asignar cuál es blanco de los factores de transcripción en este caso, para lo cual sería necesario recurrir a experimentos de mutagénesis dirigida. Además, la determinación del sitio de inicio de la transcripción permitió acotar la posible región promotora. Con respecto al análisis de la secuencia sobre la región 3', se han podido identificar dos señales de poliadenilación en localizaciones consistentes con el tamaño del mRNA observado mediante "Northern".

El análisis de la secuencia de *Asr2* posibilitó, por un lado, la comparación detallada con otros genes y por otro lado, el diseño de la estrategia de clonado para la obtención de un vector conteniendo la probable región promotora de *Asr2* fusionada río arriba del gen indicador de la β -glucuronidasa. Esta última construcción fue concebida para los experimentos de transformación genética de sistemas vegetales destinados al estudio de la funcionalidad del promotor.

Desde un análisis estructural, *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* comparten una alta homología en sus regiones codificantes, mientras que sobre las regiones promotoras y 5' y 3' no codificantes, la homología es mucho menor. Esta observación llevó a pensar en la

existencia de una familia multigénica más que a la posibilidad de que estos tres clones fuesen formas alélicas del mismo gen. Dos evidencias descartaron la segunda alternativa. Por un lado, en los experimentos de PCR utilizando NILs ("Near Isogenic Lines"), se detectó la presencia de los tres genes en los individuos homocigotas y en el heterocigota. Por otro lado, se observó hibridación diferencial en los "Southern blots" realizados con ADN de los mismos individuos dependiendo de cuál sonda haya sido utilizada, mostrando al menos una banda distintiva para cada sonda: de 4,8 Kb para *Asr1*, de 5,6 Kb para *Asr2* 3' y de 4,4 Kb para *Asr3* (Fig.4.2.2).

Del análisis de RFLP, se concluyó que estos genes cosegregan en el cromosoma 4 de tomate formando un agrupamiento de genes o "cluster", lo cual, sumado a la gran homología que comparten, permitió establecer que forman una familia de genes. Este hecho sugiere que los tres genes han evolucionado a partir de la duplicación de un único gen ancestral y posteriormente divergieron acumulando diferentes mutaciones (Lewin, 1994a).

Una observación interesante es la coincidencia entre los porcentajes de similitud entre *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* y los patrones de bandas obtenidos por RFLP. En efecto, por un lado, *Asr2* comparte un mayor porcentaje de similitud con *Asr1* y *Asr3* (del 79,1 % y 86,4 % respectivamente) que el que comparten estos dos últimos entre sí (76,2 %), y por otro, el patrón de bandas de este gen contiene al de los otros dos. Esto permite especular que *Asr2* es el gen ancestral, a partir del cual, por duplicación, surgieron *Asr1* y *Asr3*.

¿Cuál es el sentido biológico de la existencia de esta familia multigénica?. Una respuesta a esta pregunta es que *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* se expresarían diferencialmente presentando una especificidad temporal y/o tisular (van Zee et al., 1995). En este sentido, los análisis por "Northern blot", utilizando sondas para cada uno de los genes, no resultan demasiado informativos a causa de la alta homología que comparten, la cual conduciría a errores debido a la hibridación cruzada, ya que los mensajeros poseen tamaños similares. Por lo tanto, el estudio de los correspondientes promotores utilizando genes indicadores se convierte en la mejor alternativa para el

estudio de los patrones de expresión de estos genes individualmente, estrategia utilizada en el presente trabajo.

La respuesta del tejido vegetativo o embrionario al estrés hídrico así como la maduración del fruto son caracteres multigénicos. La organización en "cluster" aseguraría la cosegregación de las formas alélicas activas de los genes, lo cual significaría, si la hipótesis de la especificidad de tejido es verdadera, una mayor adaptación de toda la planta a condiciones de estrés.

Son varios los genes de tomate que se conocen sólo por su fenotipo y que se han mapeado. Por ejemplo, el *Tm-2a*, que confiere resistencia al virus del mosaico del tabaco (Young et al., 1988); el *Pto*, responsable de la resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Martin et al., 1993a); y el locus de supresión lateral (Schumacher et al., 1995). El gen *Pto* fue posteriormente aislado por clonado posicional (Martin et al., 1993b). Por el contrario, en este trabajo se mapearon tres genes previamente clonados involucrados en la respuesta al estrés hídrico y en la maduración pero cuya función biológica es aún desconocida.

Con respecto a *Asr2* y a la funcionalidad de su promotor, los experimentos de expresión transitoria arrojan resultados valiosos. En efecto, la detección de actividad de β -glucuronidasa en callos embriogénicos y hojas de papaya bombardeados con la construcción *Asr2-GUS* (pNM600) confirmó que la región 5' del gen *Asr2* posee actividad de promotor (Fig.5.2.1). Es digno de destacar que la respuesta al ABA observada en hoja demuestra que el promotor es además inducible por esta hormona. Los resultados de estos experimentos fueron consistentes con los obtenidos por Amitai et al. (1995), aunque estos últimos no permiten discriminar entre los miembros de la familia *Asr* a pesar de que los autores atribuyen, sin fundamentos concluyentes, la observada expresión génica a *Asr1*.

Los niveles altos de expresión, en callos embriogénicos, independientes del tratamiento con ABA, pueden deberse al alto contenido de ABA endógeno como se ha descrito para embriones somáticos de zanahoria (Lynn Zimmerman et al., 1993).

A pesar de que los embriones somáticos no sufren los típicos procesos de desecación y dormición de los cigóticos, de todas maneras sintetizan y acumulan ABA y expresan una serie de genes inducibles por ABA asociados a la tolerancia a la desecación (por ejemplo los *lea*, Wurtele, et al., 1993).

Habiendo corroborado la actividad del promotor de *Asr2* en los explantos de papaya, se decidió producir plantas transgénicas de papaya, tabaco y papa, con el objetivo de estudiar su comportamiento en sistemas heterólogos de expresión estable.

Referente al chequeo de plantas transformadas, el uso de la técnica de PCR resultó útil para una corroboración preliminar de la existencia del transgén, ya que es simple, rápida y se requiere muy poco material vegetal. Sin embargo, es importante resaltar que, así como ocurrió con los tabacos en este trabajo, otros autores también observan falsos positivos, por lo cual el "Southern blot" se constituye en una herramienta más confiable para evaluar el carácter transgénico de plantas transformadas.

La primera observación interesante al medir la actividad de GUS en los clones transgénicos de papaya fue el aumento que experimentaron los explantos de hoja de los clones 3 y 5 luego de 24 hs de incubación en ausencia de ABA (Fig.6.1.2.1). Esto significa, que el estrés implicado en la disección de los mismos (heridas y/o deshidratación) fue capaz de activar al promotor de *Asr2*.

Un resultado similar obtuvieron Michel et al. (1994) analizando el comportamiento de un promotor de *Craterostigma* inducible por ABA, fusionado a GUS, en plantas transgénicas de la misma especie. Estos autores observaron que los niveles de expresión en hoja post-rehidratación no disminuyeron respecto de los de las sometidas sólo a estrés hídrico como se hubiera esperado, atribuyendo tal efecto a las heridas causadas durante el tratamiento de rehidratación.

Una explicación probable para este comportamiento observado en hojas de papaya transgénica es que en respuesta al estrés sufrido durante la disección, los explantos pudieron haber sintetizado ABA (Pena-Cortés et al., 1990), el cual habría inducido al promotor *Asr2*. En este caso, es posible que el incremento de la actividad de GUS no haya alcanzado los niveles observados en presencia de ABA exógeno, simplemente por la baja concentración de la hormona endógena debido a lo efímero del estímulo (una vez diseccionados los explantos enseguida son colocados sobre medio de cultivo y se recupera la turgencia). Es oportuno aclarar que bajo condiciones de estrés hídrico, el aporte de ABA sintetizado y translocado desde las raíces es importante en la respuesta molecular de la hoja en la planta entera, aporte inexistente en los experimentos con hojas disectadas.

Por otro lado, varios autores han descrito genes que responden al estrés hídrico pero no al ABA exógeno (Guerrero et al., 1990; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992), sugiriendo la existencia de una ruta de inducción independiente a esta hormona. Por ejemplo, Gosti et al. (1995) estudiando cuatro clones de cADN de *Arabidopsis thaliana* regulados por desecación, observaron que los clones *AtDi8*, *AtDi19* y *AtDi21* aumentaban en condiciones de estrés hídrico; por el contrario, la expresión de *AtDr4* se inhibía bajo el mismo tratamiento. *AtDi8* y *AtDi21* respondían a la aplicación de ABA exógeno, mientras que los niveles de *AtDi19* y *AtDr4* no se veían afectados por el tratamiento con la hormona. Estas evidencias, sumadas a resultados obtenidos a partir de experimentos con mutantes que no sintetizan ABA (*aba-1*) o insensibles a la hormona (*abi1* y *abi2*), permitieron proponer que la inducción de genes en respuesta al estímulo ambiental (en este caso estrés hídrico) está mediado por más de una ruta. La coordinación entre las respuestas moleculares y el ABA sería requerida sólo en alguna/s de las vías, existiendo otras absolutamente independientes de esta hormona. alguna de estas últimas podría ser la responsable de generar la inducción observada en papaya en ausencia de ABA. Por lo tanto, es posible que el gen *Asr2* se induzca en respuesta a diferentes situaciones fisiológicas y

de estrés ambiental a través de diferentes vías, una de las cuales involucre al ABA (estrés hídrico y maduración) y otra (heridas) independiente de esta hormona.

El estudio de la funcionalidad de promotores se realiza normalmente en sistemas heterólogos debido a la simplicidad del manejo de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* para la obtención de protoplastos y plantas transgénicas. En este sentido, es importante no perder de vista la posibilidad de que los patrones de expresión observados no reflejen necesariamente los de la contraparte homóloga, ya que, en el caso de este trabajo, la maquinaria transcripcional de papaya, tabaco o papa bien podría no reconocer a todos los elementos regulatorios presentes en el ADN que controlan la transcripción de *Asr2* en tomate.

Efectivamente, se observaron diferentes comportamientos en cada caso, mientras que en papaya y tabaco la aplicación de ABA exógeno produjo un incremento en la actividad de β -glucuronidasa de hasta 3 veces la actividad basal luego de 12 hs de incubación; sin embargo, en papa, el promotor de *Asr2* no mostró modulación por ABA.

En este contexto, Yamaguchi-Shinozaki et al. (1990) estudiaron plantas de tabaco transgénicas con fusiones traduccionales entre los genes *rab-16A* o *rab-16B* de arroz y GUS. Tales genes endógenos de arroz son inducibles por ABA y por estrés hídrico en diferentes órganos; sin embargo, los tabacos transgénicos *rab-16A/GUS* no presentaron actividad GUS en ningún tejido. Por otro lado, las plantas *rab-16B/GUS* sólo mostraron actividad de la enzima en semillas, más precisamente en el embrión, no observándose respuesta alguna ante la aplicación de ABA exógeno, a pesar de que se corroboró la incorporación de la hormona. Estos resultados mostraron claramente que los patrones de expresión en las plantas transgénicas (tabaco) no reflejaron los observados en el sistema homólogo. Del mismo modo, los promotores de los genes *Em* de trigo (Marcotte et al., 1989) o CDeT27-45 (Michel et al., 1994),

promovieron expresión de GUS en tabacos transgénicos sólo en embriones y no en tejido vegetativo.

Otra disimilitud entre las plantas transgénicas de las tres especies estudiadas fue que los valores absolutos de expresión en papaya fueron muy superiores a los observados en papa o tabaco y comparables a los valores de la papa control positivo (35S-GUS). Respecto a esto último, es importante recordar que papaya se transformó vía cañón génico, y papa y tabaco vía *A. tumefaciens*, lo cuál podría tener alguna implicancia en los diferentes niveles de expresión del transgén. Sin embargo, no es necesario invocar esa variable, ya que varios trabajos muestran diferencias notables -de hasta dos órdenes de magnitud- en los valores absolutos de expresión de una misma construcción en los mismos tejidos de plantas transgénicas de dos especies diferentes transformadas mediante idéntico procedimiento (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993; Michel et al., 1994). La causa de este fenómeno es desconocida, pero probablemente involucre mecanismos que requieren una fina especificidad en el reconocimiento entre las secuencias regulatorias introducidas y factores proteicos de transcripción propios del individuo transformado.

Mientras que muchos promotores y secuencias regulatorias han sido estudiados detalladamente e incluso chequeados en sistemas de expresión transitoria, no es posible aún controlar importantes aspectos experimentales inherentes a la expresión de transgenes debido a la poderosa influencia ejercida por el sitio de integración en el genoma. En efecto, el evento de integración, por ocurrir en un sitio al azar, no sólo establece la naturaleza de las secuencias vecinas que pueden alterar el comportamiento funcional del transgén, sino que por sobre todo, determina el grado de empaquetamiento que adquirirá de acuerdo a la estructura de la cromatina en dicha región, y por lo tanto su accesibilidad a la maquinaria transcripcional y de procesamiento (Meyer, 1995). Otro factor que influye en la expresión de un transgén es su silenciamiento por metilación, que generalmente se

correlaciona positivamente con el número de copias del mismo, habiéndose propuesto varios modelos para explicar el mecanismo por el cual aquella se produce (Meyer, 1995).

Este fenómeno se ve claramente analizando los diferentes clones de papa obtenidos en este trabajo: de los 44 clones positivos por PCR, sólo 9 presentaron actividad de GUS. Además, observando los diferentes gráficos (**a**, **b**, **c**) de la Fig.6.2.3.2, resulta notable la diferencia en los valores de actividad en cada uno de los grupos. Por ejemplo, el clon T₂D₁ presenta niveles de actividad comparables a los de la planta control positivo (35S-GUS). De esto último se infiere que la inserción del "cassette" Asr2-GUS se produjo próxima a un "enhancer" transcripcional, ya que en términos fisiológicos, resulta poco probable que los niveles de expresión a partir de un promotor endógeno sean similares a los observados a partir de uno viral fuerte como es el 35S.

En otras palabras, el contexto nucleico es un determinante crucial para una eficiente expresión genética y permite explicar las diferencias en los niveles de actividad de β -glucuronidasa observados en este trabajo entre los diferentes clones transgénicos de papaya, tabaco o papa.

Teniendo en cuenta estos argumentos, se puede comprender por qué, en todos los trabajos donde se estudia el comportamiento de promotores, aparecen datos sólo de unas pocas plantas transgénicas a pesar de que cuando se transforma una especie vegetal se obtienen muchos más clones independientes.

Un ejemplo dramático en tal sentido lo aportaron Guo et al. (1994) quienes estudiaron el comportamiento del promotor del gen de una proteína HRGP de arroz (glicoproteína rica en hidroxiprolina) también fusionado al gen indicador GUS. Estos autores observaron, en ensayos de expresión en protoplastos de hoja de tabaco, que a medida que la longitud del promotor era menor, la actividad de la enzima decrecía; sin embargo, al analizar las plantas transgénicas de tabaco que llevaban las mismas construcciones, no pudieron detectar actividad alguna. La detección de expresión de GUS en sistemas de expresión transitoria y la ausencia de actividad en

sistemas de transformación estables, utilizando la misma construcción y la misma especie, es una observación frecuente que puede estar también relacionada con el sitio de inserción del transgén.

Basándose en las consideraciones previamente tratadas, resulta importante explicitar que, como sistema de estudio de promotores, la conveniencia del uso de plantas transgénicas es discutible. En este sentido, resulta más consistente la utilización de sistemas de expresión transitoria, tales como protoplastos o cañón génico, este último para estudios de especificidad tisular.

Recientemente, con el objetivo de poder controlar mejor la expresión de transgenes, se ha centrado la atención en las secuencias de unión al esqueleto proteico de los cromosomas (MARs o SARs). Se propone que las secuencias de ADN flanqueadas por MARs mantienen un nivel de empaquetamiento menor, formando un dominio de activa transcripción (Spiker y Thompson, 1996). Mlynárová et al. (1995) mostraron que la actividad del gen indicador GUS aumentaba cuatro veces al flanquearlo deliberadamente con secuencias MAR (aisladas de pollo), resultando mínima la variación de los niveles de expresión entre los diferentes clones transformados.

Varios autores han observado que los niveles de expresión de genes indicadores (GUS o CAT) fusionado traduccionalmente a genes inducibles por ABA son mayores luego de períodos de estrés hídrico que en respuesta a la aplicación de ABA exógeno (Seffens et al., 1990; Vilardell et al., 1991; Imai et al., 1995), a pesar de que las cantidades de ABA en las hojas son iguales. Por ejemplo, para el caso del promotor del gen *rab17* de maíz la actividad de CAT se duplica en presencia de ABA exógeno mientras que aumenta 10 veces luego de someter a estrés hídrico a las plantas de tabaco transgénicas. Estudios de localización intracelular de la hormona indican que el ABA exógeno una vez incorporado a la célula, no se compartimentaliza de la misma manera que el ABA endógeno (Bray y Zeevaart, 1986). Una hipótesis alternativa para explicar esta observación es que la sensibilidad

al ABA aumenta cuando las plantas son sometidas a déficit de agua (Imai et al., 1995). Estos resultados permiten especular que probablemente los incrementos de actividad de GUS que mostraron las hojas de papaya y tabaco (en respuesta a ABA) serían mucho mayores si se sometieran las plantas a tratamientos de estrés.

Es oportuno, en este punto, discutir sobre los elementos estructurales del promotor de *Asr2* que serían responsables de la observada respuesta a ABA. En particular, sobre la región 5' del gen se encontraron las secuencias consenso "G-box" (Guilman et al., 1990) y "CE1-like" (Shen y Ho, 1995) presentes en varios genes que responden a ABA, las cuales podrían participar en la respuesta del promotor de *Asr2* a la hormona, observada en papaya y tabaco. Además, se localizaron tres secuencias consenso presentes en promotores de genes de histonas: "HEX box" (Osley, 1991), "GATCC" (Hentschel y Birnstiel, 1981) y "AC box" (Dalton y Wells, 1988); ésto hace suponer un similar patrón de expresión entre *Asr2* y estos genes. Una evidencia que asocia a las histonas con el ABA y el estrés hídrico la provee el gen de una histona (*His1*) de *L.pennellii* (Wei y O'Connell, 1996), el cual es inducido bajo condiciones de sequedad.

A pesar de no haberse encontrado homología sobre las regiones codificantes entre *Asr2* y factores de transcripción ya descritos, no se descarta la posibilidad de que las proteínas codificadas por la familia génica *Asr* puedan tener función de moduladores de la transcripción, ya que las estructuras secundarias de ASR1 y ASR2 se ajustan al modelo de "helix-loop-helix", en tal caso existirían como dímeros. Por otra parte, se demostró que ASR1 se encuentra mayoritariamente en núcleo (Iusem et al., 1993). No se hallaron, ni en ASR1 ni en ASR2, motivos de localización nuclear previamente descritos; de todas maneras, no hay evidencias de que existan secuencias de localización nuclear conservadas (Lewin, 1994b). Aparentemente, la existencia de regiones básicas en el polipéptido y la forma de la proteína serían los determinantes para fijar el destino final nuclear (Lewin, 1994b). En este sentido, tanto ASR1 como ASR2 poseen varias zonas ricas en lisina alguna de las cuales podría servir

de etiqueta para el pasaje de estas proteínas al interior del núcleo de la célula, una vez sintetizadas en ribosomas citoplasmáticos.

Es importante tener en cuenta, que se ha clonado un fragmento de 1180 pb de la región promotora, de las cuales sólo 980 pb más 59 de la región 5' no codificante se incluyeron en la construcción pNM600 usada para estudiar la funcionalidad del promotor. Si bien la mayoría de los trabajos publicados utilizan fragmentos promotores de entre 400 y 1000 pb (Marcotte et al., 1988; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1990; Michel et al., 1994; Guo et al., 1994) y son raros los casos donde se utilizan fragmentos mayores (Imai et al., 1995), no se debe descartar la posibilidad de que otras secuencias regulatorias río arriba, relevantes funcionalmente, estén ausentes en la construcción.

El hallazgo del fragmento sobre la región 3' no codificante de *Asr2* que presenta homología con un intrón de la poligalacturonasa y la detección de homología entre ambos promotores, indicaría la presencia de elementos compartidos involucrados en la regulación de la expresión genética específica de fruto. Apoya esta idea el hecho de que durante la maduración de fruto, se expresan tanto la poligalacturonasa (Bird et al., 1988) como *Asr2*, tal como fue demostrado por los experimentos de "Northern" y "Primer Extension".

Es de destacar que el haber encontrado genes significativamente homólogos a *Asr2* en otras especies vegetales alejadas evolutivamente de *Lycopersicon esculentum*, como *Citrus maxima*, sugiere la universalidad de las funciones de las proteínas para las cuales codifican los genes de la familia *Asr*.

Finalmente, es bueno recalcar el por qué de la importancia del estudio de genes como *Asr2*, inducibles por ABA. Desde un punto de vista ligado al conocimiento básico, sirve para aportar datos conducentes a la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación hormonal de la expresión de genes que gobiernan procesos fisiológicos tales como el estrés y la maduración. En esta dirección, esta investigación arrojó luz sobre las últimas etapas que operan

dentro de la intrincada transducción de señales gatilladas por el ABA. Y anticipando una vertiente más aplicada, este trabajo contribuye a contemplar la factibilidad de la expresión de transgenes de importancia agronómica bajo nuevos promotores inducibles, como *Asr2*, que exhiben especificidad temporal y/o tisular en situaciones donde una expresión generalizada dirigida por los clásicos promotores constitutivos no es deseable.

CONCLUSIONES

- Se clonó un fragmento genómico de *Lycopersicon esculentum* homólogo al clon de cADN *Asr1*.
- Se determinó la secuencia nucleotídica del clon genómico en estudio, lo que permitió definir un nuevo miembro de la familia génica *Asr* : el gen *Asr2*.
- Se confirmó la existencia de la familia génica *Asr* a la cual pertenecen *Asr1*, *Asr2* y *Asr3*.
- Se estableció la localización genómica de dicha familia en el cromosoma 4 de tomate.
- Se comprobó expresión de *Asr2* en fruto de tomate.
- Se demostró que la región 5' del gen *Asr2* posee actividad de promotor.
- Se verificó la inducción por ABA del promotor de *Asr2* en sistemas de expresión transitoria y estable.

BIBLIOGRAFIA

- Allan A.C., Fricker M.D., Ward J.L., Beale M.H. y Trewavas A.J. (1994). Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Cell* 6:1319-1328.
- Amitai-Zeigerson H., Scolnik P. y Bar-Zvi D. (1995). Tomato *Asr1* mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Science* 110:205-213.
- Anderberg R.J. y Walker-Simmons M.K. (1992). Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10183-10187.
- Anderson B.E., Ward J.M. y Schroeder J.L. (1994). Evidence for an extra-celular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiol.* 104:1177-1183.
- Baker J., Steele C. y Dure L.(1988). Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* 11:277-291.
- Bandziulis R.J., Swanson M.S. y Dreyfuss G. (1989). RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev.* 3:431-437.
- Bartels D., Singh M. y Salamini F. (1988). Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta* 175:485-492.
- Becker D., Kemper E., Schell J. y Materson R. (1992). New plant binary vectors with selective markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197.
- Bernacchi D. (1996). Ph. D. Thesis. Cornell University. USA.
- Bird C.R., Smith C.J., Ray J.A, Moureau P., Bevan M.W., Bird A.S., Hughes S., Morris P.C., Grierson D. y Schuch W. (1988). The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expresion in transgenic plants.*Plant Mol. Biol.* 11:651-662.
- Blatt M.R. y Armstrong F. (1993). K⁺ channels of stomatal guard cells: abscisic acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmatic pH. *Planta* 191:330-341.

- Blatt M.R. y Thiel (1993). Hormonal control of ion channel gating. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:543-567.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bray E.A. (1988). Drought- y ABA-induced changes in polypeptide y mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiol.* 88:1210-1214.
- Bray E.A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103:1035-1040.
- Bray E.A. y Zeevaart J.A.D. (1986). Compartmentation and equilibration of abscisic acid in isolated Xanthium cells. *Plant Physiology* 80:105-109.
- Cabrera-Ponce J.L., Vegas-García A. y Herrera-Estrella L. (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports* 15:1-7.
- Correll D.S. (1962). The potato and its wild relatives. Texas Research Foundation, Renner, Texas.
- Chen R., Yu L., Greer A.F., Cheriti H. y Tabaeizadeh Z. (1994). Isolation of an osmotic stress-and abscisic acid-induced gene encoding an acidic endochitinase from *Lycopersicon chilense*. *Mol. Gen. Genet.* 245:195-202.
- Dalta R.S.S., Hammerlind J.K., Pelcher L.E., Crosby W.L. y Selvaraj G. (1991). A bifunctional fusion between β -glucuronidase and neomycine phosphotransferase: A broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene* 101:239-246.
- Dalton S. y Wells J.R.E. (1988). A gene-specific promotor element is required for optimal expression of histone H1 gene in S-phase. *EMBO J.* 7:49-56.
- del Vas M. (1993). Obtención y caracterización de plantas de papa transgénicas para genes de interés agropecuario. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- DellaPenna D., Alexander D.C. y Bennett A.B. (1986). Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: analysis of polygalacturonase levels during ripening. *Proc. Natl. Acad. Sciences, USA* 83:6420-6424.

- Dellaporta S.L., Wood J. y Hicks J.B. (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Ding J.P. y Pickard B.G. (1993). Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells. *Plant J.* 3:83-110.
- Dolferus R., Jacobs M., Peacock W.J., Dennis E. (1994). Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiol.* 105:1075-1087.
- Dure L. (1993)a. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.* 3:363-369.
- Dure L. (1993)b. Structural motifs in Lea proteins. In TJ Close, E.A. Bray, eds, *Plant Responses to Cellular Dehydration during environmental stress. Current topics in Plant Physiology*, Vol. 10. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 91-103.
- Fairley-Grenot K. y Assmann S. (1991). Evidence for G-protein regulation of inward K⁺ channel current in guard cells of fava bean. *Plant Cell* 3:1037-1044.
- Finkelstein R.R. (1994). Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J.* 5:765-771.
- Finkelstein R.R. y Somerville C.R. (1990). Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiol.* 94:1172-1179.
- Finkelstein R.R., Tenbarger K.M., Shumway J.E. y Crouch M.L. (1985). Role of ABA in maturation of rapessed embryos. *Plant Physiol.* 78:630-636.
- Foster R., Izawa T. y Chua N.H. (1994). Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB J.* 8:192-200.
- Frischauf A., Lehrach H., Poustka A. y Murray N. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170:827.
- Giraudat J. (1995). Abscisic acid signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 7:232-238.
- Giraudat J., Hauge B.M., Valon C., Smalle J., Parcy F. y Goodman H.M. (1992). Isolation of the *Arabidopsis ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell* 4:1251-1261.

- Goldman G.H., Geremía R.A., Caplan A.B., Vila S.B., Villaroel R., Van Montagú M. y Herrera Estrella A. (1992). Molecular characterization and regulation of phosphoglycerate kinase gene from *Trichoderma viridae*. *Mol. Microbiol.* 6(9):1231-1242.
- Gómez J., Sánchez-Martínez D., Stiefel V., Rigau J., Puigdomenech P. y Pages M. (1988). A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* 334:262-264.
- Gosti F., Bertauche N., Vartanian N. y Giraudat J. (1995). Abscisic acid-dependent and -independent regulation of gene expression by progressive drought in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen Genet.* 246:10-18.
- Gray J.E., Picton S., Giovannoni J.J. y Grierson D. (1994). The use of transgenic and naturally occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. *Plant, Cell and Environment* 17:557-571.
- Grierson D. y Schuch W. (1993). Control of ripening. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 342:241-250.
- Guerrero F.D., Jones J.T. y Mullet J.E. (1990). Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* 15:11-26.
- Guiltinan M.J., Marcotte W.R. y Quatrano R.S. (1990). A plant leucine zipper protein recognizes an abscisic response element. *Science* 250:267-270.
- Guo Y., Delseny M. y Puigdomènech P. (1994). mRNA accumulation and promoter activity of the gene coding for a hydroxyproline-rich glycoprotein in *Oryza sativa*. *Plant Mol. Biol.* 25:159-165.
- Hamilton A.J., Lycett G.W. y Grierson D. (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346:284-287.
- Hamilton A.J., Bouzayen M. y Grierson D. (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sciences, USA* 88:7434-7437.

- 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.
- Hentschel C.C. y Birnstiel M. (1981). The organization and expression of histone gene family. *Cell* 25:301-303.
- Hetherington A.M. y Quatrano R.S. (1991). Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytol.* 119:9-32.
- Hoeckema A. et al. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* 303:179-180.
- Hofgen R. y Willmitzer L. (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *NAR* 16(20):9877.
- Hoisington D., Khairallah M. y González de León D. (1994). *Laboratory Protocols: CIMMYT. Applied Molecular Genetics Laboratory. Second edition. México, D.F.:CIMMYT.*
- Hornberg C. y Weiler E.W. (1984). High-affinity binding sites for abscisic acid on plasmalemma of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 310:321-324.
- Imai R., Moses M.S. y Bray E.A. (1995). Expression of an ABA-induced gene of tomato in transgenic tobacco during periods of water deficit. *J. of Exp. Botany* 46, 290:1077-1084.
- Iusem N.D., Bartholomew D.M., Hitz W.D. y Scolnik P.A. (1993). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit y ripening. *Plant Physiol.* 102:1353-1354.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. y Bevan M.W. (1987). Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Johnston S.A., Riedy M., De Vit M.J., Sanford J.C., McElligott S. y Sanders R. (1991). Biolistic transformation of animal tissue. *In vitro Cell Dev. Biol.* 27:11-14.
- Karn J.M., Brenner S., Barnett L. y Casareni G. (1980). Novel bacteriophage λ cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5172.

- Kermode A.R. y Bewley J.D. (1987). Regulatory processes involved in switch from seed development to germination: Possible roles for desiccation and ABA. In Drought Resistance in Plants, Physiological and Genetic Aspects. Monti L. y Porceddu E. eds (Brussels: EEC) 59-76.
- Klein T.M., Harper E.C. y Svab Z. (1988). Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment method. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8502-8505.
- Kononowicz A.J., Raaghothama K.G., Casas A.M., Reuveni M. Watad A., Liu D., Bressan R.A. y Hasegawa P.M. (1993). Osmotin: regulation of expression and function. In TJ Close, E.A. Bray, eds, Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress. Current Topics in Plant Physiology Vol 10. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp144-158.
- Koornneef M., Hanhart C.J., Hihorst H.W.M. y Karssen C.M. (1989). In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 90:463-469.
- Koornneef M., Reuling G. y Karssen C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. Physiol. Plant. 61:377-383.
- Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E. y Newborn I. (1987). MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174:181.
- Lee H.J., Tucker E.B., Crain R.C. y Lee Y. (1993). Stomatal opening is induced in epidermal peels of *Commelina communis* L. by GTP analogs or pertussis toxin. Plant Physiol. 102:95-100.
- Lee Y. y Assmann S.M. (1991). Diacylglycerols induce both ion pumping in patch-clamped guard-cell protoplasts and opening of intact stomata. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2127-2131.

- Lemtiri-Chlieh F. y MacRobbie E.A.C. (1994). Role of calcium in the modulation of *Vicia* guard cell potassium channels by abscisic acid: a patch clamp study. *J. Membr. Biol.* 137:99-107.
- Lessl M. y Lanka E. (1994). Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 77:321-324.
- Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P.C., Guerrier D., Cheddor F. y Giraudat J. (1994). *Arabidopsis* ABA-responsive gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264:1448-1452.
- Lewin B.L.(1994a). Gene numbers: repetition and redundancy. In *Genes V*. Oxford University Press. New York, pp.709-717.
- Lewin B.L.(1994b). Receptors and signal transduction; channels and ion uptake. In *Genes V*. Oxford University Press. New York, pp.342-346.
- Li Y. y Walton D.C. (1987). Xanthophylls and abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean leaves. *Plant Physiol.* 85:910-915.
- López-Gomez R. y Gómez-Lim M.A. (1992). A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hort Science* 27(5):440-442.
- Luan S., Li W., Rusnak F., Assmann S.M. y Schreiber S.L. (1993). Immuno-suppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2202-2206.
- Ludevid M.D., Freire M.A., Gómez J., Burd C.G., Albericio F., Giralt E., Dreyfuss G. y Pages M. (1992). RNA binding characteristics of a 16 kDa glycine-rich protein from maize. *Plant J.* 2:999-1003.
- Lütcke H.A., Chou K.C., Mickel F.S., Moss K.A., Kern H.F. y Scheele G.A. (1987). Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* 6:43-48.
- Lynn Zimmerman J. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5:1411-1423.
- Marcotte W.R., Bayley C.C. y Quatrano R.S. (1988). Regulation of a wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts. *Nature* 335:454-457.

- Marcotte W.R, Russel S.H. y Quatrano R.S. (1989). Abscisic acid-responsive sequences from the *Em* gene of wheat. *Plant Cell* 1:969-976.
- Martin G.B., de Vicente M.C. y Tanksley S.D. (1993a). High-resolution linkage analysis and physical characterization of the Pto bacterial resistance locus in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact* 6:26-34.
- Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., Wu T., Earle E.D. y Tanksley S.D. (1993b). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432-1436.
- Mc Cabe D.E., Swain W.F., Martinell B.J. y Christou P. (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/technology* 6:923-926.
- McAinsh M.R., Brownlee C. y Hetherington A.M. (1992). Visualizing changes in cytosolic-free Ca²⁺ during the response of stomatal guard cells to abscisic acid. *Plant Cell* 4:1113-1122.
- Meyer K., Leube M.P. y Grill E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264:1452-1455.
- Meyer P. (1995). Understanding and controlling transgene expression. *Trends in Biotechnology* 13:332-337.
- Michel D., Furini A., Salamini F. y Bartels D. (1994). Structure and regulation of an ABA- and desiccation-responsive gene from the resurrection plant *Craterostigma plantigenum*. *Plant Molecular Biology* 24:549-560.
- Michel D., Salamini F., Bartels D., Dale P., Baga M. y Szalay A. (1993). Analysis of a desiccation and ABA-responsive promoter isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantigenum*. *Plant J.* 4:29-40.
- Mlynárová L., Jansen R.C., Conner A.J., Stiekema W.J. y Nap J.P. (1995). The MAR-mediated reduction in position effect can be uncoupled from copy-number expression in transgenic plants. *Plant Cell* 7:599-609.
- Mundy J. y Chua N.H. (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7:2279-2286.

- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth y bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Oeda K., Salinas J. y Chua N.H. (1991). A tobacco bZIP transcription activator (TAF-1) binds to a G-box motif conserved in plant genes. *EMBO J.* 10:1793-1802.
- Oeller P.W., Wong L.M., Taylor L.P., Pike D.A. y Theologis A. (1991). Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Science* 254:427-429.
- Ooms J.J.J., Léon-Kloosterziel K.M., Bartels D., Koornneef M. y Karssen C.M. (1993). Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. A comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants. *Plant Physiol.* 102:1185-1191.
- Osley M.A. (1991). The regulation of histone synthesis in cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 60:827-861.
- Parcy F., Valon C., Raynal M., Gaubier-Comella P., Delseny M. y Giraudat J (1994). Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* 6:1567-1582.
- Parry A. y Horgan R. (1991). Carotenoids and abscisic acid (ABA) biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* 82:320-326.
- Pena-Cortés H., Sánchez-Serrano J.J., Willmitzer L. y Prats S. (1990). Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9851-9855.
- Picton S., Barton S.L., Bouzayen M., Hamilton A.J. y Grierson D. (1993). Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *The Plant J.* 3:469-481.
- Pla M., Vilardell J., Guiltinan M.J., Marcotte W.R., Niogret M.F., Quatrano R.S. y Pagés M. (1993). The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA y water-stress response of the maize gene *rab28*. *Plant Mol. Biol.* 21:503-512.
- Plant A.L., Cohen A. y Bray E.A. (1991). Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and ABA-induced gene of tomato. *Plant Physiol.* 97:900-906.

- Quatrano R.S. (1987). The role of hormones during seed development. In Plant Hormones and their role in Plant Growth and Development. Davies P.J. ed (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers) 494-514.
- Ream W. (1989). *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdon genetic exchange. Annu. Rev. Phytopathol. 27:583-618.
- Sambrook K.J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989). Molecular Cloning-Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanford J.C., Klein T.M., Wolf E.D. y Allen N. (1987). Delivery of substances into cells y tissues using a particle bombardment process. J. Part. Sci. y Tech. 5:27-37.
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463.
- Sato T. y Theologis A. (1989). Cloning the mRNA encoding 1-amino-cyclopropano-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. Proc. Natl. Acad. Sciences, USA 86:6621-6625.
- Schuch W., Hobson G., Kanczler J., Tucker G., Robertson D., Grierson D., Bright S. y Bird C. (1991). Improvement of tomato fruit quality through genetic engineering. HortScience 26:1517-1520.
- Schumacher K., Ganai M.W. y Theres K. (1995). Genetic and physical mapping of the lateral suppressor (ls) locus in tomato. Mol. Gen. Genet. 246:761-766.
- Schwartz A., Wu W.H., Tucker E.B. y Assmann S.M. (1994). Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acid: an intracelular locus of phytohormone action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4019-4023.
- Seffens W.S., Almoguera C., Wilde H.D., Vonder Haar R.A. y Thomas T.L. (1990). Molecular analysis of a phylogenetically conserved carrot gene. Developmental and environmental regulation. Developmental Genetics 11:65-76.
- Shen Q. y Ho T.D. (1995). Funtional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containig a G-box and a novel cis-acting element. The Plant Cell 7:295-307.

- Skriver K. y Mundy J. (1990). Gene expression in response to abscisic acid y osmotic stress. *Plant Cell* 2:503-512.
- Smith C.J.S., Watson C.F., Morris P.C., Bird C.R., Seymour G.B., Gray J.E., Arnold C., Tucker G.A., Schuch W., Harding S. y Grierson D. (1990). Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol. Biol.* 14:369-379.
- Smith F.D., Harpending P.R. y Sanford J. (1992). Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *J. Gen. Microbiol.* 138:239-248.
- Spiker S. y Thompson W. (1996). Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants. *Plant Physiol.* 110:15-21.
- Straub P., Shen Q. y Ho T.D. (1994). Structure and promotor analysis of an ABA- and stress-regulated barley gene, HVA1. *Plant Mol. Biol.* 26:617-630.
- Tal M. y Imber D. (1970). Abnormal stomatal behaviour and hormonal imbalance in flacca wilt mutant of tomato. II. Auxin and abscisic acid-like activity. *Plant Physiol.* 46:373-372.
- Tanksley S.D., Ganai M.W., Prince J.P., de Vicente M.C. Bonierbale M.W., Broun P., Fulton T.M., Giovannoni J.J., Grandillo S., Martin G.B., Messeguer R., Miller J.C. Paterson A.H., Pineda O., Röder M.S., Wing R.A., Wu W. y Young N.D. (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-1160.
- Terras F.R., Goderis I.J., Van Leuven F., Venderleyden J., Cammue B.P.A. y Broekaert W.F. (1992). In vitro antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus* L.) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 100:1055-1058.
- Thiel G. y Blatt M.R. (1994). Phosphatase antagonist okadaic acid inhibits steady state K⁺ currents in guard cells of *Vicia faba*. *Plant J.* 5:727-733.
- Thompson A.J. y Corlett J.E. (1995). mRNA levels of four tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.L.) genes related to fluctuating plant and soil water status. *Plant Cell and Environment* 18:773-780.