

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

**TESIS QUE PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGIA PRESENTA LA
M. EN C. IDALIA ANALI GAMEZ ESCOBEDO**

**"INHIBICION DEL GEN DE LA TREHALASA POR
TRANSGENESIS DE RNA ANTISENTIDO Y SU
EFECTO EN EL PATRON DE CRECIMIENTO
DE PLANTAS DE TABACO"**

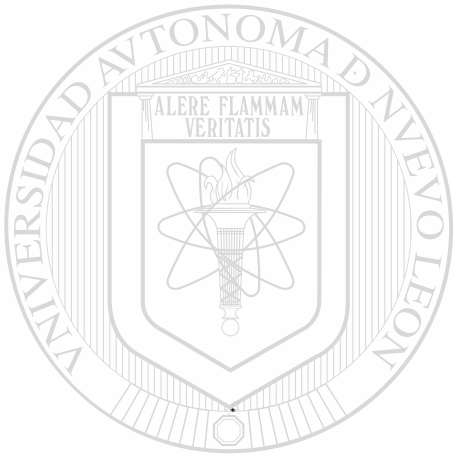
SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

DICIEMBRE DEL 2003

TD
Z5320
FCB
2003
.G36



1020150697

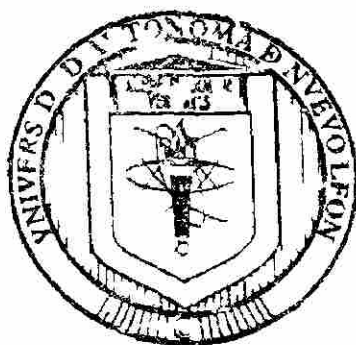


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

UANL

TESIS QUE PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD

EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA LA

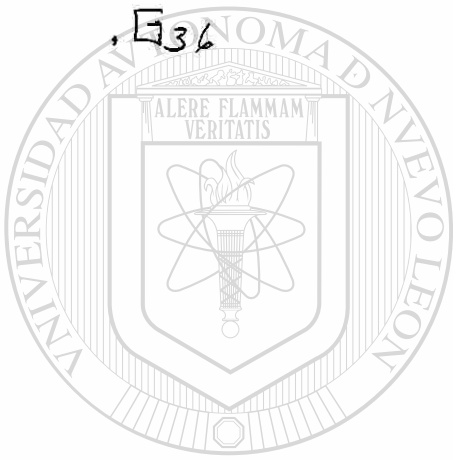
MEMORIA DE INVESTIGACIÓN DE

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INHIBICIÓN DEL GEN DE LA TREHALASA POR
TRANSGENESIS DE RNA ANTISENTIDO Y SU
EFECTO EN EL PATRÓN DE CRECIMIENTO
DE PLANTAS DE TABACO

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE DEL 2002

TD
Z5320
F08
203
.E36

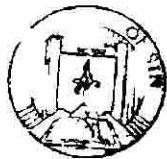


UANL

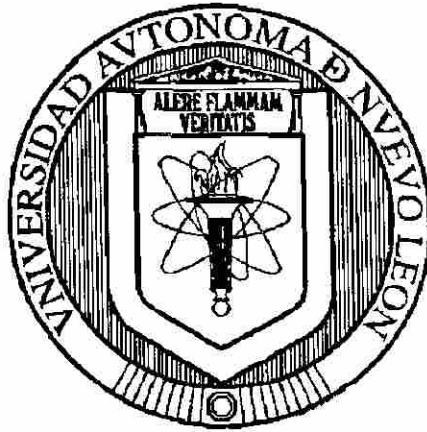
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO
TESIS



Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Subdirección de Postgrado



Tesis que para optar al grado de

Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

presenta la M. en C. Idalia Analí Gámez Escobedo

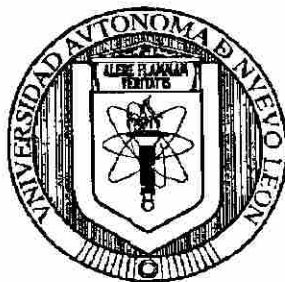
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
" Inhibición del gen de la trehalasa por transgénesis de RNA antisentido y
su efecto en el patrón de crecimiento de plantas de tabaco "

San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

Diciembre del 2003



Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Subdirección de Postgrado

Tesis que para optar al grado de
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

presenta la M. en C. Idalia Analí Gámez Escobedo

" Inhibición del gen de la trehalasa por transgénesis de RNA antisentido y su efecto en el patrón de crecimiento de plantas de tabaco "

COMITÉ DE TESIS

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Presidente.-

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Secretario.-

Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal.-

Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos
Vocal.-

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal.-

San Nicolás de los Garza, Nuevo León
Diciembre del 2003

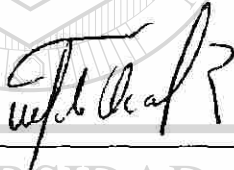
**“Inhibición del gen de la trehalasa por transgénesis de RNA antisentido
y su efecto en el patrón de crecimiento de plantas de tabaco”**

Por

M.en C. Idalia Analí Gámez Escobedo

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad de Manipulación Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de Transformación de Plantas del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Unidad Irapuato, bajo la asesoría del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y el Dr. José Luis Cabrera Ponce, y la co-asesoría del Dr. Luis Rafael Herrera Estrella y el Dr. Carlos Hernández Luna.

FIRMAS



Dr. Roberto Montes de Oca Luna

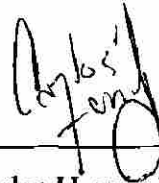
Director Interno de Tesis

Dr. José Luis Cabrera Ponce

Director Externo de Tesis

Dr. Luis Rafael Herrera Estrella

Co-Director Externo de Tesis



Dr. Carlos Hernández Luna

Co-Director Interno de Tesis

San Nicolás de los Garza, N.L.

Diciembre del 2003

CONTENIDO

Portada	i
Comité de Tesis	ii
Dirección y localización del Trabajo	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Contenido	vii
Índice de Tablas	x
Índice de Figuras	xi
Abreviaturas y simbología	xii
RESÚMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
La Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	4
Estrés abiótico y la respuesta en la expresión de genes	5
Ingeniería Genética de plantas para conferir características de importancia agronómica	5
Manipulación genética para inhibir la expresión de genes: RNA antisentido	6
Estrategias para inducir la expresión de un transgen en respuesta a estrés: el promotor rd29A	8
Regulación del metabolismo del carbono: detección, señalización y distribución	8
Trehalosa: metabolismo y función	10
Manipulación genética de la biosíntesis de trehalosa en plantas	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15

MATERIALES Y MÉTODOS

16

Clonación y análisis del DNA complementario (cDNA) de la enzima trehalasa de alfalfa	17
Amplificación de la secuencia interna del cDNA de la trehalasa de alfalfa	17
Obtención del extremo 3' del cDNA de la trehalasa de alfalfa	18
Obtención del extremo 5' del cDNA de la trehalasa de alfalfa	19
Análisis estructural de la secuencia del cDNA de la trehalasa de alfalfa	20
Análisis de la expresión espacial del gen de la trehalasa de alfalfa	21
Clonación de la secuencia promotora rd29A de <i>Arabidopsis thaliana</i> en un vector de expresión en plantas	22
Amplificación de la secuencia promotora rd29A	22
Clonación del promotor rd29A en un vector de expresión en plantas	23
Clonación de la secuencia de la trehalasa en antisentido bajo el control de los promotores 35ScaMV y rd29A.	23
Amplificación de la secuencia trehalasa a utilizarse como antisentido	24
Clonación del fragmento de la secuencia trehalasa antisentido en los vectores de expresión en plantas	24
Obtención de plantas transgénicas de tabaco para las construcciones rd29:TRÉas y 35S:TRÉas, y sus respectivos controles (rd29:GUS y 35S:GUS)	
Preparación y bombardeo de micropartículas con DNA	25
Regeneración y cultivo de tejidos de plantas transformantes	26
Detección de los transgenes en las líneas transformantes.	26
Determinación de la actividad trehalasa en plantas.	27
Análisis del desarrollo, auxotrofia por sacarosa y comportamiento de azúcares de las Líneas transgénicas <i>in vitro</i> .	28

RESULTADOS

29

Clonación y análisis del DNA complementario (cDNA) de la enzima trehalasa de alfalfa	
Identificación y clonación de una secuencia conservada entre las trehalasas de plantas, a partir de alfalfa.	29
Obtención del extremo 3' del cDNA de la trehalasa de alfalfa	31

Obtención del extremo 5' del cDNA de la trehalasa de alfalfa	33
Análisis estructural de la secuencia del cDNA de la trehalasa de alfalfa	33
Análisis de la expresión espacial del gen de la trehalasa de alfalfa	35
Clonación de la secuencia promotora rd29A de <i>A. thaliana</i> y su funcionalidad en tabaco	
Amplificación y clonación del promotor rd29A de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
Clonación del promotor rd29A de <i>A. thaliana</i> en un vector de expresión en plantas	38
Clonación del cDNA de la trehalasa en antisentido bajo el control del promotor rd29A (rd29A:TREas) y del promotor 35S CaMV (35S:TREas)	39
Obtención de plantas transgénicas de tabaco para las construcciones rd29A:TreAS y 35S:TreAS, y sus respectivos controles (rd29A:GUS y 35S:GUS)	41
Determinación de la presencia del transgen en las plantas transgénicas	42
Determinación de la actividad trehalasa en plantas	42
Análisis del desarrollo, auxotrofia por sacarosa y comportamiento de azúcares de las líneas transgénicas <i>in vitro</i> .	44
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXO I. MAPAS	67
ANEXO II. SECUENCIAS	80
ANEXO III. PROTOCOLOS	81

RESÚMEN

El desarrollo de variedades de cultivos agrícolas con una mejor capacidad de autodefensa a condiciones ambientales adversas y una mayor producción son algunos de los objetivos de la tecnología de manipulación genética de plantas. A mediados de los 90, se dio inicio a la obtención de plantas tolerantes a sequía, basados en incrementar por medio Ingeniería Genética la concentración del azúcar trehalosa, conocida como uno de los mejores osmoprotectores en la naturaleza. Actualmente la importancia de este azúcar es doble, ya que además de su capacidad de inducir tolerancia a estrés, también incrementa la capacidad fotosintética de la planta. Debido a que la actividad trehalasa endógena ha limitado los intentos por controlar esta ruta mediante transgénesis de plantas, en nuestro proyecto establecimos que al inhibir dicha actividad por medio de un antisentido para dicha enzima, el incremento de trehalosa provocado por ello, conduciría a los fenotipos reportados relacionados con un incremento en la productividad y la tolerancia a sequía.

Dirigiendo como punto final nuestra estrategia al cultivo de la alfalfa, clonamos la secuencia de su enzima trehalasa. En base a la homología entre otras trehalasas, se amplificó por PCR una región conservada a partir de la cual se obtuvo el cDNA completo mediante los protocolos de 3'RACE y GeneRacer. La caracterización de la misma por secuenciación, indica que el gen codifica para una proteína de 553 aminoácidos, con mayor homología a la secuencia de soya. A partir de este cDNA diseñamos una estrategia de inhibición por RNA antisentido que se probó en un modelo de tabaco. Las líneas transformantes obtenidas por biobalística, además de presentar una disminución promedio de 50% en su actividad de trehalasa, tuvieron también un mejor comportamiento en desarrollo y vigorosidad *in vitro*, aún en medio carente de sacarosa como fuente de carbono, lo cual indica una mejor capacidad fotosintética en estas plantas. Las líneas transgénicas control, fueron incapaces de desarrollarse normalmente y permanecer en medio carente de sacarosa. Las plantas con el antisentido, mostraron también un patrón diferente del comportamiento de azúcares, acumulando un exceso de glucosa, a diferencia de las plantas control. Estos resultados de incremento en la capacidad de desarrollo y la anulación de auxotrofia por sacarosa *in vitro*, nos indican que la inhibición de la enzima de tabaco con la secuencia de alfalfa es exitosa para la obtención de fenotipos mejorados en crecimiento y desarrollo. Además, representa una tecnología potencial para la selección de plantas transgénicas *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

La alfalfa es el principal forraje en nuestro país, tanto por su superficie de siembra como por su volumen de producción, calidad y grado de utilización en las dietas del hato lechero. Al igual que diversos cultivos de carácter industrial, alimenticio o forrajero, la principal limitante para su producción agrícola en diversas regiones es el agua de riego, ya que la alfalfa, por ser un cultivo perenne que demanda riego durante todo el año, ha sido clasificada como un cultivo con alta demanda hídrica y a la vez como ineficiente en el uso del agua. Es por esto, que la obtención de variedades con características agronómicas mejoradas es un área importante de aplicación de la ingeniería genética de plantas. En el caso particular, nos ocupa la implementación de una estrategia que confiera a la planta un desarrollo normal o mejorado bajo condiciones no óptimas de disponibilidad de agua.

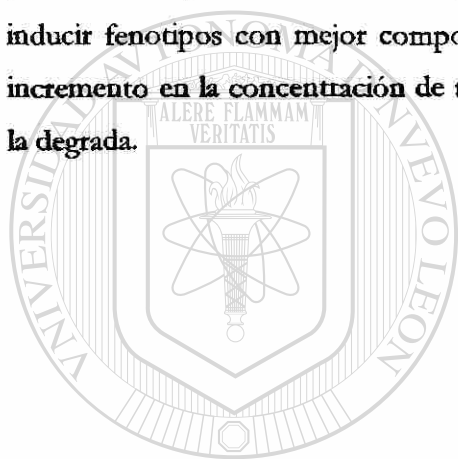
Al igual que diversos organismos anhidrobióticos, las plantas utilizan diferentes estrategias para tolerar y sobrevivir a situaciones similares de estrés, como lo son la producción y acumulación de metabolitos como la prolina y la trehalosa, y proteínas de membrana como la acuaporina, así como la activación de rutas moleculares entre las que se encuentra la expresión de genes de respuesta a estrés. Dichas estrategias le otorgan a la planta mecanismos estructurales, moleculares y bioquímicos de defensa, o bien la llevan a un estado de supresión metabólica que le permite resistir determinados periodos de sequía y restablecerse prontamente cuando el agua está disponible. Una de las estrategias que deseamos evaluar para atacar este problema en alfalfa es incrementar la concentración del azúcar trehalosa.

En los últimos años la atención hacia la trehalosa ha sido muy significativa a raíz de que se descubre que es una molécula que impacta en la regulación de la fotosíntesis. Está demostrado que, en plantas de tabaco, el incremento en la concentración normal de trehalosa en una planta conduce a elevar su capacidad fotosintética (Pilon-Smits *et al.*, 1998). Sin embargo, al igual que en plantas de papa, esta estrategia indujo fenotipos con modificaciones morfológicas aberrantes en cuanto a la estatura de la planta y la deformación de tubérculos (Goddijn *et al.*, 1997). Independientemente de su efecto, normalmente en las

plantas la concentración de trehalosa es regulada por degradación mediada por la enzima trehalasa.

En base a todo lo anterior el incremento en la concentración de trehalosa tiene dos repercusiones que pueden ser positivas para una planta: tolerancia a estrés e incremento en su producción. A partir de estos conocimientos, es del interés de algunos grupos de investigación, el establecer metodologías para la manipulación del metabolismo de la trehalosa y aprovechar sus efectos benéficos.

Hemos iniciado un proyecto global para evaluar los beneficios de la acumulación de este azúcar en plantas de alfalfa. Como una primera fase de dicho proyecto, se desarrolló el presente trabajo de tesis enfocado particularmente a establecer un modelo en tabaco para inducir fenotipos con mejor comportamiento en su desarrollo inducido por medio de un incremento en la concentración de trehalosa, al inhibir la síntesis de la enzima trehalasa que la degrada.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANTECEDENTES

La alfalfa (*Medicago sativa*).

La alfalfa es una leguminosa que pertenece al género *Medicago*, y es la principal especie forrajera cultivada en el mundo. El centro de diversidad primario de la alfalfa estuvo en el medio oriente y fue introducida a la región del centro de México durante la conquista española (Salinas, 2000). En la regiones productoras de ganado lechero, son comunes rendimientos anuales de forraje seco superiores a 20 tons/ha. En zonas como la Comarca Lagunera la alfalfa es el principal forraje, tanto por su superficie (3,500 ha) como por su volumen de producción, calidad y grado de utilización en las dietas del hato lechero regional (Cueto y Quiroga, 2000).

Debido a su importancia, la alfalfa es un cultivo con gran potencial de mejoramiento mediante ingeniería genética, y de hecho se han establecido las metodologías para su transformación, y se ha manipulada con diferentes objetivos. A la fecha diversos trabajos publicados reportan información de este cultivo sobre la caracterización de genes y secuencias promotoras y reguladoras (Mandaci y Dobres, 1997), su caracterización como bioreactor para la producción de proteínas de interés industrial (Austin, *et al.*, 1994), el mejoramiento en su valor nutricional (Tabe, *et al.*, 1995), el mejoramiento en su digestibilidad, en la eficiencia de nodulación y en la resistencia a patógenos (Dixon, *et al.*, 1996), la tolerancia al congelamiento (McKersie, *et al.*, 1993) y la producción de anticuerpos orales (Wigdorovitz, *et al.*, 1999).

Por otra parte, al igual que otros cultivos de importancia agrícola, la principal limitante para la producción agropecuaria en las diversas regiones del norte del país, es el agua de riego, ya que la alfalfa por ser un cultivo perenne que demanda riego durante todo el año se clasificó como un cultivo con alta demanda hídrica y a la vez como ineficiente en el uso del agua (Quiroga y Contreras, 2000).

Estrés abiótico y la respuesta en la expresión de genes.

Las plantas crecen en un ambiente inconstante que frecuentemente les impone dificultades en el crecimiento y el desarrollo. Entre los diversos factores ambientales adversos con los que se encuentran las plantas terrestres están las temperaturas extremas y el estrés osmótico que resulta de condiciones de alta salinidad o periodos de sequía. En el habitat natural de las plantas, los factores adversos casi nunca se presentan solos. Por ejemplo, el estrés osmótico que se presenta en verano está muchas veces acompañado por el estrés por altas temperaturas, y a su vez las bajas temperaturas llevan consigo un estrés osmótico, debido a que se dificulta la absorción y el transporte del agua. Los eventos tempranos de la adaptación vegetal a estos tipos de estrés ambiental son la detección y subsecuente traducción de señales para activar diversas respuestas fisiológicas y metabólicas, incluyendo la expresión de genes en respuesta a estrés (Xiong *et al.*, 1999).

El hecho de que la respuesta fisiológica al estrés se origine a partir de cambios en la expresión genética ha dado lugar a la clonación y caracterización de diversos genes inducida por estos tipos de estrés. Los productos de estos genes se clasifican en dos grupos: aquellos que protegen directamente contra el estrés ambiental y aquellos que regulan la expresión y la traducción de señales en la respuesta al estrés. El primer grupo incluye proteínas cuya función es proteger a la célula de la deshidratación, tales como las enzimas requeridas para la biosíntesis de varios osmoprotectores, proteínas anticongelantes, chaperonas y enzimas de destoxificación. El segundo grupo de productos genéticos incluye factores de transcripción, proteínas cinasas y enzimas involucradas en el metabolismo del fosfoinositidol. A la fecha, la manipulación genética de plantas para mejorar la tolerancia de las mismas al estrés únicamente se ha basado en transferir genes que codifican para proteínas del primer grupo (Kasuga *et al.*, 1999).

Ingeniería Genética de Plantas para Conferir Características de Importancia Agronómica.

La habilidad de movilizar DNA hacia un organismo y por lo tanto alterar su fenotipo, es central tanto para la biología molecular como para la biología aplicada. La transformación genética de plantas se presenta de manera natural (Hooykaas y Schilperoort, 1992), y los

científicos han logrado llevarla a cabo desde mediados de los años 70. Los métodos más comunes para introducir DNA a las células vegetales utilizan la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* o microproyectiles de tungsteno propulsados a gran velocidad (Birch, 1997; Hansen y Wright, 1999). Esta tecnología de transformación de plantas ofrece una gama de oportunidades para la investigación científica básica y para la modificación de cultivos agrícolas (Bent, 2000).

Por otra parte, la manipulación de rutas metabólicas, es un arte que hasta hace pocos años se desarrollaba únicamente en microorganismos, pero que ahora se está volviendo común en plantas transgénicas. Gracias al gran impulso de la Genómica se han descubierto nuevos genes de plantas relacionados al metabolismo, y de la mano con el mejoramiento en la eficiencia de transformación de plantas, esta tecnología se utiliza para generar cultivos con nuevas características de importancia agronómica. Dichas características incluyen el mejoramiento en la calidad del alimento tanto para el humano como para animales, la producción en plantas de fármacos y moléculas de utilidad industrial, y la habilidad de las plantas para defenderse por sí mismas de los patógenos y de las condiciones de estrés abiótico (Kinney, 1998).

Manipulación genética para inhibir la expresión de genes: silenciamiento de genes por RNA antisentido.

El uso de silenciamiento de genes en plantas es una herramienta poderosa en la transformación vegetal. Desde un punto de vista aplicado, el silenciamiento de genes se presentó como un obstáculo y se convirtió en un problema para la expresión satisfactoria de transgenes. Pero mientras las compañías biotecnológicas luchan por encontrar medios para evitar el silenciamiento, en el área de la ciencia básica este se ha convertido en un fenómeno de interés, ya que no solo se trata de una respuesta de la planta a los transgenes, sino que abre una puerta al entendimiento de los mecanismos que las plantas utilizan de manera natural para modificar la expresión génica con secuencias homólogas de ácidos nucleicos, tanto en el núcleo a nivel de DNA como también en el citoplasma como mecanismo de control para la sobreproducción de RNA mensajeros o de la replicación del RNA de patógenos (Matzke y Matzke, 1995). El uso del silenciamiento de genes es un mecanismo de

control implicado en la resistencia a virus, el mantenimiento del genoma y el control del desarrollo (Voinnet y Baulcombe, 1997). Dicho silenciamiento puede llevarse a cabo a través de un bloqueo de la transcripción del transgen (silenciamiento transcripcional de genes, TGS) o a través de una degradación específica del RNA del mismo (silenciamiento postranscripcional de genes, PTGS).

El silenciamiento postranscripcional se descubrió inicialmente en plantas transgénicas de petunia que sobre expresaban el gen de la chalcona sintasa (*chs*), y dónde el objetivo del trabajo era la obtención de plantas con una pigmentación púrpura más profunda (Jorgensen *et al.*, 1994). Sin embargo, el resultado fue inesperado, ya que se obtuvieron plantas completamente blancas debido a que tanto el transgen *chs* como el gen endógeno *chs* se habían inactivado. Esto es, mediante el fenómeno de cosupresión, en donde tanto el gen introducido como el gen endógeno homólogo se suprimen de manera coordinada (Matzke y Matzke, 1993). Cuando los RNAs del transgen son homólogos a los RNAs codificados por genes endógenos, ambos tipos de RNA son degradados, en un fenómeno referido como cosupresión (Fagard *et al.*, 2000). A raíz de que se demostró que un RNA antisentido transcrito a partir de una transgen podía regular de manera negativa la expresión de genes eucariotas, numerosos estudios han aprovechado este fenómeno. Lo que se espera es que el RNA antisentido (RNAas) hibride con el RNA mensajero (RNAm) blanco, para formar un RNA inactivo de doble cadena que la célula elimina rápidamente (Dougherty y Parks, 1995).

Aunque el PTGS se describió inicialmente en plantas transgénicas, actualmente se sabe que mecanismos similares se presentan en gran variedad de organismos, como en el caso de represión en *Neurospora crassa*, y el RNA de interferencia (RNAi) en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y en ratón, y existe evidencia genética de que es un mecanismo molecular común muy conservado. A pesar de que pueden diferir algunas especificidades del mecanismo de silenciamiento entre los diferentes reinos, el dsRNA parece ser un iniciador universal de la interferencia por RNA (RNAi) (Escobar *et al.*, 2001). Por otra parte, la interferencia mediada por dsRNA es un medio efectivo para dilucidar la función de genes en muchos organismos (Chuang y Meyerovitz, 2000).

Estrategias para inducir la expresión de transgenes en respuesta a estrés: el promotor rd29A.

El análisis de la expresión de genes que se inducen por deshidratación en *Arabidopsis thaliana* indican que existen al menos cuatro rutas de señales independientes que se encienden por estrés en respuesta a la deshidratación. Dos son dependientes de ácido absísico (ABA) y dos independientes del mismo. Una de las dos rutas dependientes de ABA se sobrelapa con una ruta inducible por frío (Kasuga, *et al.*, 1999). Con esta ruta se inducen varios genes, incluyendo el *rd29A*, que comparten una secuencia consenso en su región promotora, la cual es indispensable para inducir su expresión como respuesta a estrés por frío y deshidratación. Esta secuencia (TACCGACAT) se denominada elemento de respuesta a deshidratación (DRE), y se encuentra también en las regiones promotoras de otros genes inducibles por estrés (Liu *et al.*, 1998).

Ya se han identificado los genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican para las proteínas de unión al elemento DRE: DRE1A y DRE1B. La expresión constitutiva de estos genes en plantas transgénicas de *Arabidopsis* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), ocasiona una fuerte expresión constitutiva de los genes inducidos por estrés, y un incremento en la tolerancia a estrés por congelamiento, salinidad y sequía (Liu *et al.*, 1998). Sin embargo, la sobre expresión de estos genes resultó en un crecimiento muy pobre de las plantas transgénicas bajo condiciones normales. Para contrarrestar este efecto negativo de la expresión del gen DRE1A, este se expresó bajo la regulación del mismo elemento DRE del promotor *rd29A*. De esta manera, al inducir la expresión de DRE1A únicamente bajo condiciones de estrés, se anularon los efectos negativos y además confirió una tolerancia a condiciones de estrés, aún mayor que la conferida con la expresión del gen con el promotor del CaMV (Kasuga *et al.*, 1999).

Regulación del metabolismo del carbono: detección, señalización y distribución.

Distribuidos ampliamente en la naturaleza, los carbohidratos representan, sobre la base de masa, la clase más abundante de biomoléculas orgánicas sobre la tierra. Los carbohidratos, también conocidos como sacáridos, comprenden los azúcares simples, sus polímeros y otros

derivados azúcar, y se clasifican de acuerdo al número de unidades monoméricas que contienen en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. La mayor parte de estos carbohidratos se acumulan como resultado de la fotosíntesis, proceso mediante el cual ciertos organismos convierten la energía solar en energía química e incorporan el bióxido de carbono atmosférico en forma de carbohidratos.

Los carbohidratos desempeñan varios papeles cruciales en los organismos vivos. Son moléculas reducidas parcialmente, las cuales producen, por oxidación, la energía necesaria para conducir los procesos metabólicos; en esta forma los carbohidratos pueden actuar como moléculas para el almacenamiento de la energía. Los carbohidratos poliméricos realizan una gama de funciones. Por ejemplo, se les encuentra en las paredes celulares y los recubrimientos protectores de muchos organismos. Los carbohidratos adosados a las membranas de las células desempeñan un papel en el reconocimiento celular en los procesos de comunicación de célula a célula. Además, se encuentran derivados de los azúcares en numerosas moléculas biológicas, como antibióticos, coenzimas y ácidos nucleicos (Horton, *et al.*, 1993).

Prácticamente todas las plantas superiores convierten el carbono recientemente fijado en almidón o en sacarosa. La sacarosa y algunos oligosacáridos derivados de ésta son formas de carbohidratos que se translocan y transportan a través del floema hacia los órganos de las plantas que no son fotosintéticos. Estos se llaman órganos "vertedero", e incluyen las raíces, las semillas y las hojas jóvenes en desarrollo. Así, en la terminología común, los órganos "vertedero" obtienen sacarosa de las hojas "fuente". Algunos carbohidratos se retienen en la hojas fuente durante el día, cuando no hay fotosíntesis, el almidón se degrada, se convierte en sacarosa y se utiliza como combustible metabólico para las propias hojas fuente y otros órganos de la planta. La sacarosa se sintetiza en el citosol a partir de las triosas fosfato (gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato) que se originan ya sea directamente del ciclo reductor de pentosas fosfato (ciclo RPP) o menos directamente del almidón (Horton, *et al.*, 1993).

La sacarosa, además de que es la forma de transporte de carbohidratos en muchas plantas, también es una molécula móvil de señalización importante. Las señales mediadas por azúcares se integran con una amplia variedad de rutas de señalización para proveer una

distribución balanceada de metabolitos para el crecimiento, almacenaje y otras actividades. Las señales mediadas por sacarosa inducen la expresión de genes involucrados en los procesos de almacenaje y reprime la expresión de genes que codifican a componentes de la fotosíntesis para modular el suplemento y asimilación del fotosintato, y también modulan la floración, el ciclo celular, la respuesta a estrés y otras actividades celulares (Bevan *et al.*, 2002).

Trehalosa: metabolismo y función.

La trehalosa (α -D-glucopiranosil, 1-1- α -D-glucopiranosida) es un disacárido no reductor constituido por dos moléculas de glucosa unidas en un enlace α -glucosídico 1-1. Este azúcar se descubrió originalmente en 1832 por Wiggers en la cascarilla de centeno. Posteriormente, el químico francés Berthelot encontró este azúcar en el *trehala* (un maná del desierto de Asia menor que es producido por el gorgojo del trigo *Larinus nidificans*) y la llamó trehalosa (Nwaka y Holzer, 1998).

La biosíntesis de la trehalosa comprende dos pasos. En el primero, la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) (Glucosa-UDP: D-glucosa-6-fosfato-1-glucosiltransferasa) transfiere un residuo glucosil de una glucosa-UDP a una glucosa-6-fosfato, para producir una molécula de trehalosa-6-fosfato (t6p). En el segundo paso, este compuesto se convierte a trehalosa y fósforo inorgánico (Pi) por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (1PP) (trehalosa-6-fosfato fosfohidrolasa) (Cabib y Leloir, 1958). Por otra parte, la hidrólisis de la trehalosa se puede llevar a cabo de diferentes maneras: en *Euglena gracilis* y *Pichia fermentans* por medio de la trehalosa fosforilasa; en *Escherichia coli* por la fosforilación y la subsecuente hidrólisis por medio de la trehalosa-6-fosfato hidrolasa; y en plantas, hongos, animales y bacterias, la trehalosa se degrada por la enzima trehalasa (en Goddijn y Smeekens, 1998).

La trehalosa se encuentra presente en diversos organismos como bacterias, hongos e insectos (Elbein, 1964), pero en el caso de las plantas solamente se ha encontrado acumulación del azúcar en plantas vasculares inferiores como *Selaginella lepidophylla*, y la angiosperma *Myrothamnus flabellifolia* (Crowe *et al.*, 1992) ambas llamadas “plantas de la resurrección” (Muller *et al.*, 1995). Aunque se reporta que la ruta biosintética de la trehalosa

se encuentra presente en todos los reinos, su baja concentración en plantas vasculares se debe a la presencia de la enzima trehalasa endógena (Goddijn y Smeekens, 1998). Dicha enzima también degrada el disacárido que se deriva de los organismos asociados en la rizófera, por lo que en leguminosas existe una mayor actividad (Aeschbacher *et al.*, 1999).

La trehalosa era comúnmente considerada solo como un compuesto de reserva de carbohidratos, y aunque recientemente se ha demostrado su función como un agente protector para mantener estructuras vitales en el citosol bajo condiciones de estrés, los mecanismos por los cuales confiere dicha protección no están bien entendidos. Se postula que dicho mecanismo de protección contra estrés por calor y desecación es a través de la estabilización de la estructura proteica y las membranas lipídicas (Aeschbacher *et al.*, 1999; Blázquez *et al.*, 1998).

Manipulación genética de la biosíntesis de trehalosa en plantas.

A raíz de que se observó que las llamadas "plantas de la resurrección" muestran una elevada tolerancia a sequía, se hipotetizó que la introducción de la capacidad para sintetizar trehalosa en cultivos vegetales podría mejorar su comportamiento bajo dichas condiciones de estrés (Pilon-Smits *et al.*, 1998). Con el propósito de introducir esta ruta biosintética en plantas, se desarrollaron plantas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Romero *et al.*, 1997; Goddijn *et al.*, 1997), y *Arabidopsis* (De Virgilio *et al.*, 1993), mediante la introducción y expresión de los genes codificantes para las enzimas TPS y TPP (*otsA* y/o *otsB*) de *Escherichia coli* (Kassen *et al.*, 1994) y levaduras, respectivamente. En el primero de los casos se introdujo solamente el gen de la TPS, mientras que en el segundo trabajo, se introdujeron ambos genes *otsA* y *otsB*, pero en ninguno de los casos se obtuvo un incremento significativo en la concentración de trehalosa.

En base a los reportes referentes a la presencia de actividad trehalasa en gran variedad de plantas, particularmente en nódulos radiculares de legumbres (Müller *et al.*, 1992), se estudió el efecto de la inhibición de trehalasa utilizando el inhibidor específico Validamicina A. Se encontró no solamente que la inhibición de dicha enzima permitía una acumulación de trehalosa en las plantas, sino que, a pesar de lo que se creía, la capacidad para sintetizar

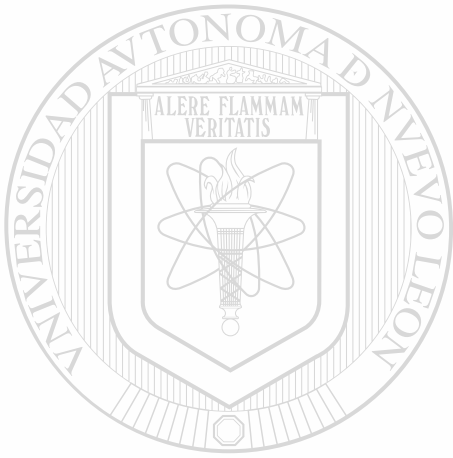
trehalosa no está restringida a ciertas especies tolerantes a sequía, y se encuentra también en angiospermas. Esta conclusión se derivó como resultado de la inhibición de la enzima trehalasa con Validamicina A en plantas silvestres de tabaco, en donde ocasionó un incremento en la concentración de trehalosa. Además de que tanto en plantas transgénicas para la TPS como en plantas silvestres se encontró un incremento en la tolerancia a sequía (Goddijn *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 1998).

Sin embargo, en los trabajos donde se sobre expresan los genes TPS y TPP, induciendo a la acumulación de trehalosa, se conduce a efectos pleiotrópicos que incluyen alteraciones en el crecimiento y en el metabolismo bajo condiciones de crecimiento normal. Recientemente se reportó la manipulación genética del arroz para la sobreproducción de la enzima bifuncional TPSP (fusión de TPS y TPP) de *Escherichia coli* (Garg *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2003). Durante el estrés abiótico, estas plantas transgénicas de arroz tuvieron un incremento en su acumulación de trehalosa y mostraron altos niveles de tolerancia a estrés por salinidad, sequía y baja temperatura, sin presentar una inhibición en su crecimiento, ya que al parecer las monocotiledóneas son más tolerantes a la trehalosa que las dicotiledóneas (García *et al.*, 1997).

Aunado a los resultados obtenidos en cuanto a adquisición de tolerancia a sequía e incremento en la acumulación de trehalosa, en los diversos trabajos realizados se han encontrado hallazgos que posicionan a este azúcar y su intermediario (t6p) como probables moléculas señalizadoras en el metabolismo de la planta. Los fenotipos obtenidos indican que las plantas que acumulan trehalosa presentan un incremento considerable en su capacidad fotosintética, incrementando así la producción de su biomasa, y sus hojas tienen una mejor capacidad para retener el agua (Pilon-Smits *et al.*, 1998).

El cultivo de la alfalfa, al igual que otros cultivos de importancia agronómica en nuestro país, está sometido al estrés impuesto por el medio ambiente adverso, como en el caso del estrés debido al déficit de agua que puede presentarse en regiones de temporal, lo que implica una disminución de productividad. En la naturaleza, uno de los mecanismos de defensa contra los efectos deletéreos del estrés por sequía, es la síntesis del azúcar trehalosa, que hasta hace pocos años se creía presente solamente en organismos menores. A partir del interés despertado por esta ruta biosintética, se dio inicio a diversos trabajos para implementar este mecanismo en plantas mediante ingeniería genética, y aunque pudieron observarse ciertos grados de tolerancia

al estrés, la acumulación del azúcar por sobreexpresión de las enzimas encargadas de su síntesis no fue considerable, debido a la presencia endógena de la actividad hidrolítica de la enzima trehalasa. La acumulación de trehalosa en plantas ya sea por sobreexpresión de genes de síntesis o por la inhibición química de la enzima trehalasa, conduce no solamente a niveles de tolerancia a estrés osmótico, sino que, sorpresivamente, mejora el comportamiento fotosintético de la planta induciéndola a un mejor desarrollo y productividad. Es por esto que es importante el establecer una metodología para la inhibición de la enzima trehalasa con el propósito de obtener dichos fenotipos en cultivos agrícolas importantes.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

HIPÓTESIS

El incremento de la concentración de trehalosa en plantas induce una mayor actividad fotosintética. Los niveles de trehalosa en las plantas son regulados por degradación enzimática mediada por la trehalasa. La inhibición química de la enzima trehalasa permite la acumulación de trehalosa. Por lo tanto *es posible que la inhibición de la enzima trehalasa por transgénesis de RNA antisentido mejore la actividad fotosintética y desarrollo de la planta.*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar si la expresión transgénica de un RNA antisentido para trehalasa mejora el crecimiento y desarrollo de las plantas transgénicas.

Objetivos Específicos.

1. Clonar el DNA complementario (cDNA) de la enzima trehalasa de alfalfa.
2. Clonar la secuencia promotora rd29A de *Arabidopsis thaliana*.
3. Clonar la secuencia antisentido del cDNA de la trehalasa de alfalfa bajo el control del promotor inducible rd29A (rd29A-TREas) y del promotor constitutivo 35S CaMV (35S-TREas).
4. Obtener plantas transgénicas de tabaco para los genes rd29A-TREas y 35S-TREas, así como para sus respectivos controles (rd29A:GUS y 35S:GUS).
5. Cuantificar la actividad enzimática de trehalasa en las plantas transgénicas bajo condicionales normales *in vitro*.
6. Analizar las líneas transgénicas en cuanto a crecimiento y desarrollo *in vitro*.
7. Analizar la auxotrofia por sacarosa común en plantas de tabaco propagadas *in vitro*, así como el comportamiento de sus azúcares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ya que el principal objetivo es evaluar en tabaco una estrategia para mejorar la capacidad de crecimiento y desarrollo por medio de la inhibición de la enzima trehalasa mediante RNA antisentido, se clonó para ello el cDNA de la trehalasa de alfalfa y se expresó su secuencia antisentido en plantas de tabaco, tanto de manera constitutiva con el promotor 35S, como de manera inducible por estrés osmótico con el promotor rd29A. La información de los mapas plasmídicos y las secuencias manipuladas en el desarrollo de esta metodología se describen en los Anexos I y II, respectivamente, así como las técnicas, protocolos y soluciones citados de Protocolos (Anexo III).

En la construcción de los plásmidos recombinantes, los procesos de restricción enzimática por endonucleasa y la ligación de DNA, así como en el caso de los sistemas de síntesis de cDNA (AM-RT Avian Enhanced^{MR} SIGMA y GeneRacer^{MR} Invitrogen, Inc.) se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones y recomendaciones de los fabricantes de las diferentes enzimas y reactivos utilizados. Las enzimas de digestión manipuladas son New Englan Biolabs, Inc. Los productos de digestión de DNA utilizados para la subclonación, se purificaron a partir de un gel de agarosa/TAE (200mM Tris, 5.7% ácido acético, 5mM EDTA pH8.0) mediante la extracción con un volumen de fenol:cloroformo y precipitación con isopropanol.

Los plásmidos obtenidos de la ligación de fragmentos, se introdujeron por choque térmico a células calcio competentes de *E. coli* DH5 α , JM109 o One Shot^{MR} (Invitrogen) (Sambrook y Russell, 2000), seleccionadas en medio LB con antibiótico. La extracción y purificación de DNA plasmídico a pequeña escala se realizó con el protocolo de Birnboim por lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2000), mientras que la extracción a mediana escala (midipreparación) se realizó con el sistema de purificación Nucleo Bond^{MR} (Clontech, Inc.).

La secuenciación de los fragmentos obtenidos por RT-PCR, 3'RACE y GeneRacer^{MR}, se realizó en el Laboratorio de Química del DNA del CINVESTAV-Irapuato, a partir de una midipreparación. La síntesis de oligonucleótidos se solicitó de manera indistinta a Genosys-SIGMA y Operon-Quiagen.

Clonación y análisis del DNA complementario (cDNA) de la enzima trehalasa de alfalfa.

Con el fin de obtener la secuencia antisentido de la enzima trehalasa de alfalfa requerida para la estrategia propuesta de inhibición, se procedió a clonar el cDNA de la misma. Debido a que dicha secuencia de cDNA no está reportada para alfalfa, se procedió inicialmente a amplificar un fragmento interno de ésta mediante la técnica de RT-PCR. Para este fin se utilizaron los oligonucleótidos degenerados Tre300 5' TATTAYTGGGATTCYTATTGG 3' y Tre351 5' CTGTTASTRTATRAWGCTCT 3', que fueron diseñados en base a una región conservada entre las secuencias codificantes reportadas en el banco de datos (Entrez, NCBI) para la enzima trehalasa de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; acceso AAF22127), papa (*Solanum tuberosum*, acceso A67882) y soya (*Glycine max*; acceso AAD22970). El alineamiento de las secuencias se hizo utilizando el método Clustal (SoftWare DNA Star).

Amplificación de la secuencia interna del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

La amplificación del cDNA se realizó con el sistema AMV-RT^{MR} Enhanced Avian (SIGMA), partiendo de 1 µg de RNA total extraído de tejido total de plántulas de alfalfa (variedad CUF-101) germinadas *in vitro* en medio MS^{MR} (Murashige y Skooge mezcla de sales. SIGMA) según el protocolo de Tri Reagent^{MR1}. Las semillas fueron proporcionadas por el CELALA/INIFAP. Posteriormente, el RNA extraído se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1%/TBE (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA pH 8.0)/DEPC y se tiñó con bromuro de etidio, para visualizar su calidad (Sambrook y Russell, 2001) en un transiluminador de luz UV EPI-Chemi Darkroom^{MR} (UVP Laboratory Products). Posteriormente, se realizaron mediciones en un espectrofotómetro UV-vis MINI 1240^{MR} (Shimadzu, Inc.), para determinar la cantidad de RNA mediante Abs_{260nm} y la concentración de RNA se ajustó a 500ng/µl en todas las muestras.

Para la reacción de RT se utilizaron las condiciones indicadas por el fabricante, utilizando el oligo d[T]₂₃^{MR} (SIGMA). Posterior a la síntesis de cDNA, se llevó a cabo la amplificación por PCR en un termociclador PTC-100^{MR} (MJ Research, Inc.), utilizando los oligos degenerados Tre300 y Tre351 (Tabla 1).

¹ Anexo III

Tabla 1. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para el fragmento interno de la trehalasa de alfalfa a partir de cDNA.

REACCION		CONDICIONES
cDNA	3.0 µl	
dNTPs 10mM	1.0 µl	1x (94°C 3 min)
oligo Tre300 100ng/µl	2.0 µl	5x (94°C 1 min; 55°C 1 min; 72°C 1 min)
oligo Tre351 100ng/µl	3.0 µl	30x (94°C 1 min; 50°C 1 min; 72°C 1 min)
Taq	1.0 µl	1x (72°C 8 min)
buffer PCR 10x	1.0 µl	
agua	39.0 µl	
volumen	50.0 µl	

Posteriormente, la secuencia interna obtenida por RT-PCR fue clonada en el vector pGEM-T Easy Vector^{MR} (Promega, Inc. Mapa 1)², originando el plásmido pGEM-TRE, que fue purificado para su caracterización enzimática con *EcoRI* y para su posterior secuenciación. En base a la secuencia obtenida, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar los extremos 3' y 5' del cDNA.

Obtención del extremo 3' del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

Para el protocolo de 3'RACE³ se utilizó el cDNA sintetizado anteriormente. Con este cDNA se procedió a una primera amplificación por PCR, utilizando los oligos específicos 3Tre300 (5'-ACCAATCTCATTTCATTGAT-3') y 5T18HXS (5'-GTCGACTCTAG AAGC[T]₁₈-3') (Tabla 2).

A esta amplificación siguió un PCR semianidado, utilizando los oligos específicos 3Tre320 (5'-CGGGTTTGTGCTTAATGGTG-3') y 5T18HXS (Tabla 3). La secuencia amplificada se clonó en el vector TOPO TA pCR2.1^{MR} (Invitrogen, Inc. Mapa 2)⁴, originando el plásmido TOPO-3Tre, el cual fue purificado para su caracterización enzimática *EcoRI* y su posterior secuenciación y manipulación.

² Anexo I

³ Anexo III

⁴ Anexo I

Tabla 2. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para el primer PCR del protocolo 3'RACE para la trehalasa de alfalfa.

REACCION		CONDICIONES
cDNA	3.0 µl	1x (94°C 3 min) 5x (94°C 1 min; 42°C 1 min; 72°C 3 min) 30x (94°C 1 min; 50°C 1 min; 72°C 3 min) 1x (72°C 8 min)
dNTPs 10mM	1.0 µl	
oligo 3'Tre300 100ng/µl	1.0 µl	
oligo 5'T18HXS 100ng/µl	1.0 µl	
Taq	1.0 µl	
buffer PCR 10x	1.0 µl	
agua	42.0 µl	
volumen	50.0 µl	

Tabla 3. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para el PCR semianidado del protocolo 3'RACE para la trehalasa de alfalfa.

REACCION		CONDICIONES
producto de PCR	3.0 µl	1x (94°C 3 min) 5x (94°C 1 min; 45°C 1 min; 72°C 75 seg) 30x (94°C 1 min; 57°C 1 min; 72°C 75 seg) 1x (72°C 8 min)
DNTPs 10mM	1.0 µl	
oligo Tre320 100ng/µl	1.0 µl	
oligo 5'T18HXS 100ng/µl	1.0 µl	
Taq	1.0 µl	
buffer PCR 10x	1.0 µl	
agua	42.0 µl	
volumen	50.0 µl	

Obtención del extremo 5' del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

Para la obtención del extremo 5' del cDNA de la trehalasa de alfalfa se utilizó el sistema GeneRacer^{MR}, el cual se basa en la obtención de moléculas completas de RNA mensajero y su subsecuente modificación en el extremo 5'. Para ello, el RNA total de la muestra es sometido a una desfosforilación en su extremo 5' con lo que se excluye del proceso a las moléculas truncadas; en seguida, los RNAm completos son decapitados (remoción de la estructura CAP) y posteriormente ligados por su extremo 5' al oligo de RNA

Gene Racer^{MR}. En este protocolo se partió de 3µg del RNA total manejado con anterioridad, siguiendo las indicaciones del fabricante para la desfosforilación del RNA, la remoción de la estructura CAP y su subsecuente ligación. A partir de este RNAm modificado, se procedió a la síntesis de la cadena complementaria (cDNA) utilizando el sistema AMV-RT^{MR} (SIGMA) el cual se utilizó como templado en la amplificación por PCR utilizando los oligos GeneRacer5^{MR} (5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3') y 5Tre350 (5'-AAACCCGTATTCCTCAATCA-3') (Tabla 4).

Tabla 4. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para el PCR del protocolo GeneRacer para la trehalasa de alfalfa.

REACCION		CONDICIONES
cDNA	3.0 µl	1x (94°C 3 min)
dNTPs 10mM	1.0 µl	
oligo 5Tre350 100ng/µl	1.0 µl	5x (94°C 1 min; 45°C 1 min; 72°C 75 seg)
oligo GR5' 100ng/µl	1.0 µl	
Taq	1.0 µl	30x (94°C 1 min; 57°C 1 min; 72°C 75 seg)
buffer PCR 10x	1.0 µl	
agua	42.0 µl	1x (72°C 8 min)
volumen	50.0 µl	

La secuencia amplificada se clonó en el vector TOPO TA pCR2.1^{MR}, dando lugar al plásmido TOPO-5Tre, el cual fue purificado para su caracterización enzimática con *EcoRI* y su posterior secuenciación y manipulación.

Análisis estructural de la secuencia del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

Después de obtener la secuencia completa de cDNA de trehalasa de alfalfa, se procedió a su análisis, para lo cual se llevó a cabo un alineamiento de la misma con las secuencias reportadas anteriormente para *Arabidopsis*, soya y papa, y con la de arroz recientemente reportada (acceso AAG13442), utilizando el método Clustal (DNA Star). De esta manera se determinó el porcentaje de homología entre especies y se ubicaron las regiones conservadas entre las mismas, lo que permite llevar a cabo una genealogía de las mismas.

Análisis de expresión espacial del gen de la trehalasa de alfalfa.

Posterior al análisis de la estructura de la secuencia, procedimos a hacer un análisis de expresión espacial de este gen en plantas de alfalfa, para lo cual se extrajo RNA total según el método del TriReagent^{MR} de los diferentes órganos por separado (flor, F; brote apical, BA; hoja, H; nodo, N; internodo, I; y raíz, R). Posterior al análisis cualitativo por electroforesis en agarosa 1%/TBE DEPC (SIGMA), se procedió a determinar la concentración de RNA por medio de espectrofotometría a Abs_{260nm}. Las muestras se ajustaron a una concentración de 1µg/µl, y se llevó a cabo la síntesis de cDNA con el sistema AMV-RT^{MR} (SIGMA), utilizando 1 µg de RNA total. A partir del cDNA obtenido, se realizó la amplificación de un fragmento de 560 pb de la secuencia de la trehalasa, utilizando los oligos específicos 3Tre300 y TreNsiRw (5'-TTGATTTAAATGCATTTCTACCCGGG-3'), según se muestra (Tabla 5).

Tabla 5. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para el fragmento de 560 pb de la trehalasa de alfalfa.

REACCION		CONDICIONES
cDNA	3.0 µl	1x (94°C 3 min) 35x (94°C 1 min; 52°C 1 min; 72°C 30 seg) 1x (72°C 8 min)
dNTPs 10mM	1.0 µl	
oligo 3Tre320 100ng/µl	1.0 µl	
oligo 5T18HXS 100ng/µl	1.0 µl	
Taq	1.0 µl	
buffer PCR 10x	1.0 µl	
agua	42.0 µl	
volumen	50.0 µl	

Como control de la expresión se amplificó un fragmento del gen de la β-tubulina de alfalfa, con el par de oligos diseñados a partir de la secuencia reportada (Acceso AJ319667): MS b-tubFw (5'-GAACTCACACAGCAAATGTGGG-3') y MS b-tubRw (5'-AGATCGTTCATGTTGCTCTCCG-3'), según se muestra en la Tabla 6. Estos oligos amplifican una secuencia de 400 pb de dicho gen.

Tabla 6. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para la secuencia de la β -tubulina.

REACCION		CONDICIONES
producto de PCR	3.0 μ l	1x (94°C 3 min)
dNTPs 10mM	1.0 μ l	
oligo b-tubFw 100ng/ μ l	1.0 μ l	35x (94°C 1 min; 52°C 1 min; 72°C 30 seg)
oligo b-tubRw 100ng/ μ l	1.0 μ l	
Taq	1.0 μ l	1x (72°C 8 min)
buffer PCR 10x	1.0 μ l	
agua	42.0 μ l	
volumen	50.0 μ l	

Clonación de la secuencia promotora rd29A de *Arabidopsis thaliana* en un vector de expresión en plantas.

Para poder dirigir la expresión del antisentido de trehalasa de manera inducible por condiciones de estrés osmótico y evitar así los efectos adversos reportados como resultado de la acumulación constitutiva de la trehalosa, se procedió a clonar la secuencia promotora del gen de respuesta a estrés *rd29A* de *A. thaliana*.

Amplificación de la secuencia promotora rd29A.

Para el fin propuesto, se amplificó por PCR la secuencia promotora *rd29A* a partir de DNA genómico extraído⁵ de tejido foliar de plántulas de *Arabidopsis* germinadas *in vitro* en medio MS. Las semillas fueron proporcionadas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM-Cuernavaca. Para la amplificación se diseñaron los oligos Frd29Hind (5'-AAGCTTGGAGGAGCCATAGATGCA-3') y Rrd29Xba (5'-TCTAGATTTTTTCTTTC CAATAG-3'), en base a la secuencia promotora reportada (acceso D13044). Este par de oligos amplifican el fragmento comprendido del nucleótido 4563 al 5504, y lo flanquean con los sitios *HindIII* y *XbaI*.

⁵ Anexo III

La secuencia amplificada no contiene la secuencia del elemento de respuesta a ABA de la secuencia promotora completa. El producto de PCR de la reacción mostrada en la Tabla 7, se clonó en el vector TOPO TA pCR2.1^{MR} para dar lugar al plásmido TOPO-rd29.

Tabla 7. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para la secuencia promotora rd29A a partir de DNA genómico de *A. thaliana*.

REACCION		CONDICIONES
DNA genómico	1.0 µl	1x (94°C 3 min) 35x (94°C 1 min; gradiente de 50- 52-54 y 56°C 1 min; 72°C 75 seg) 1x (72°C 8 min)
dNTPs 10mM	1.0 µl	
oligo Frd29Hind 100ng/µl	1.0 µl	
oligo Rrd29Xba 100ng/µl	1.0 µl	
Taq	1.0 µl	
buffer PCR 10x	1.0 µl	
agua	42.0 µl	
volumen	50.0 µl	

Clonación del promotor rd29A en un vector de expresión en plantas.

Posteriormente la secuencia promotora rd29A se liberó del vector TOPOrd29 mediante una digestión enzimática con las endonucleasas HindIII y XbaI, y se subclonó en los mismos sitios del vector pBI-121^{MR} (Clontech, Inc. Mapa 5)⁶. En dicho vector, rd29A sustituye al promotor 35S CaMV, dando lugar a la construcción prd29A:GUS.

Clonación de la secuencia de la trehalasa en antisentido bajo el control de los promotores 35S CaMV y rd29A.

Para expresar en plantas la secuencia de trehalasa en antisentido bajo los promotores 35S y rd29A, se seleccionó primeramente un fragmento interno de 560 pb de la secuencia, que incluye pequeñas regiones conservadas entre las diferentes trehalasas de plantas.

⁶ Anexo I

Amplificación de la secuencia trehalasa a utilizarse como antisentido.

Para obtener los vectores para la inhibición de la expresión de la trehalasa por antisentido en plantas, se diseñó un par de oligonucleótidos que amplifican el fragmento interno seleccionado, y lo flanqueado con los sitios *SacI* (en el extremo 5') y *XbaI* (en el extremo 3'). Esta secuencia se amplificó según la reacción de la Tabla 8, a partir de DNA plasmídico del vector TOPO-3Tre.

El producto de PCR fue clonado en el vector TOPO TA pCR2.1^{MR}, dando lugar a los plásmidos TOPO-tre560s y TOPO-tre560as, debido a la inserción del fragmento en ambos sentidos dentro del vector. La dirección del fragmento se determinó mediante digestión *NsiI*, con respecto a los sitios *SacI* y *XbaI* del plásmido (dirección sentido: *Sac*-*Xba*; dirección antisentido: *Xba*-*Sac*).

Tabla 8. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para el fragmento interno de 560 pb de la trehalasa de alfalfa.

REACCION	CONDICIONES
plásmido 3Tre 10ng/ μ l	1.0 μ l
dNTPs 10mM	1.0 μ l
oligo 3Tre300 100ng/ μ l	1.0 μ l
oligo TreNsiRw 100ng/ μ l	1.0 μ l
Taq	1.0 μ l
buffer PCR 10x	1.0 μ l
agua	42.0 μ l
volumen	50.0 μ l
	1x (94°C 3 min)
	35x (94°C 1 min; 56°C 1 min; 72°C 75 seg)
	1x (72°C 8 min)

Clonación del fragmento de la secuencia trehalasa antisentido en los vectores de expresión en plantas.

Para dirigir la secuencia de trehalasa en orientación antisentido en los plásmidos con los promotores 35S (pBI-121) y rd29A (prd29A:GUS), dicho fragmento de trehalasa se liberó del vector TOPO Tre560s mediante digestión *SacI*-*XbaI*, y se subclonó en los mismos sitios de restricción *XbaI* y *SacI* de dichos plásmidos, dando lugar a los plásmidos p35S:TreAS y prd29:TreAS. En ambos vectores, el fragmento antisentido sustituye al gen

GUS y es precedido por la región NOS ter (región terminadora del gen de la nopalina sintasa).

Obtención de plantas transgénicas de tabaco para las construcciones rd29A:TREas y 35S:TREas, y sus respectivos controles: rd29A:GUS y 35S:GUS.

Para obtener plantas transgénicas de tabaco (*N. tabacum* L. cv Xhanti) que expresen el antisentido de la enzima trehalasa, bajo el control de los promotores 35S y rd29A, los plásmidos p35S-TREas y prd29A:TREas se integraron mediante biobalística a explantes de tabaco creciendo en cultivo axénico (proporcionadas por el CINVESTAV-Irapuato). Con el objetivo de evaluar las líneas transformantes, tanto en la actividad enzimática trehalasa como en su fenotipo de crecimiento y desarrollo, se obtuvieron también líneas transgénicas controles de tabaco, que llevan los plásmidos pBI-121 (35S:GUS) y prd29A:GUS.

Preparación y bombardeo de micro partículas con DNA.

Para el bombardeo de las partículas/DNA se utilizó el sistema de Helio de alta presión PDS 1000-He^{MR}. La preparación de las partículas de tungsteno, el recubrimiento con el DNA y los parámetros de bombardeo (Tabla 9), se realizaron según el protocolo publicado por Cabrera *et al* (1997)⁷, utilizando 6 cajas por cada construcción de DNA bombardeada.

Tabla 9. Parámetros de bombardeo de partículas de DNA en la transformación de tabaco con las construcciones p35S:TREas, prd29:TREas, p35S:GUS y prd29:GUS.

Presión de bombardeo	800 psi
Número de disparos por placa	1
Tamaño de partículas	M10 (0.73 µm)
Concentración de partículas	125 µg/disparo
Concentración de DNA	1.67 µg/disparo
Vacío	0.07 Atmósferas
Distancia recorrida por partículas	7.0 cm

⁷ Anexo III

Regeneración y cultivo de tejidos de plantas transformantes.

La regeneración de las plantas transgénicas se llevó a cabo según el protocolo de Herrera y Simpson (1988)⁸ utilizando Kanamicina 200mg/L como agente de selección. Tanto la regeneración como la propagación *in vitro* de las líneas transformantes, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Transformación de Plantas del CINVESTAV/Irapuato, y en el Laboratorio de Manipulación Genética de la FCB/UANL.

Detección de los transgenes en las líneas transformantes.

Después de obtener plantas por selección a kanamicina a partir del bombardeo de las diferentes construcciones manipuladas, se procedió a detectar la integración de los transgenes en el genoma de las plantas mediante amplificación por PCR de las secuencias TREas y GUS. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos 3Tre300 y TreNsiRw que amplifican la secuencia TREas, y se diseñó el par de oligos GUS-Fw (5'-ATGCAT GATATCTACCCGCTTCGCGT-3') y GUS Rw (5'-CCCGGGTTGTTTGCCTCCCTG CTGCG-3') para amplificar una secuencia interna de 1.0 Kb del gen GUS. A partir de DNA genómico extraído de las diferentes líneas transgénicas, se llevaron a cabo las reacciones de PCR según se indican en las Tablas 10 y 11, respectivamente.

Tabla 10. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para el transgen TREas de 560 pb en las líneas transgénicas para el antisentido.

REACCION		CONDICIONES
DNA genómico	1.0 µl	1x (94°C 3 min)
dNTPs 10mM	1.0 µl	
oligo 3Tre300	100ng/µl 1.0 µl	35x (94°C 1 min; 53°C 1 min; 72°C 45 seg)
oligo TreNsiRw	100ng/µl 1.0 µl	
Taq	1.0 µl	1x (72°C 8 min)
buffer PCR 10x	1.0 µl	
agua	42.0 µl	
volumen	50.0 µl	

⁸ Anexo III

Tabla 11. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para una secuencia interna de 1.0 Kb del transgen GUS en las líneas transgénicas control.

REACCION		CONDICIONES
DNA genómico	1.0 µl	1x (94°C 3 min)
dNTPs 10mM	1.0 µl	
oligo GUS Fw 100ng/µl	1.0 µl	35x (94°C 1 min; 54°C 1 min; 72°C 1 min)
oligo GUS Rw 100ng/µl	1.0 µl	1x (72°C 8 min)
Taq	1.0 µl	
buffer PCR 10x	1.0 µl	
agua	42.0 µl	
volumen	50.0 µl	

Determinación de la actividad trehalasa en plantas.

Para evaluar si la estrategia de inhibición por antisentido disminuye la actividad trehalasa en las líneas transgénicas, se realizó un ensayo enzimático para cuantificar la cantidad de glucosa obtenida de una solución 10mM de trehalosa pura (SIGMA) por medio de la enzima trehalasa presente en el extracto vegetal (Dalqvist, 1964)⁹. Para determinar la producción de glucosa se utilizó el sistema GO Assay^{MR} (SIGMA)¹⁰. La cuantificación de glucosa se realizó en un espectrofotómetro UV-vis MINI 1240^{MR} (Shimadzu, Inc.) a Abs_{540nm}. La cantidad de glucosa se ajustó a la concentración de proteína del extracto cuantificada según el método Bradford.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para este ensayo, tanto a las líneas 35S:TREas como a las líneas rd29A:TREas, así como a las de sus respectivos controles y a plantas de tabaco silvestre, todas de la misma edad y mantenidas *in vitro*, se les evaluó su actividad enzimática trehalasa. Los extractos vegetales preparados para dichos ensayos se obtuvieron a partir de 1 gr de tejido vegetal. Como control positivo de estas reacciones se utilizó trehalasa porcina pura (SIGMA).

⁹ Anexo III

¹⁰ Anexo III

Análisis del desarrollo, auxotrofia por sacarosa y comportamiento de azúcares de las líneas transgénicas *in vitro*.

Con el fin de evaluar si la expresión del antisentido conduce a cambios significativos en el desarrollo de la planta, se observó *in vitro* el desarrollo de plantas de las diferentes líneas transgénicas y de tabaco silvestre. Los parámetros a observar y comparar fueron la diferencia en velocidad de crecimiento y la diferencia en vigorosidad.

Con el fin de evaluar si la expresión del antisentido confiere a las plantas de tabaco un mejor desarrollo *in vitro* en ausencia de sacarosa (fuente de carbono común necesaria en cultivo de tejidos de tabaco por su auxotrofia *in vitro*), se observó el desarrollo de plantas de las diferentes líneas transgénicas así como de tabaco silvestre, por un periodo de 4 semanas en el mismo medio de cultivo. Los parámetros a observar y comparar fueron la diferencia en velocidad de crecimiento y la diferencia en vigorosidad.

Por otra parte, en un ensayo preliminar, para observar diferencias en el comportamiento de azúcares, se llevó a cabo un ensayo de cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography), para lo cual se siguió el protocolo propuesto por Haer (1969)¹¹, utilizando placas preparativas de sílica preadsorbente Uniplate^{MR} de 250µm de grosor (Alltech, Inc.). Se utilizaron estándares de glucosa, maltosa, sacarosa y/o trehalosa al 0.1% (Research Organics, Inc.)

Finalmente, en otro ensayo preliminar para evaluar la auxotrofia a sacarosa, se procedió a diferenciar plantas a partir de tejido foliar de dos líneas transgénicas para antisentido y una línea control transgénica, en medio IBA sin sacarosa, con incubación normal a 26°C y fotoperiodo de 16 horas luz/8 hrs oscuridad.

¹¹ Anexo III

RESULTADOS

Clonación y análisis del DNA complementario (cDNA) de la enzima trehalasa de alfalfa.

Puesto que se desconocía la secuencia del cDNA de trehalasa de alfalfa, procedimos inicialmente a analizar secuencias nucleotídicas de las trehalasas de plantas ya reportadas en los bancos de secuencias de DNA, con el fin de identificar una región conservada entre ellas que nos permitiera el diseño de oligonucleótidos para su amplificación.

Identificación y clonación de una secuencia conservada entre las trehalasas de plantas, a partir de alfalfa.

Como se muestra en la Figura 1, se compararon las secuencias codificantes de las trehalasas de papa, soya y *A. thaliana*, mediante el método Clustal del programa MegAlign^{MR}, y se encontró una región que es la más conservada entre dichas especies. En dicho alineamiento, las secuencias de cada especie se posicionan en base a su homología y se indica el número de nucleótido correspondiente a cada una de ellas. Como se observa en las bases nucleotídicas marcadas en color rojo, se tienen dos regiones de aproximadamente 20 nucleótidos con mayor homología que el resto de la secuencia mostrada. Dichas regiones nos permitieron el diseño de oligonucleótidos degenerados que se indican en color azul, y que amplifican 146 pb de la secuencia.

En base al alineamiento anterior se diseñaron los oligos Tre300 (5'-TATTAYTG GGATTCYTATTGG-3') y Tre351 (5'-CTGTTASIRTATRAWGCTCT-3'), que se utilizaron para amplificar esta región a partir de RNA de alfalfa mediante una reacción de RT-PCR. Para esto inicialmente se obtuvo RNA total de plantas completas de alfalfa germinadas *in vitro* (variedad CUF-101) con el protocolo del TriReagent^{MR}. En la Figura 2 se observa el RNA purificado de alfalfa, donde son evidentes los RNA ribosomales 28S y 18S, lo cual indica que se obtuvo RNA en buenas condiciones.

SOYA	605	CGCGAGGTTT	ATTACTGGGA	TTCTATTGG	GTTATTAGGG	644
PAPA	711	AAGGAGGTTT	ATTATTGGGA	TTCTATTGG	GTAATAAGGG	750
ARABIDOPSIS	676	AGAGAAGTCT	ATTACTGGGA	TTCTATTGG	GTCATCAAAG	715
CONSENSO	...	GA GT T	ATTA TGGGA	TTC TATTGG	GT AT A	...
Oligo		Tre300 5't attaytggga ttcytattgg gt				
SOYA	645	GCCTGCTGGC	CAGTCAAATG	CATGACACAG	CTAAGGCTAT	684
PAPA	751	GTTTGTTAGC	AAGCAAATG	TATGAAACTG	CAAAAGGGAT	790
ARABIDOPSIS	716	GACTTATGAC	GAGTCAAATG	TTCCTACTACCG	CCAAAGGTTT	755
CONSENSO	...	T T C	AG AAATG	AC G C	AAAG T	...
SOYA	685	TGTCACCAAT	CTCATTTCCT	TGATAGATAA	ATATGGCTTT	724
PAPA	791	TGTGACTAAT	CTGGTTTCTC	TGATAGATCA	ATTTGTTTAT	830
ARABIDOPSIS	756	AGTGACGAAT	TTGTGGAGAC	TTATGGTTAC	GCTTGAACG	795
CONSENSO	...	GT AC AAT	T	T AT G T	T G	...
SOYA	725	GTTCTTAATG	GGGCTAGAGC	TTACTFACACT	AACAGGAGCC	764
PAPA	831	GTTCTTAACG	GTGCAAGAGC	ATACTACAGT	AACAGAAGTC	870
ARABIDOPSIS	796	GCTTTGAACG	GTGCTAGAGC	TTATFATACT	AACAGAAGCC	835
CONSENSO	...	G T T AA G G	GC AGAGC	TA TA A T	AACAG AG C	...
cadena complementaria			3' TCTCG	AT AT T A	TTGTC 5'	
Oligo		Tre351 3' tctcgwatrtrtsa ttgtc 5'				

Figura 1. Homología entre las secuencias codificantes de trehalasas de origen vegetal reportadas: soya (nt 605-764), papa (nt 711- 870), Arabidopsis (nt 676-835). En rojo se muestra los nucleótidos consenso. En azul se muestra la secuencia de los oligonucleótidos degenerados para amplificar la secuencia de 146 pb comprendida entre ambas regiones conservadas. nt = nucleótido, pb = par de base nucleotídica.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 2. Extracción de RNA total de alfalfa (variedad CUF-101), con el reactivo TriReagent. Líneas 1-3: 5µl de muestra de tres extracciones independientes.



1 µg de este RNA fue utilizado para la reacción de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos Tre300 y Tre350. Inicialmente, el producto de la reacción de la transcripción

reversa se sometió a una reacción de PCR utilizando un gradiente de temperaturas en el paso de hibridación de los oligos (Figura 3A). Con este procedimiento se observó la amplificación de un fragmento de cerca de 150 pb a 52 y 54°C, el cual corresponde al tamaño esperado de la región conservada entre las diferentes trehalasas. En base a este experimento seleccionamos la temperatura de 54°C para hacer una nueva amplificación de la región (Figura 3B) logrando amplificar nuevamente un fragmento del tamaño esperado de 150 pb.

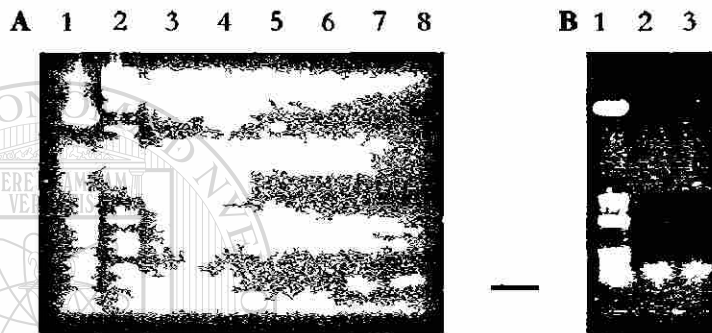


Figura 3. Amplificación por RT-PCR de un fragmento interno del cDNA de la trehalasa de alfalfa. A, PCR de gradientes de temperatura: carril 1, marcador 125 pb (BioLine); carril 2, marcador 1 Kb (GIBCO); carriles 3-8, producto de amplificación PCR en gradiente de las temperaturas 62°C, 60°C, 58°C, 56°C, 54°C y 52°C, respectivamente. B, PCR a temperatura 54°C: carril 1, marcador 125 pb; carriles 2 y 3, producto PCR.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

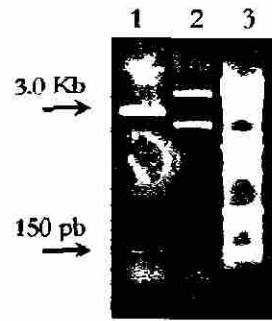
®

El producto de PCR amplificado se ligó en el vector de clonación pGEM-T Easy Vector, para obtener el plásmido pGEM-TRE¹ (Mapa 5). Este plásmido se caracterizó mediante digestión enzimática EcoRI, como se observa en la Figura 3, donde se muestra el fragmento de PCR de 150 pb liberado del vector TOPO pCR2.1^{MR} de 3.9 Kb. A dicho plásmido se le determinó la secuencia nucleotídica para corroborar que realmente se trataba de la secuencia de trehalasa. El resultado confirmó que el producto de PCR amplificado era homólogo a los cDNAs de trehalasa ya reportados (Secuencia 1)².

¹ Anexo I

² Anexo II

Figura 4. Caracterización del plásmido pGEM-TRE mediante digestión enzimática *EcoRI*. carril 1, plásmido pGEM-TRE digerido con *EcoRI*: banda superior correspondiente al plásmido, banda inferior de 150pb correspondiente al fragmento de PCR clonado; carril 2, plásmido pTRE sin digerir; línea 3) marcador de 1 kb.



Obtención del extremo 3' del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

Después de obtener la secuencia interna del cDNA de la trehalasa de alfalfa, se procedió a amplificar los extremos del mismo. Para ello se siguió la estrategia de 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), como se muestra en la Figura 5.

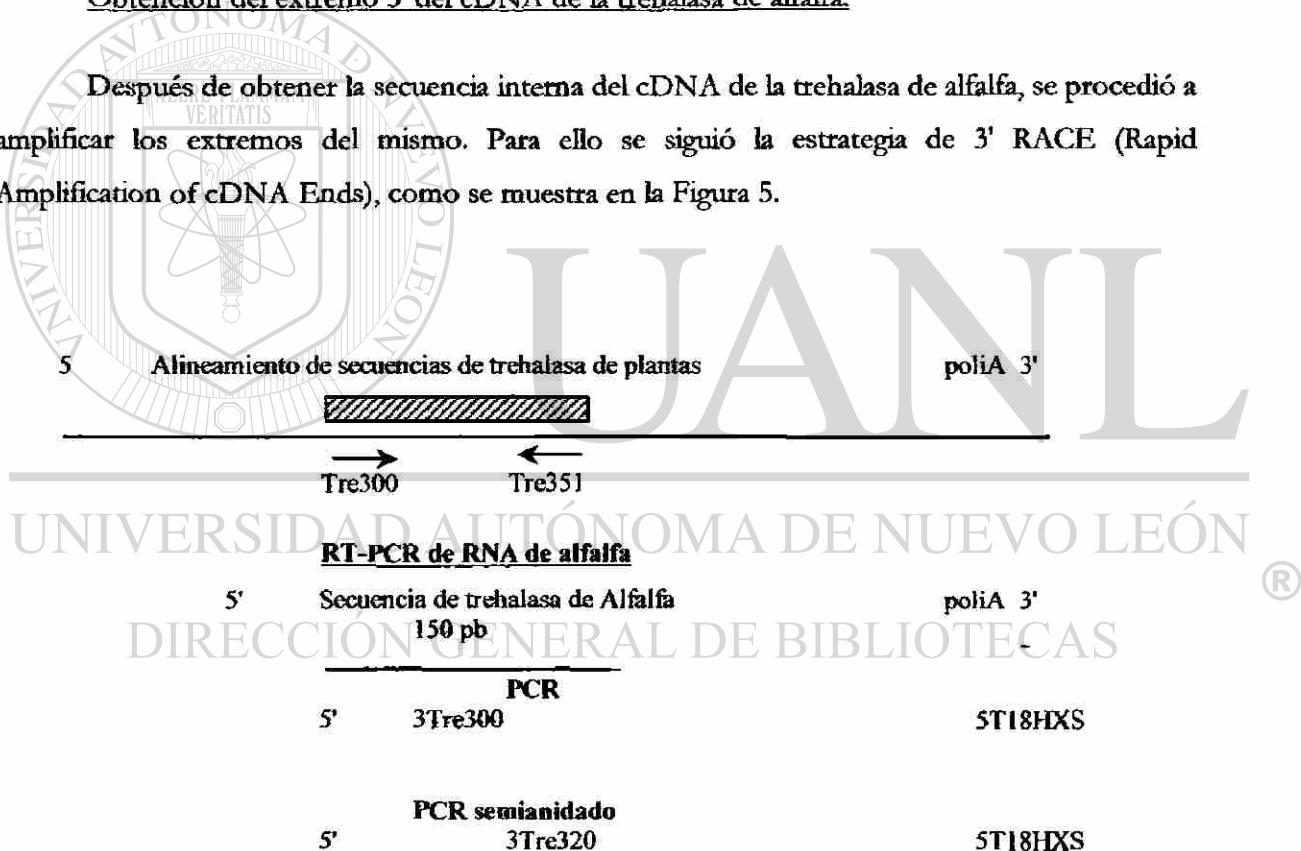
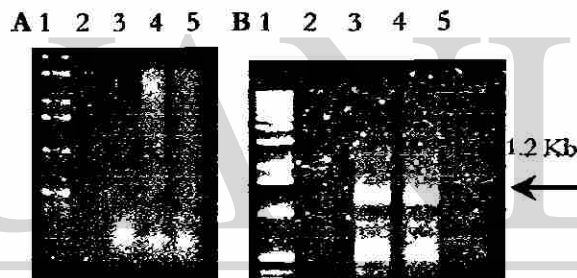


Figura 5. Esquema de las estrategias 3' RACE para la obtención del extremo 3' del cDNA de la trehalasa de alfalfa. En rojo: longitud consenso de las secuencias de las trehalasas de planta. Caja en diagonales: región conservada de 146 pb. En verde oscuro: región conservada de 146 pb amplificada en alfalfa. En azul claro: estrategia 3'RACE. Línea intermitente: longitud esperada. Flechas: corresponden a la posición de los oligos diseñados.

Para seguir la estrategia 3' RACE, se diseñaron los oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia interna de 146 pb obtenida (según se muestra en la Figura 5), 3Tre300 (5'-ACCAATCTCATTTCATTGAT-3') y 3Tre320 (5'-CGGGTITGTGCTTAATGGTG-3'), y un oligo para hibridar a la cadena de PoliA 5T18HXS (5'-GTCGACTCTAG AAGC[T]₁₈-3').

Apartir del cDNA amplificado con el oligonucleótido dT[23]^{MR} en la reacción de transcripción reversa con el sistema AMV-RT, se obtuvo en una primera reacción de PCR con los oligos 3Tre300 y 5T18HXS una amplificación de DNA no específica, como se observa en la Figura 6A, con una temperatura de 50°C de alineamiento de oligonucleótidos y un tiempo de síntesis de DNA de 3 min. A partir de este producto de amplificación, se prosiguió con una reacción de PCR semianidada con los oligos 3Tre320 y 5T18HXS y una temperatura de alineamiento de 57°C. Con este procedimiento se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1.2 Kb (Figura 6B).

Figura 6. Amplificación del extremo 3' del cDNA de trehalasa mediante 3' RACE. A, Primer PCR; carril 1, marcador 1 kb; carril 2, control sin Taq; carril 3, control sin cDNA; 4 y 5, cDNA. B. Amplificación semianidada para 3'RACE: carril 1, 1kb; carril 2, control sin Taq; 3 y 4, producto de PCR; y 5, control sin DNA.



El producto de PCR de 1.2 kb se clonó en el plásmido TOPO TA pCR2.1, resultando el plásmido TOPO 3Tre (Mapa 6)³, el cual se caracterizó por digestión enzimática *Eco*RI, como se muestra en la Figura 7, donde se observa la liberación del fragmento clonado de 1.2 Kb y la banda de 3.9 Kb correspondiente al vector. Este plásmido se sometió a secuenciación, de donde la secuencia nucleotídica (Secuencia 2)⁴ del fragmento clonado resultó ser homóloga a las secuencias de trehalasas reportadas para soya y *Arabidopsis*, e incluye la región 3' no traducible (3'UTR) del RNAm (RNA mensajero).

³ Anexo I

⁴ Anexo II

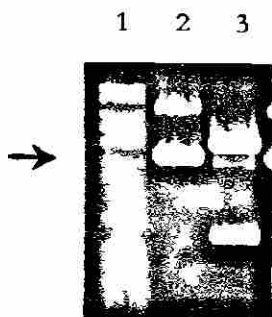


Figura 7. Caracterización del plásmido TOPO-3TRE mediante digestión enzimática *EcoRI*. Carril 1, marcador de 1 kb; carril 2, plásmido TOPO-3TRE sin digerir; carril 3, plásmido TOPO-3TRE digerido con la enzima *EcoRI*: banda superior correspondiente al plásmido, banda inferior de 1.2 Kb correspondiente al fragmento de PCR clonado

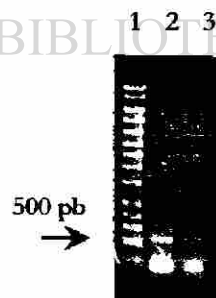
Obtención del extremo 5' del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

Finalmente, para obtener el extremo 5' del cDNA, se utilizó el sistema GeneRacer^{MR}, el cual está basado en el sistema RACE, pero sustituye la adición de bases al extremo 5' del cDNA, con un paso de ligación de un oligonucleótido de RNA en el extremo 5' de los RNAm a los cuales se les ha removido la estructura 5'CAP, asegurando la obtención de RNA mensajeros de longitud completa. A partir del RNA modificado con este sistema se obtuvo una banda de 0.5 kb en la primera amplificación de PCR (Figura 8), utilizando los GeneRacer5'^{MR} (5'-CGACTGGA GCACGAGGACTGA-3') y 5Tre350 (5'-AAACCCGTATTCCTCAATCA-3').

Este fragmento amplificado fue clonado en el vector TOPO TA pCR2.1^{MR}, dando lugar al plásmido TOPO 5Tre (Mapa 7)⁵. La secuencia del producto amplificado y clonado, presenta homología con las trehalasas de origen vegetal reportadas (Secuencia 3)⁶.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 8. Amplificación del extremo 5' del cDNA de trehalasa de alfalfa, mediante el sistema Gene Racer. carril 1, marcador de 200 líneas Bioline; carril 2, cDNA producto de PCR; carril 3, control negativo de la reacción.



⁵ Anexo I

⁶ Anexo II

Análisis estructural de la secuencia del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

A partir de las secuencias del cDNA de la trehalasa de alfalfa (MSTRE; MS: *Medicago sativa*, TRE: trehalasa) amplificada mediante los protocolos de RT-PCR, 3'RACE y GeneRacer, se procedió a obtener un contingente con la secuencia completa, identificando la secuencia codificante y sus regiones 5' y 3' no traducibles (Figura 9A y B), con ayuda del programa MegAlign^{MR}. La secuencia codificante obtenida se analizó y se comparó con las secuencias reportadas.

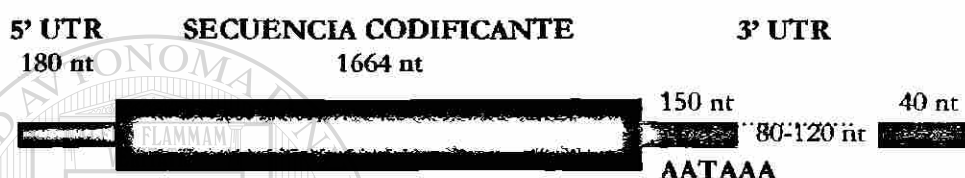


Figura 9. Estructura del cDNA de la enzima trehalasa de alfalfa. Región 5' no traducible (promedio de 180 nt) en rosa, secuencia codificante (1664 nt), y región 3' no traducible (variable de 200, 270 y 310 nt) en verde. Se indica la señal de poliadenilación a los 135 nt del 3'UTR. La barra verde indica la longitud de secuencia con homología entre las clonas obtenidas, mientras que las líneas punteadas indican regiones no homólogas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

a) Homología de la secuencia de aminoácidos con las trehalasas de planta reportadas.

Con el fin de observar el grado de conservación de la enzima trehalasa de alfalfa con las trehalasas de origen vegetal reportadas, se realizó un alineamiento, utilizando el método Clustal (DNA Star), de las secuencias de *Arabidopsis* (acceso AAF22127), papa (acceso A67882), arroz (acceso AAG13442) y soya (acceso AAD22970), y se determinó una homología del 74%, con dominios conservados entre ellas, como se muestra en la Figura 10.

b) Genealogía de la trehalasa de alfalfa.

Con el programa ESE (NCBI) se determinó que la trehalasa de alfalfa está más emparentada con la de soya (ambas leguminosas), y más alejada a las de arroz y papa (Figura 11).

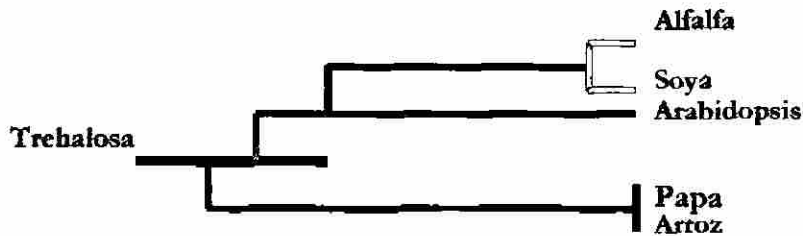
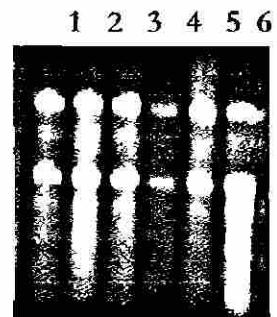


Figura 11. Diagrama de la relación filogenética que presenta la secuencia codificante de la enzima trehalasa de alfalfa con relación a las secuencias reportadas para las trehalasas de origen vegetal.

Análisis de expresión espacial del gen de la trehalasa de alfalfa.

Después de analizar la estructura de la secuencia, se procedió al análisis de expresión espacial de la trehalasa en alfalfa, mediante un ensayo de RT-PCR con el sistema AMV-RT^{MR}. La síntesis de cDNA se realizó con 1µg de RNA total extraído según el método del TriReagent^{MR} de los siguientes órganos por separado: flor (F), brote apical (BA), hoja (H), nodo (N), internodo (I) y raíz (R), el cual fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1%/TBE DEPC, según se muestra en la Figura 12.

Figura 12. Extracción de RNA total de los diferentes órganos de alfalfa (variedad CUF-101), con el reactivo TriReagent^{MR}. carril: 1, flor; 2, brote apical; 3, hoja; 4, nodo; 5, internodo y 6, raíz. Se cargaron 3µl de muestra por carril.



Utilizando los oligos específicos 3Tre300 y TreNsiRw (5'-TTGATTTAAATGC ATTCTACCCGGG-3'), se procedió a la amplificación por PCR de un fragmento de 560 pb correspondiente a la trehalasa como se observa en la Figura 13A. Al mismo tiempo, como control de la expresión se amplificó un fragmento de 400 pb del gen de la β -tubulina de alfalfa (Figura 13B), con el par de oligos MS b-tubFw (5'-GAACTCACACAGCAAATGTGGG-3') y MS b-tubRw (5'-AGATCGTTCATGTTGCTCTCCG-3'). Mientras que podemos observar que la expresión de la β -tubulina es uniforme en los diferentes órganos de la planta (Figura 13B), el nivel de expresión de la trehalasa es diferente entre los mismos, siendo casi nulo en la flor, y muy fuerte en el tallo (tanto en el nodo como en el internodo). La expresión radicular así como la del meristemo apical (brote apical) es baja, y la de hoja es moderada. Se observa una banda a 600 pb, que no es producto de contaminación de DNA en la muestra de DNA, ya que se realizó un PCR utilizando el RNA total como templado y no hubo amplificación de bandas (Datos no mostrados).

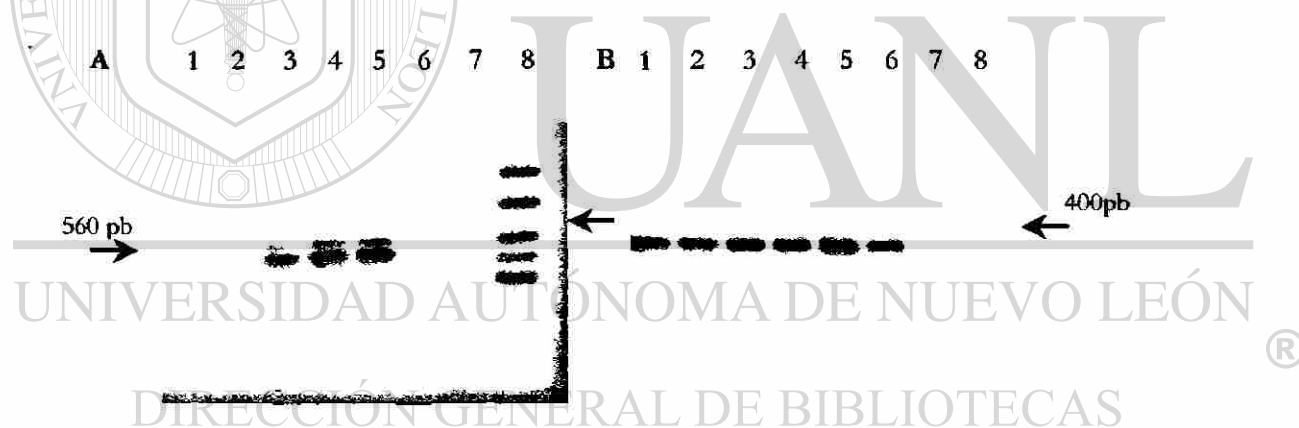


Figura 13. Expresión espacial de la trehalasa de alfalfa. carril: 1, flor; 2, brote apical; 3, hoja; 4, nodo; 5, internodo; 6, raíz; 7, control con RNA y 8, marcador de 200 pb (BioLine). A: RT-PCR para el fragmento de 560 pb de trehalasa. B: RT-PCR para un fragmento de 400 pb del gen de la β -tubulina de alfalfa.

Clonación del la secuencia promotora rd29A de *A. thaliana* y su funcionalidad en tabaco.

Con el fin de dirigir la expresión del antisentido de trehalasa bajo condiciones de estrés osmótico, se amplificó y clonó el promotor rd29A de *A. thaliana* en un vector para expresión en

plantas. Como se mencionó, está reportada la actividad de este promotor tanto en condiciones de salinidad, como de sequía y bajas temperaturas (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1992).

Amplificación y clonación del promotor *rd29A* de *Arabidopsis thaliana*.

Para amplificar la secuencia promotora *rd29A*, se extrajo inicialmente DNA genómico (Figura 14) de plantas *Arabidopsis* germinadas *in vitro*. Para amplificar esta secuencia se diseñaron en base a la secuencia reportada para el gen (Acceso D13044), los oligos *Frd29Hind* (5'-AAGCTTGGAGGAGCCATAGATGCA-3') y *Rrd29Xba* (5'-TCTAGATTTTTTCTTTCC AATAG-3'), los cuales amplifican la secuencia y la flanquean con los sitios de restricción enzimática *Hind*III y *Xba*I. Inicialmente se llevó a cabo una amplificación por PCR con un gradiente de temperaturas de hibridación de los oligos, que va de 50 a 62°C, y con un tiempo de extensión de 1 min 30 seg. La mejor amplificación se obtuvo a 50°C (Figura 15).

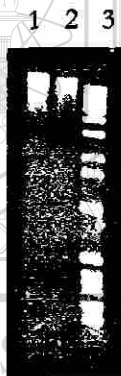


Figura 14. DNA genómico de *Arabidopsis thaliana*. carril: 1, 0.5 µg de DNA; 2, 100 ng de DNA; y 3, marcador de 200 pb (BioLine).

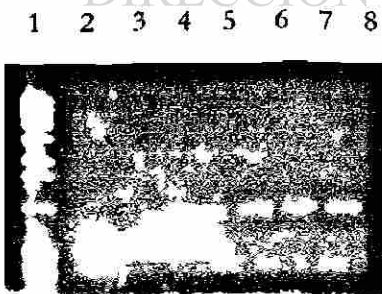
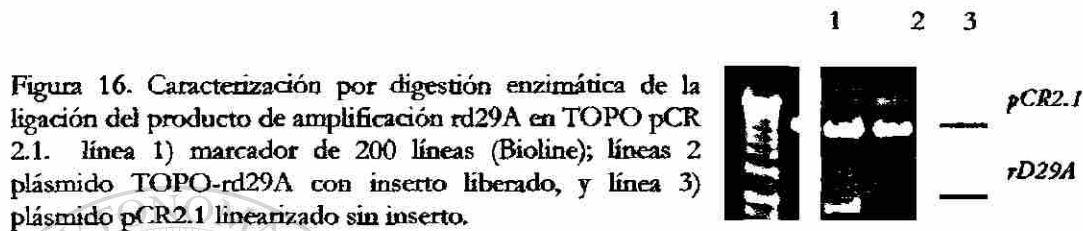


Figura 15. Amplificación por PCR en gradiente de temperatura de la secuencia promotora *rd29A* de *Arabidopsis thaliana*: carril 1, marcador 1 kb; carriles 2- 8, producto de amplificación PCR en gradiente de las temperaturas 62°C, 60°C, 58°C, 56°C, 54°C, 52°C y 50°C, respectivamente.

El producto amplificado a la temperatura de 50°C se clonó en el vector TOPO TA pCR 2.1^{MR}, y se caracterizó por digestión enzimática *EcoRI* (Figura 16). Se obtuvo solamente una clona con inserto, denominada TOPO-rd29A (Mapa 8)⁷, como se observa en la línea 9, donde se muestra la banda correspondiente al vector (3.9Kb) y la correspondiente a rd29A (1.0 Kb).



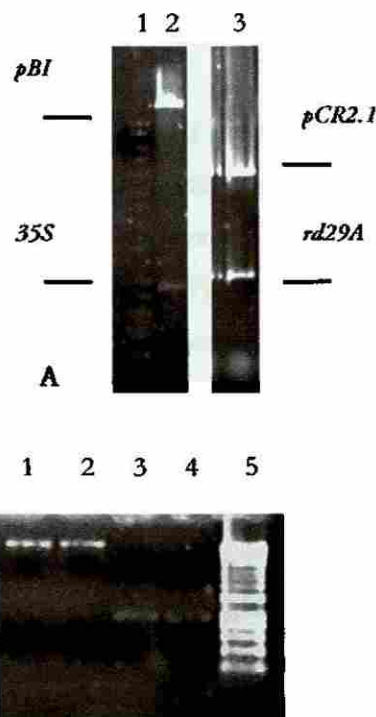
Clonación del promotor rd29A de *A. thaliana* en un vector de expresión en plantas.

Para dirigir con el promotor rd29A la expresión del antisentido de trehalasa en tabaco, se procedió a subclonar la secuencia promotora en el plásmido de expresión en plantas pBI-121^{MR}. Este plásmido (según se muestra en el Mapa 5)⁸ lleva el gen reportero GUS (β -glucoronidasa de *Escherichia coli*) bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), y la región terminadora del gen nopalina sintasa (NOS ter) de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Para dicho fin, se procedió a liberar la secuencia promotora rd29A del plásmido TOPOrd29A, mediante una doble digestión enzimática HindIII/BamHI (Figura 17A). El fragmento correspondiente, de 1.0 Kb, se purificó a partir del gel de agarosa mediante extracción fenol:cloroformo (Figura 16B), y se ligó en los sitios correspondientes en el vector pBI-121^{MR}, sustituyendo al promotor 35S CaMV. Previamente, se siguió con el vector pBI-121 el mismo tratamiento de digestión enzimática y purificación de fragmento que se siguió para el plásmido TOPO rd29A (Figura 17).

⁷ Anexo I

⁸ Anexo I

Figura 17. Caracterizaciones enzimáticas y purificaciones fenol:cloroformo de los fragmentos correspondientes al vector pBI-121 sin la secuencia promotora 35S CaMV, y la secuencia promotora rd29A, obtenidos mediante doble digestión enzimática *Hind*III/*Bam*HI de los plásmidos pBI-121 y TOPO-rd29A, respectivamente. A. Digestiones *Hind*III/*Bam*HI carril 1, marcador de 200 pb; 2, digestión del plásmido pBI-121; y 3, digestión del plásmido TOPO-rd29A. B. carril 1 y 2, fragmento correspondiente al plásmido pBI-121 sin 35S; líneas 3 y 4, fragmento correspondiente al promotor rd29A; y 5, marcador 200pb (BioLine).



Posteriormente, ambos fragmentos purificados, se sometieron a ligación enzimática, y con el producto de ligación se transformaron bacterias calciocompetentes JM109. El DNA plasmídico de las clonas obtenidas por resistencia a ampicilina (100 mg/ml) se analizó por digestión enzimática *Hind*III/*Xba*I (Figura 18), obteniéndose así la construcción prd29A:GUS (Mapa 9)⁹.

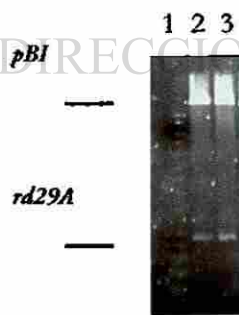


Figura 18. Caracterización enzimática *Hind*III/*Xba*I del plásmido prd29A:GUS. carril 1, marcador de 200 pb (BioLine); líneas 2 y 3, doble digestión enzimática *Hind*III/*Xba*I del plásmido prd29A:GUS.

⁹ Anexo I

Clonación del cDNA de la trehalasa en antisentido bajo el control del promotor rd29A (rd29A:TREas) y del promotor 35S CaMV (35S:TREas).

Con el fin de obtener una secuencia de la trehalasa de alfalfa para insertar en orientación antisentido en los plásmidos con los promotores 35S y rd29A, se amplificó primeramente un fragmento de 560pb que incluyen las regiones internas más conservadas entre las diferentes trehalasas de plantas, y que es flanqueado por los sitios *SacI* (en el extremo 5') y *XbaI* (en el extremo 3'). Esta secuencia se amplificó a partir de DNA plasmídico del vector TOPO-3Tre, utilizando los oligos específicos 3Tre300 (5'-TATTACTGGGATTCTTATTGGGT-3') y TreNsiR (5'-TTGATTTAAATGCATTTCTACCCGGG-3').

El producto de PCR amplificado (Figura 19A) fue clonado en el vector TOPO TA pCR2.1^{MR}, dando lugar a los plásmidos TOPO-tre560s (Mapa 10)¹⁰ y TOPO-tre560as (Mapa 11)¹¹, de los cuales se muestra su caracterización por digestión enzimática *EcoRI* (Figura 19B). La dirección de la inserción se verificó mediante digestión enzimática *NsiI*, como se muestra en la Figura 20, en donde se muestra el patrón del plásmido TOPO-Tre560s (sentido Sac-Xba) y del plásmido TOPO Tre560as (antisentido Sac-Xba), debido a que el oligo TreNsiR lleva integrado un sitio de corte *NsiI* y el vector TOPO TA pCR2.1 lleva otro junto al sitio *XbaI*, el plásmido con el fragmento en orientación sentido se lineariza para dar una banda de 4.5 Kb, mientras que el plásmido con el fragmento en antisentido libera la secuencia de 560 pb y el vector de 3.9 Kb.

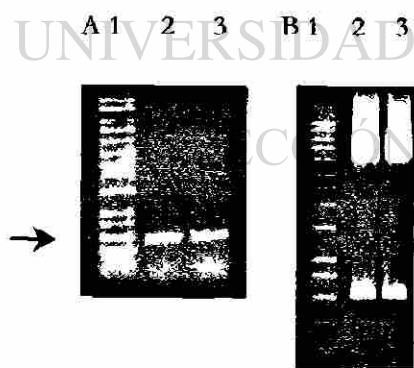


Figura 19. Amplificación y clonación de una secuencia de trehalasa de alfalfa para utilizar en la construcción del antisentido.

A: Carril 1, marcador de 200 pb (BioLine); carriles 2 y 3, producto de amplificación por PCR de un fragmento de 560 pb de la secuencia de trehalasa de alfalfa.

B. Carril 1) marcador de 200 pb; carriles 2 y 3, caracterización por digestión enzimática *XbaI/SacI* del plásmido Topo Tre560.

¹⁰ Anexo I

¹¹ Anexo I

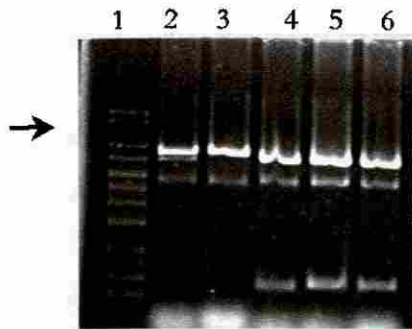


Figura 20. Caracterización enzimática *Nsi*I para determinar el sentido de la inserción del fragmento TRE en el vector TOPO TA pCR2.1 Carril: 1, marcador de 200 pb; línea 2 y 3, caracterización por digestión enzimática *Nsi*I del plásmido Topo Tre560s; lcarriles 4-6, caracterización por digestión *Nsi*I del plásmido TOPO Tre560as. La banda de casi 3.0 Kb corresponde al plásmido sin digerir.

Para dirigir la orientación antisentido en los plásmidos con los promotores 35S (pBI-121) y rd29A (prd29A:GUS), el fragmento de trehalasa de 560 pb se liberó del vector TOPO-tre560s mediante digestión *Sac*I-*Xba*I (Figura 21A, carril 4), se purificó mediante extracción fenol:cloroformo (Figura 21B, carril 4), y se subclonó en los sitios de restricción *Xba*I y *Sac*I de dichos plásmidos previamente digeridos y purificados (Figura 21 A y B, carriles 2 y 3). De este procedimiento se derivan los plásmidos finales p35S:TREas (Mapa 12)¹² y prd29A:TREas (Mapa 13)¹³ En ambos vectores, el fragmento antisentido sustituye al gen GUS de 1.8 Kb que es liberado (Figura 21A, carriles 2 y 3).

Figura 21. Digestiones enzimáticas *Xba*I/*Sac*I y las purificaciones fenol:cloroformo de los fragmentos correspondientes a los plásmidos pBI-121, prd29A:GUS y TOPO-Tre560. A. Digestiones *Xba*I/*Sac*I carril 1, marcador de 200 pb; 2, digestión del plásmido pBI-121; 3, digestión del plásmido prd29A:GUS; y 4, digestión del plásmido TOPO-rd29A. B. Carril 1, marcador 200pb; 2, fragmento correspondiente al plásmido pBI-121 sin GUS; línea 2, fragmento correspondiente al plásmido prd29A:GUS sin GUS; y línea 3, fragmento correspondiente al antisentido de 560 pb.



¹² Anexo I

¹³ Anexo I

Obtención de plantas transgénicas de tabaco para las construcciones rd29A:TreAS y 35S:TreAS, y sus respectivos controles (rd29A:GUS y 35S:GUS).

Para finalmente evaluar la estrategia de inhibición por antisentido en plantas, se transformaron por biobalística explantes de tabaco (*N. tabacum* L. cv Xhanti) con las construcciones para el antisentido, p35S:TREAs y prd29A:TREAs, y con sus controles, p35S:GUS (pBI-121) y prd29A:GUS, siguiendo los parámetros de bombardeo indicados. Se bombardearon un total de 6 cajas de explantes por cada construcción de DNA.

Los explantes bombardeados se diferenciaron y seleccionaron en medio IBA¹⁴ Kan200mg/L, a 25°C y fotoperiodo de 16:8, por 5 semanas. Los brotes obtenidos se transfirieron a medio IBA¹⁵ Kan200µg/ml para la diferenciación del sistema radicular. Las plantas regeneradas se mantuvieron y propagaron en medio MS Sac2% Kan 200mg/L.

Las líneas mantenidas de cada construcción de DNA son:

Construcción	Líneas	Construcción	Líneas
p35S:TREAs	10, 12, 18, 27, 32 y 39	prd29A:TREAs	44, 45, 70, 73 y 74
p35S:GUS	131, 150, 155 y 162	prd29A:GUS	170, 171, 172 y 177

Detección de la presencia del transgen en las plantas transgénicas.

Para determinar la presencia de los transgenes de la trehalasa antisentido (TREAs) y de GUS, se realizó la detección de estas secuencias por PCR a partir de DNA genómico de las líneas transgénicas. Como se observa en la Figura 21, en las líneas transgénicas para el antisentido, tanto con el promotor 35S como con el rd29A, se observa la amplificación del fragmento TREAs de alfalfa (Figura 22A). De igual modo se observa la amplificación del fragmento GUS en las líneas transgénicas control (Figura 22B).

¹⁴ Anexo IV

¹⁵ Anexo IV

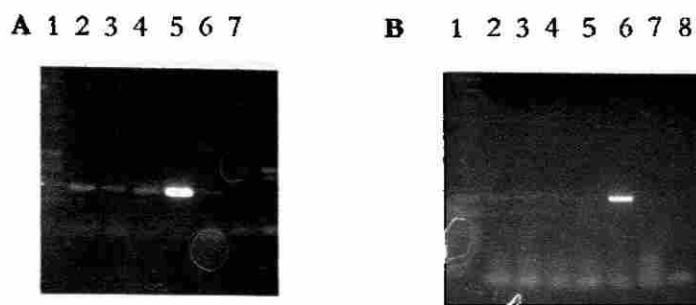


Figura 22. Detección del transgen por PCR. A. Detección de TREAs. Carriles: 1, marcador de 200 pb (BioLine); 2, línea #32; 3, #45; 4, #74; 5, plásmido TOPO-3TRE; 6, tabaco silvestre; y 7, control negativo de la reacción. B. Detección de GUS. Carriles: 1, marcador de 200 pb; 2, #131; 3, #150; 4, #170; 5, #172; 6, plásmido pBI-121; 7, tabaco silvestre; y 8, control negativo de la reacción.

En los ensayos siguientes, se tomaron de las líneas transgénicas obtenidas las más representativas de los fenotipos a analizar, siendo estas la #18 y #32 para p35S:TREAs, #47 y #70 para prd29:TREAs; #131 y #150 para p35S:GUS, y #170 y #172 para prd29:GUS.

Determinación de la actividad trehalasa en plantas.

Ya que necesitamos evaluar si la expresión del RNA antisentido de trehalasa de alfalfa disminuye la actividad trehalasa en las líneas transgénicas de tabaco, se realizó un ensayo enzimático para cuantificar la cantidad de glucosa que se produce al desdoblarse trehalosa pura (SIGMA) por medio de la enzima trehalasa presente en el extracto de las plantas. El experimento se desarrolló con las líneas transgénicas para el antisentido: p35S:TREAs#32 y prd29:TREAs#45; así como con sus respectivos controles: p35S:TREAs#150 y prd29:TREAs#171.

El extracto obtenido con buffer MES a partir de 0.35 mg de tejido de individuos de la misma edad, fue utilizado como solución enzimática de trehalasa en una reacción con 10mM de trehalosa pura. Después de la reacción de hidrólisis de trehalosa a 37°C se cuantificó la cantidad de glucosa producida a partir del desdoblamiento de la trehalosa, con el sistema GO Assay. En base a la curva estándar de glucosa, se determinó por absorbancia a 540nm la cantidad de glucosa en las reacciones. Se cuantificó la concentración de proteínas en el extracto para ajustar la concentración de glucosa a 0.1mg de proteína. Dentro del ensayo se incluyeron una reacción con

0.25U de trehalasa porcina pura (control positivo) y una reacción con buffer de extracción, sustituyendo la solución enzimática (control negativo).

Como se observa en la Figura 23, a simple vista y según el dato de Absorbancia señalado, la reacción colorimétrica evidencia el incremento en la concentración de glucosa de las reacciones correspondientes a la curva estándar de glucosa (tubos 1-3). El control positivo de trehalasa pura (tubo 9) produce un cambio intenso de color, en contraste con en el control negativo donde la señal es nula (tubo 8). Las líneas transgénicas con el antisentido de la trehalasa (tubos 5 y 7. Absorbancias de 0.35 y 0.44) muestran una intensidad menor que sus respectivos controles (tubos 4 y 6. Absorbancias de 0.7 y 1.0), indicativo de una disminución en la actividad de trehalasa endógena. Con el propósito de establecer una comparación más real, se determinó la concentración de proteínas en los extractos, y se normalizaron los valores en base a esto. Los resultados se muestran en la Figura 24. Cabe recordar que una mayor concentración de glucosa refleja una mayor actividad enzimática. Al analizar la gráfica observamos que en las líneas transgénicas con el promotor 35S, hay una disminución de señal de color y una disminución del 49% de producción de glucosa del control al antisentido, mientras que, de modo semejante, para las líneas con el promotor rd29A, se observa una disminución del 55% de degradación de trehalosa del control al antisentido. Como se observa en la Figura 24, si se promedian los valores de glucosa entre las líneas transgénicas control y las antisentido, se tiene aproximadamente un 52% de disminución de la actividad trehalasa dependiente del transgen TREAs.

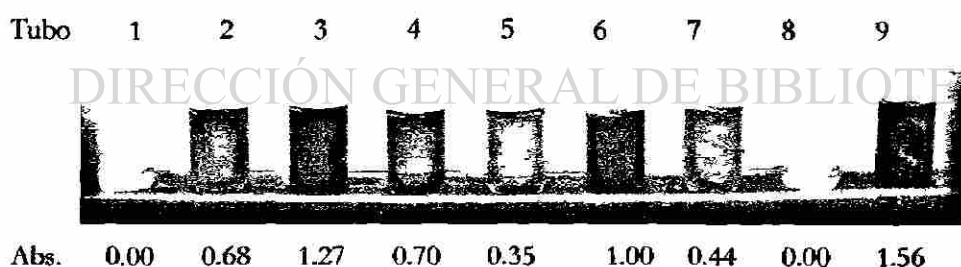


Figura 23. Actividad enzimática trehalasa en las plantas transgénicas antisentido y sus controles. Ensayo colorimétrico de cuantificación de glucosa producida por la hidrólisis de trehalosa mediante la enzima trehalasa presente en las líneas transgénicas. Tubos 1-3, curva estándar de glucosa de 0.0, 40.0 y 80.0 mg, respectivamente; tubo 4, línea 150 control con p35S:GUS; tubo 5, línea 32 antisentido con p35S:TREAs; tubo 6, línea 171 control con prd29A:TREAs; tubo 7, línea 45 antisentido con prd29A:TREAs; tubo 8, control negativo con buffer de extracción como extracto enzimático; y 9, control positivo con 0.25 unidades de trehalasa porcina pura.

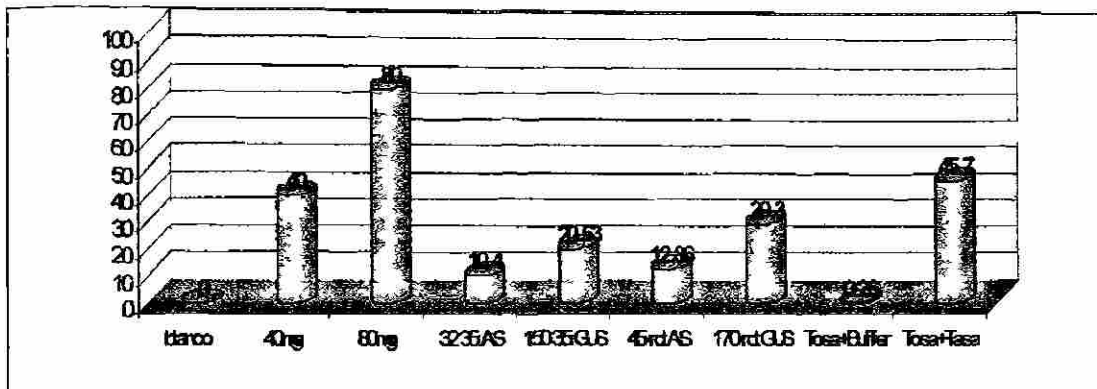


Figura 24 Actividad de trehalasa en función de la concentración de proteínas del extracto vegetal. Producción de glucosa en mg a partir del desdoblamiento de trehalosa mediante la enzima trehalasa presente en 100 μ g de proteína de las líneas transgénicas con el antisentido. El eje X representa la curva estándar, la muestra de reacción de cada línea transgénica y sus controles. El eje Y representa la cantidad de glucosa en mg. En letras rojas se anota la cantidad de glucosa en mg. Columnas: 1-3, curva estándar, 0, 40 y 80 mg de glucosa respectivamente; 4, línea p35S-TREas#32; 5, p35S:GUS#150; 6, prd29:TREas#45; 7, prd29A:GUS#170; 8, buffer MES; y 9, trehalasa pura.

Análisis del desarrollo, auxotrofia por sacarosa y comportamiento de azúcares de las líneas transgénicas *in vitro*.

Dentro de los análisis llevados a cabo en las plantas transgénicas obtenidas a partir de la regeneración y selección de transformantes, se llevó a cabo la observación de fenotipos morfológicos y de desarrollo.

A) El antisentido de trehalasa bajo el promotor rd29A induce un desarrollo radicular temprano.

Algunas de las líneas obtenidas de la construcción prd29A:TREas durante su proceso de diferenciación en medio inductor de brote (bencil aminopurina BAP), presentaron un desarrollo radicular temprano (Figura 25A) en medio carente de hormonas inductoras (ácido indolbutírico IBA, en nuestro caso), mientras que ninguna de las líneas de las demás construcciones dio un patrón parecido. A pesar de que las líneas de la construcción p35S:TREas se espera que también

inhiban trehalasa, no presentaron dicho patrón (Figura 25B), al igual que las líneas transgénicas control.

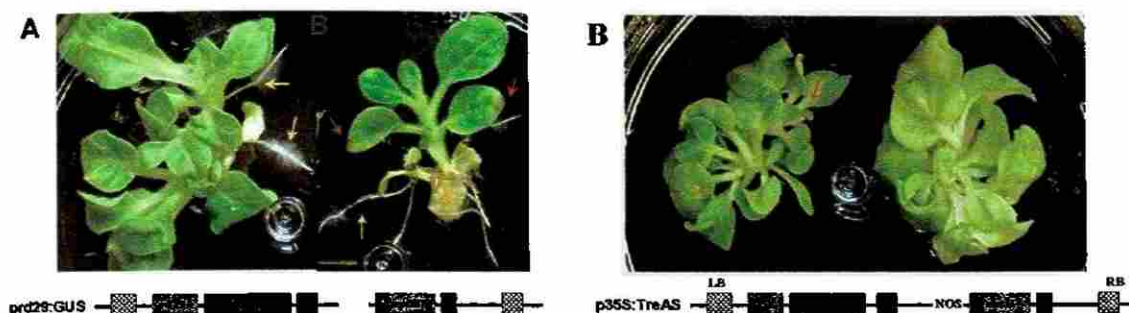


Figura 25. Diferencia en fenotipos de líneas transgénicas para el antisentido de trehalasa durante el proceso de diferenciación de tejido a tallo (medio MS Sac 2% BAP 1.5 μ M). A. Líneas 45 (derecha) y 75 (izquierda) de la construcción prd29:TREas. Las raíces tempranas se señalan en flechas rojas. B) Líneas 10 (derecha) y 39 (izquierda) de la construcción p35S:TREas. No se presenta el desarrollo radicular temprano.

B) La transgénesis con RNA antisentido para trehalasa elimina la auxotrofia para sacarosa *in vitro*.

Es conocido que el cultivo de tejido de tabaco *in vitro* requiere, además de luz, la presencia de sacarosa como fuente de carbono, es decir, el cultivo es auxotrófico *in vitro*. Puesto que está reportado que un incremento en la concentración de trehalosa puede incrementar la actividad fotosintética, era posible que las plantas transgénicas para el antisentido pudieran crecer *in vitro* en ausencia de sacarosa. Las plantas completamente desarrolladas y establecidas, presentan un comportamiento notorio en cuanto a heterotrofia para sacarosa (fuente de carbono) *in vitro*, ya que las líneas control (pBI-35S:GUS y pBI-rd29A:GUS) no progresan y mueren en medio carente de sacarosa (comportamiento conocido en cultivo de tejidos de tabaco), mientras que las líneas que se espera inhiban trehalasa (p35S:TREas y prd29A:TREas), pueden sobrevivir sin sacarosa e incluso presentan un desarrollo vigoroso y sin clorosis en el mismo medio de cultivo sin hacer transplantes (Figura 26 A y B), incluso después de tres meses de incubación, sin mostrar deterioro o clorosis. Los controles en medio sin sacarosa se vuelven cloróticos y mueren (Figuras 26 D y E).



Figura 26. Eliminación de auxotrofia por sacarosa en las líneas transgénicas con el RNA antisentido de trehalasa. Diferencia a los tres meses de desarrollo de las líneas transgénicas para el antisentido de trehalasa y de las de sus controles, en medio normal (MS Sac 2%) y en medio carente de sacarosa (MS). A, línea pBI-rd29A:Tas#45 en MS sin sacarosa; B, línea pBI-35S:Tas#39 en MS sin sacarosa; C, línea pBI-35S:GUS#139 en MS Sac 2%; D, línea pBI-rd29A:GUS#177 en MS sin sacarosa; y E, línea pBI-rd29A:GUS#177 en MS Sac 2%.

C) El RNA antisentido de trehalasa induce un mejor crecimiento en las plantas transgénicas.

En las Figuras 27 A y B se observan las diferencias en la velocidad y vigorosidad en desarrollo de ápices de 2cm de longitud colocados en los medios de cultivo a probar (MS y MS sac2%) en un periodo de 2 semanas. Las líneas transgénicas con el antisentido de trehalasa muestran la capacidad de crecer en medio sin sacarosa con la misma vigorosidad y casi la misma rapidez que en medio con este azúcar. Mientras tanto, las líneas controles son incapaces de desarrollarse normalmente. Además, puede observarse que aún en medio con sacarosa las líneas con el antisentido tienen una mayor velocidad de crecimiento y vigorosidad que sus respectivos controles. No obstante haberse detectado la presencia del transgen antisentido para la línea transgénica #27 que lleva TREas bajo el promotor 35S, no muestra el mismo fenotipo de desarrollo que las otras líneas transgénicas para el antisentido (Figura 27C).



Figura 27. Diferencia a las tres semanas de desarrollo de las líneas transgénicas para el antisentido de trehalasa y de las de sus controles, en medio normal (MS Sac 2%) y en medio carente de sacarosa (MS). Foto A. Líneas transgénicas con el promotor rd29A: línea 44 de prd29A:TREAs en medio sin sacarosa (1) y con sacarosa (2), línea 171 del control prd29A:GUS en medio sin sacarosa (3) y con sacarosa (4). Foto B. Líneas transgénicas con el promotor constitutivo 35S: línea 39 de p35S:TREAs en medio sin sacarosa (1) y con sacarosa (2), línea 131 del control p35S:GUS en medio sin sacarosa (3) y con sacarosa (4). Foto C. Línea transgénica 27 de p35S:TREAs en medio sin sacarosa (1) y con sacarosa (2).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

D) *Las plantas transgénicas para el RNA antisentido de trehalasa acumulan glucosa.*

Ya que las líneas transgénicas para el antisentido son capaces de sobrevivir en medio sin fuente de carbono, procedimos a analizar el comportamiento de azúcares circulantes, mediante un análisis de cromatografía de capa fina, utilizando el extracto vegetal. Incluyendo azúcares comerciales como estándares, procedimos a una primera cromatografía utilizando los extractos de las líneas antisentido #32 y #45, así como de sus controles #150 y #172. La placa cromatográfica fue revelada, como se observa en la Figura 28, donde se muestran las marcas de los azúcares en los estándares (carriles 1 al 5) y en los extractos vegetales (carriles 6 al 9). En las líneas transgénicas antisentido (carriles 7 y 9) pudimos observar una señal que correspondiente al azúcar glucosa que no se observa en las líneas transgénicas control (carriles 6 y 8).

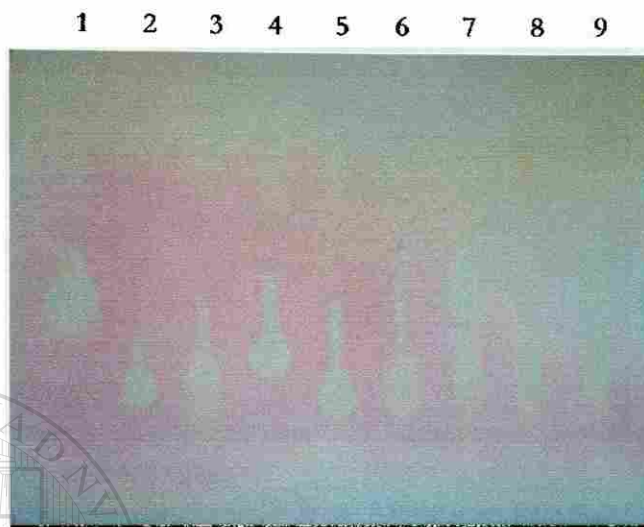


Figura 28. Acumulación de glucosa en las líneas transgénicas para el antisentido. Cromatografía en capa fina de extracto de azúcares vegetales de las líneas transgénicas. Carriles: 1, estándar glucosa 0.1%; 2, estándar maltosa 0.1%, 3, estándar sacarosa 0.1%; 4, estándar trehalosa 0.1%; 5, mezcla de soluciones estándar; 6, prd29:GUS#172; 7, prd29:TRERs#45; 8, p35S:GUS#150; y 9, p35S:TRERs#32.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Con el fin de determinar si la acumulación de glucosa observada en las líneas antisentido podría ser diferente cuando la planta crece en medio carente de sacarosa, procedimos a comparar el extracto de una línea antisentido creciendo en medio con sacarosa, con el extracto de una planta de la misma línea creciendo en medio sin este azúcar. Como se observa en la Figura 26, la línea antisentido #45 presenta una acumulación de glucosa solamente cuando crece en presencia de sacarosa (carril 6), es decir, solamente cuando crece en presencia de carbono, y que al igual que en las líneas transgénicas controles (carriles 7 y 8) y en tabaco silvestre (carril 9), no se muestra acumulación de glucosa en esta planta cuando carece de dicha fuente (carril 5).

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Figura 29. Acumulación de glucosa en las líneas transgénicas para el antisentido en medio sin sacarosa. Cromatografía en capa fina del extracto de azúcares vegetales de las líneas transgénicas. Carriles: 1, estándar glucosa 0.1%; 2, estándar maltosa 0.1%; 3, estándar sacarosa 0.1%; 4, estándar trehalosa 0.1%; 5, prd29:TRAs#45 sin sacarosa; 6, prd29:TRAs#45 con sacarosa; 7, prd29:GUS#170 sin sacarosa; 8, prd29:GUS#170 con sacarosa; y 9, tabaco silvestre con sacarosa.

Finalmente procedimos a realizar una última cromatografía en la que se incluyeron las líneas transgénicas para el antisentido #27 y #70, junto con la línea antisentido #45 y los controles transgénicos #150 y #172. De estas líneas se obtuvo extracto de plantas en medio con y sin sacarosa. Podemos de nuevo observar en la Figura 27, que cuando el medio es suplementado con sacarosa como fuente de carbono, las líneas transgénicas antisentido #45 y #70 acumulan glucosa (carriles 6 y 8), a diferencia de los controles (carriles 10 y 12), mientras que en ninguno de los extractos existe acumulación del monosacárido cuando crecen en medio carente sacarosa. Al igual que en el fenotipo de desarrollo y auxotrofia por sacarosa, se muestra que la línea antisentido p35S:TRAs#27 tampoco presenta el fenotipo de acumulación de glucosa aún en medio suplementado con fuente de carbono (carriles 4 y 5).

0150697

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

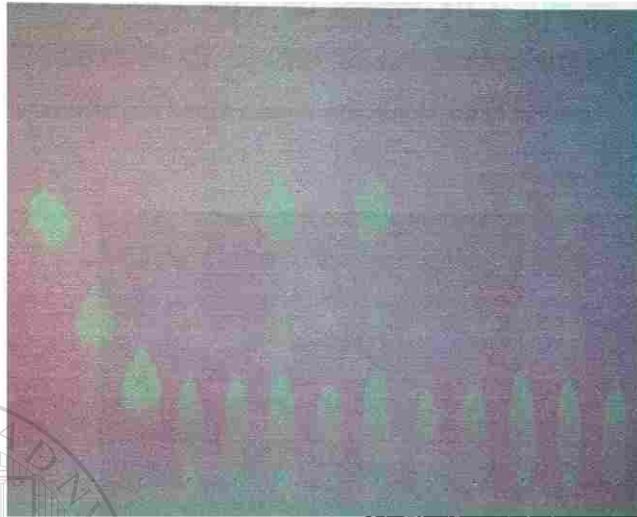


Figura 30. Cromatografía en capa fina del extracto de azúcares vegetales de las líneas transgénicas. Carriles: 1) estandar glucosa 0.1%, 2) estandar sacarosa 0.1%, 3) estandar trehalosa 0.1%, 4) p35S:TRERas#27 con sacarosa, 5) p35S:TRERas#27 sin sacarosa, 6) prd29:TRERas#45 con sacarosa, 7) prd29:TRERas#45 sin sacarosa, 8) prd29:TRERas#70 con sacarosa, 9) prd29:TRERas#70 sin sacarosa, 10) p35S:GUS#150 con sacarosa, 11) p35S:GUS#150 sin sacarosa, 12) prd29:GUS#170 con sacarosa, y 13) prd29:GUS#170 sin sacarosa

E) Es posible utilizar la inhibición de la enzima trehalasa como un nuevo marcador de selección para obtener plantas transgénicas?

Uno de los problemas que las plantas transgénicas afrontan para su aprobación, es el uso de genes de resistencia antibióticos y herbicidas como marcadores de selección. Puesto que las plántulas con el antisentido de trehalasa son capaces de crecer en medio carente de sacarosa, nos preguntamos si el RNA antisentido de trehalasa podría sostener la regeneración de brotes en ausencia de sacarosa, y que en un momento dado pudiera ser utilizado como marcador de selección. Por último, para darnos una idea de si la restitución de heterotrofia por sacarosa *in vitro* para tabaco por medio de esta tecnología de inhibición por antisentido de la trehalasa permite la regeneración de plantas a partir de tejido en medio carente de sacarosa, se colocaron explantes de las líneas transgénicas para el antisentido p35S:TRERas#18 y prd29:TRERas#45, así como del

control transgénico p35S:GUS#150 en medio de inducción de brotes sin sacarosa (IBA). Como se observa en la Figura 31 que las líneas antisentido (Figura 31 A y B) permiten la regeneración de algunos brotes, mientras que la línea control no (Figura 31C). Aunque las construcciones antisentido condujeron a la obtención de algunos brotes, probablemente la adición de una cantidad mínima de sacarosa conduciría a una mayor eficiencia en el sistema.

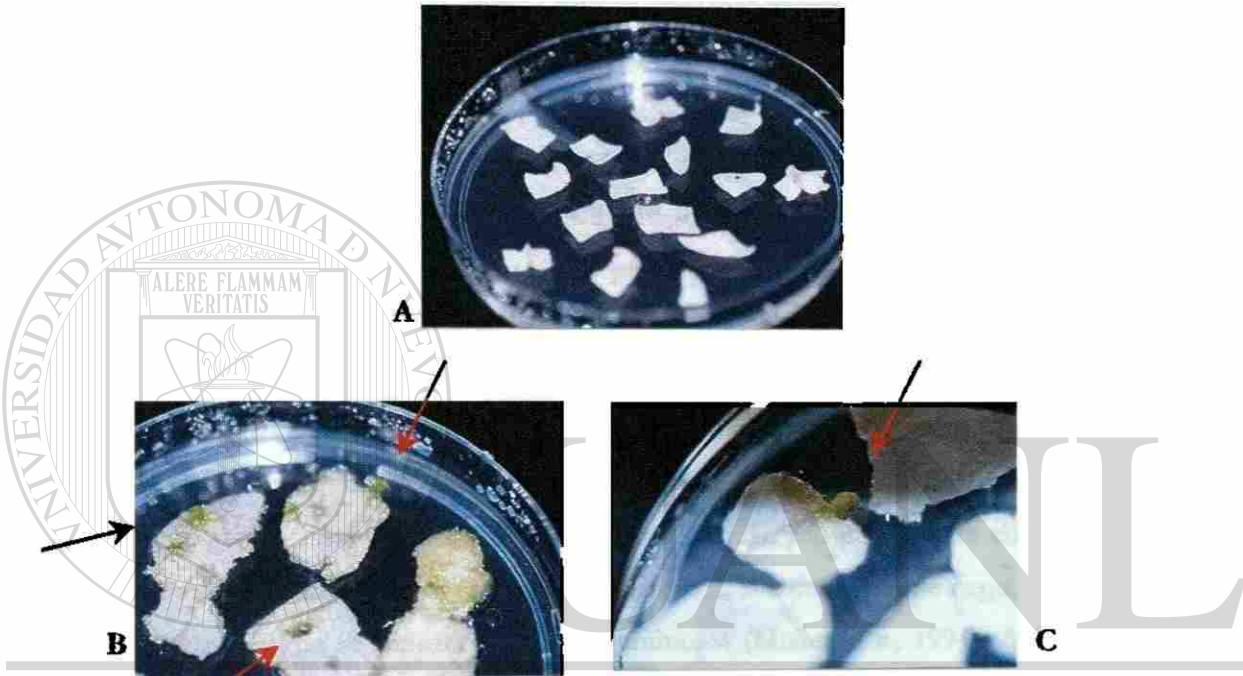


Figura 31. Regeneración de brotes a partir de explantes de líneas transgénicas en medio IBA sin sacarosa. Explantes de las diferentes líneas transgénicas, p35S:GUS#150 (A); prd29:TRAs#45. (B); y p35S:TRAs#18

DISCUSIÓN

Clonación y caracterización del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

Aunque en plantas superiores la trehalosa esta en muy bajas concentraciones la enzima trehalasa que la degrada es fácil de detectar (Kendall *et al.*, 1990). Se cree que la actividad de la trehalasa protege a las plantas de los efectos tóxicos de la trehalosa que puede encontrarse en el suelo o durante su asociación con hongos, bacterias e insectos. Ya que los efectos de alteración en el crecimiento (Godijn *et al.*, 1997), acumulación de almidón (Wingler *et al.*, 2000) y alteración de los patrones de carbohidratos solubles (Müller *et al.*, 2001) provocados por la acumulación de trehalosa, se incrementan al inhibir químicamente la actividad trehalasa, la inhibición por antisentido de esta enzima se postuló como una estrategia idónea tanto para obtener plantas mejoradas por la vía de la acumulación de trehalosa, como para saber el papel que este metabolito desempeña en el desarrollo de la planta y como es regulado.

Para enfocarnos en cultivos de importancia agronómica, decidimos probar inicialmente en tabaco un modelo de inhibición por antisentido de la trehalasa, utilizando una secuencia proveniente de alfalfa. Este cultivo, además de ser el forraje más importante en las regiones lecheras de nuestro país, se conoce como una especie con alta demanda de riego, y con fuerte actividad trehalasa, según se reporta para las leguminosas (Müller *et al.*, 1994). Aunque desde 1969 se detectó la actividad trehalasa por primera vez en caña de azúcar (en Godijn y van Dun, 1999), hasta la fecha son pocas las secuencias que se reportan para las trehalasas de origen vegetal, siendo las primeras la de soya, de 557 aminoácidos, (Aeschbacher *et al.*, 1999) y papa de 581 aac (Smeekens, 1998), seguidas de la de Arabidopsis de 556 aac (Müller *et al.*, 2001) y más recientemente la secuencia de arroz de 563 aac (Buell *et al.*, 2003). Al inicio de este trabajo se contaba en la base de datos con las secuencias de trehalasa de soya, papa y Arabidopsis, con las cuales se detectaron regiones homólogas que nos sirvieron en la amplificación de una región de la secuencia de alfalfa. En dichas secuencias encontramos solamente dos pequeñas regiones con homología suficiente para diseñar un par de oligonucleótidos que nos permitieron amplificar un fragmento interno de 146 pb, que es el más conservado no sólo entre las especies vegetales reportadas, sino también entre bacterias, hongos y nemátodos, por lo que probablemente se trate del sitio catalítico de la enzima. A partir de este fragmento génico fue posible obtener la secuencia completa de la trehalasa de

alfalfa, contribuyendo así con el conocimiento de una nueva secuencia codificante de trehalasa. Esta secuencia codifica para una enzima de 553 aminoácidos, que presenta una gran homología con la secuencia de soya, y es menos homóloga a las secuencias de arroz y papa. El análisis de la secuencia de varias clonas mostraron una secuencia idéntica en la región codificante del cDNA pero varias diferencias significativas en las regiones no traducibles (UTR 5' y 3'). Esto indica que pudiese existir más de un gen para la trehalasa de alfalfa.

Inhibición de la actividad trehalasa de tabaco por medio de la expresión de un RNA antisentido de la trehalasa de alfalfa.

Para probar nuestro modelo de inhibición por RNA antisentido de la actividad de la enzima trehalasa utilizamos uno de los sistemas típicos de transformación que es el tabaco, con el que se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco que expresaron un antisentido de la trehalasa de alfalfa. Dicha secuencia incluyó la región más conservada entre las especies reportadas, por lo que se esperaba que el transcrito producido hibridara con el RNAm endógeno de la trehalasa y desencadenara el silenciamiento postranscripcional de este gen. Efectivamente, al evaluar la actividad enzimática de estas plantas, se observó una disminución de hasta el 50% de la actividad trehalasa. Esto indica que podemos utilizar este RNAs para inhibir la expresión del gen de la trehalasa de otras especies. A pesar de que la inhibición de la actividad trehalasa fue únicamente de un 50% se observaron fenotipos muy interesantes que correlacionaron con los fenotipos que están reportados al alterar el metabolismo de la trehalosa. Será interesante el probar algunas otras estrategias, como por ejemplo la supresión mediada por RNA de interferencia (RNAi) que actualmente es uno de los procedimientos más efectivos de inhibición postranscripcional (Thakur, 2002). Este fenómeno es un proceso de degradación de RNA desencadenado por un RNA exógeno de doble cadena (dsRNA) cuya secuencia es homóloga al transcrito del gen blanco. Este RNA exógeno se digiere en RNAs pequeños de interferencia (sRNAi) que se unen formando un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual hace blanco y degrada a los transcritos del gen endógeno. Este sistema lo probaremos en nuestro modelo para determinar si una mayor inhibición del mensajero mejora la capacidad fotosintética.

Efectos de la expresión del RNA antisentido de trehalasa en el patrón de crecimiento de plantas transgénicas de tabaco *in vitro*.

La clonación y funcionalidad de los genes de diversas especies vegetales que son necesarios para la síntesis de trehalosa demuestran que esta ruta biosintética se encuentra distribuida ampliamente en el reino vegetal, aunque su función precisa se desconoce. Conocido como uno de los mejores osmoprotectores naturales en organismos menores, la sobreproducción de este metabolito fue la estrategia que diversos grupos de investigación tomaron para conferir tolerancia a sequía en plantas transgénicas. Como resultado se obtuvieron defectos morfológicos en el crecimiento y la alteración del metabolismo que son consistentes con cambios en la distribución del carbono entre los tejidos fuente y de desecho, conduciendo a la propuesta de que algunas etapas del metabolismo de la trehalosa están implicadas en la señalización de azúcares.

Aunque no evaluamos acumulación de trehalosa, nos basamos en el hecho de que si la inhibición química de la trehalasa conduce en plantas silvestres a una acumulación mínima de trehalosa y a fenotipos característicos, nuestra estrategia de inhibición por antisentido de dicha actividad también permitirá cierto nivel de acumulación del azúcar. Después de determinar que las plantas con el antisentido de trehalasa disminuyen la actividad enzimática, evaluamos los fenotipos inducidos por la acumulación de trehalosa esperada.

a) Inducción de raíces tempranas en la regeneración de transformantes.

Inicialmente, el antisentido de trehalasa bajo el promotor rd29A indujo en la regeneración de brotes una producción de raíces tempranas que no se observó en el antisentido constitutivo. Aunque desconocemos cual es el mecanismo efector que indujo este promotor *in vitro*, sabemos que la respuesta de expresión es mucho mayor que la del promotor 35S bajo diferentes tipos de estrés en cultivo celular de tabaco *in vitro* (datos no mostrados), por lo que pudiese alcanzarse una mayor inhibición de actividad trehalasa en cierta etapa clave del desarrollo de la planta donde dicha respuesta podría ser inducida.

b) Fotosíntesis y desarrollo.

En los intentos por sobreproducir trehalosa en plantas para explotar su potencial como osmoprotector, las plantas transgénicas obtenidas presentan un crecimiento truncado y un sistema radicular completamente deformado. Las posibles explicaciones para estas alteraciones

podrían ser el cambio en el metabolismo de la planta debido a un agotamiento de UDP-glucosa o de las reservas de fosfatos, o bien que el metabolismo de la trehalosa es una señal en la asimilación y distribución de azúcares. De los trabajos mencionados, se tienen resultados que indican que la trehalosa pudiera interferir con la distribución de carbohidratos, y afectar la expresión de genes mediada por estos, a través de dos mecanismos hipotéticos. Ya sea funcionando como un análogo de la sacarosa, ó por la liberación de glucosa a partir de su desdoblamiento, con lo que estaría desempeñando un papel en la modulación del metabolismo y, por lo tanto, en el desarrollo de la planta (Smeekens, 1998). Se sabe que la trehalosa interfiere con la regulación de genes mediada por carbohidratos en cebada (Wagner *et al.*, 1986), soya (Müller *et al.*, 1998) y *Arabidopsis* (Wingler *et al.*, 2000).

Por largo tiempo, uno de los objetivos principales de los científicos ha sido mejorar la fotosíntesis para maximizar la productividad de los cultivos. Las plantas producen carbohidratos en los tejidos fotosintéticamente activos. A partir de estos órganos fuente, los carbohidratos se distribuyen entre los órganos vertedero en un proceso de distribución. La producción y distribución de carbohidratos en la planta requieren una regulación coordinada entre los tejidos fuente y los tejidos vertedero. A nivel de proteína, las enzimas clave involucradas en el metabolismo de carbohidratos están sujetas al control de metabolitos. En general, la acumulación de azúcares en los órganos fuente da como resultado la represión de los genes involucrados en la fotosíntesis, mientras que en los tejidos vertedero se inducen los genes para el almacenamiento y utilización. El agotamiento de los azúcares revierte esta situación. Los carbohidratos pueden afectar de manera directa la expresión de varios genes y controlar los procesos de desarrollo de las plantas, tales como el verdor y expansión de los cotiledones, desarrollo del tallo y la transición floral. Se cree que dichas regulaciones se ejercen en tres pasos diferentes: (1) por un catabolito de hexosas, (2) por la fosforilación de glucosa por medio de la hexocinasa, y (3) sensando la glucosa, la sacarosa o metabolitos similares antes de que sean metabolizados. Se sugiere que la trehalosa actúa como un análogo de la sacarosa en la expresión de genes regulados por sacarosa (Müller *et al.*, 1999). Estos datos se apoyan con el hecho de que en soya la trehalosa afecta enzimas que degradan sacarosa (sacarosa sintasa e invertasas) (Müller *et al.*, 1998), y al igual que ésta induce enzimas involucradas en la acumulación de carbohidratos de almacén en los tejidos fotosintéticos (Wingler, 2002).

En el presente trabajo, las líneas transgénicas para el antisentido tuvieron *in vitro* un comportamiento mejorado en cuanto a velocidad de desarrollo, verdor y vigorosidad, en

comparación de sus controles transgénicos. Considerando que la trehalosa que se acumula en respuesta a la inhibición de la actividad trehalasa, por RNA antisentido, pudiera afectar la expresión de genes involucrados con dichos comportamientos, nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que la modificación genética del mecanismo de la trehalosa afecta la capacidad fotosintética por medio de señalización de azúcares. Un modelo de esta hipótesis se centra en la t6p, ya que en levaduras juega un papel en el control de la glicólisis y la señalización de azúcares a través de su interacción con la hexocinasa, un potente sensor de azúcares en levaduras y plantas. En base a que la t6p interactúa con la hexocinasa modificando la percepción del contenido de glucosa, se desarrollaron trabajos en los que en plantas transgénicas que sobrepresan la TPS (y acumulan t6p), se incrementan los niveles fotosintéticos, debido a que se percibe un déficit de carbón, mientras que las plantas que sobre expresan TPP disminuyen sus niveles de t6p, lo que conduce a la planta a sentir un exceso de glucosa y de ahí a disminuir la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis (Blázquez *et al.*, 1993, en Paul *et al.*, 2001). No obstante estos descubrimientos, los fenotipos encontrados en los diferentes trabajos llevados a cabo con el objetivo de acumular trehalosa para inducir una respuesta específica, son semejantes entre ellos; ya sea que se trate de inducir la biosíntesis secuenciada de t6p y trehalosa, o por medio de la inhibición de la actividad trehalasa, ya sea químicamente o por RNA antisentido. En esta última vía, que es la que nos ocupa, es importante analizar cual sería el metabolito efector de dichos mecanismos de sensado de azúcares, ya que al inhibir la trehalasa, se obtiene el azúcar trehalosa sin necesidad de acumular el precursor t6p en cantidad superior a la presente en el estado activo de la trehalasa. En dado caso, sería oportuno profundizar en un mecanismo de retención y liberación de los catabolitos UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato.

Como se observa en las líneas transgénicas para el antisentido de trehalasa, existe una acumulación de glucosa que no está presente en las líneas control. Aunque desconocemos el origen de este metabolito en la planta, se piensa en que al mejorar su capacidad fotosintética se induce una mejor fijación de CO₂ y un mejor control del flujo de la glucosa en el sistema. En *Sacharomyces cerevisiae* la anulación del gen *TPS1* que codifica para la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa en este organismo, impide que la levadura crezca en glucosa. Se piensa que este fenotipo es el resultado de la desregulación de la glicólisis, ya que se cree que este mecanismo opera con un principio autocatalítico. El ATP se consume para dirigir el catabolismo de la

glucosa antes de que sea recuperado por un metabolismo siguiente. Cuando el abastecimiento de glucosa incrementa de manera repentina, la glicólisis tiende a utilizar ATP más rápidamente de lo que puede ser generado, provocando que el sistema se bloquee. Al parecer, la TPS se requiere para restringir el flujo de glucosa a la glicólisis, previniendo el ahogamiento del sistema. Aunque no está claro como la TPS controla la glicólisis, se piensa que el control está dado en un paso inicial catalizado por la hexocinasa (HXS) (Eastmond y Graham, 2003; Eastmond *et al.*, 2003).

¿RNAas como un marcador de selección de plantas transgénicas?

Como se describió en los resultados, aún y cuando se realizó únicamente un experimento, el RNAas para trehalasa indujo la regeneración de brotes. Este hecho da la pauta para que la inhibición de la expresión de la enzima trehalasa se convierta en una nueva Tecnología de Selección de plantas transgénicas. Esta capacidad de regeneración en ausencia de una fuente de carbono (sacarosa) se explica no solo por un incremento en la capacidad fotosintética de la célula vegetal, lo cual se traduce a producción de biomasa y mejor utilización de nutrientes, sino también al sensado y señalización de azúcares, que aunque no está bien dilucidado, está involucrado en el control del crecimiento y el desarrollo de la planta durante su ciclo entero de vida. Durante la germinación y desarrollo temprano, los azúcares pueden reprimir o inducir la movilización de nutrientes, la elongación del hipocotilo, el verdor de los cotiledones, la expansión y desarrollo del tallo, e inducir la diferenciación de los tejidos meristemáticos (Rolland *et al.*, 2002). Aunque la eficiencia de regeneración fue baja en el ensayo preliminar elaborado, es un indicio consistente con las respuestas obtenidas en la manipulación de esta ruta biosintética. Para afinar esta tecnología, se requiere la optimización del sistema de selección, el cual tendrá que ser optimizado con cantidades mínimas de sacarosa, y estandarizando la cantidad según el cultivo a manipular.

CONCLUSIONES

1. El cDNA de la trehalasa de alfalfa codifica para 553 aminoácidos, y su homología entre las trehalasas reportadas es mas cercana a la trehalasa de soya.
2. La trehalasa se expresa mayormente en tallo y hojas en alfalfa.
3. La expresión de RNAs para trehalasa disminuyó la actividad de esta enzima en las plantas transgénicas de tabaco.
4. El RNAs de alfalfa puede ser utilizado para inhibir la expresión de trehalasa de otras especies.
5. El promotor rd29A de *Arabidopsis thaliana* funcionó adecuadamente para la expresión de RNAs.
6. La expresión transgénica del RNAs mejoró la capacidad de crecimiento de las plantas de tabaco *in vitro*.
7. La expresión transgénica del RNAs eliminó la auxotrofia para sacarosa del cultivo de plantas de tabaco *in vitro*.
8. La expresión transgénica del RNAs permite la regeneración de brotes de tabaco en ausencia de sacarosa.

LITERATURA CITADA

Citas Bibliográficas

- Aeschbacher, R.A., Müller, J., Boller, T. y A. Wiemken. 1999. Purification of trehalase GMTRE1 from soybean nodules and cloning of its cDNA. *GMTRE1* is expressed at low level in multiple tissues. *Plant Physiology*, **119**: 489-495.
- Andersson, U., Levander, P. y P. Rådström. 2001. Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**: 42707-42713.
- Austin, S., Bingham, E.T., Koegel, R.G., Mathews, D.E., Shahan, M.N., Straub, R.J. y Burgess, R.R. 1994. An overview of a feasibility study for the production of industrial enzymes in transgenic alfalfa. *Ann N Y Acad Sci.*, **721**: 234-244.
- Bajaj, Sh., Targolli, J., Liu, L-F., Ho, T.H.D., y R. Wu. 1999. Transgenic approaches to increase dehydration stress tolerance in plants. Artículo de revisión. *Molecular Breeding*, **5**: 493-503.
- Bent, A.F. 2000. Arabidopsis in Plant Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. *Plant Physiol.*, **124**: 1540-1547.
- Bevan, M.W., Rook, F., Baier, M., Hemmann, G., Hadingham, S. y R. Holman. P2.2- Genetic analysis of sugar-mediated gene expression in *Arabidopsis*. En Halford, N.G. e I.A. Graham, 2002. P2- Regulation of carbon metabolism: sensing, signaling and partitioning. ELSIEVER Abstracts/Comparative Biochemistry and Physiology Part A **132**: S101-S114.
- Birch, R.G. 1997. Plant Transformation: Problems and strategies for practical application. *Ann Rev Plant Physiol.*, **48**: 297-326.
- Blázquez, M.A., Santos, E., Flores, C-L., Martínez-Zapter, J.M., Salinas, J. y C. Gancedo. 1998. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* *TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. Short communication. *The Plant Journal*, **13**: 685-689.
- Buell, C.R., Wing, R.A., McCombie, W.R., Messing, J. y Q. Yuan. 2003. In-depth view of structure, activity and evolution of rice chromosome 10. *Science*, **300**: 1566-1569.
- Cabib, E. y F.L. Leloir. 1958. The biosynthesis of trehalose-6-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **231**: 951-959.

- Cabrera-Ponce, J.L., López, L., Assad-García, N., Medina-Arévalo, C. Baley, A.M. y L. Herrera-Estrella. 1997. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports*, **16**: 255-260.
- Carnici, P., Nishiyama, Y., Westover, A., Itoh, M., Nagaoka, S., Sasaki, N., Okazaki, Y., Muramatsu, M. y Y. Hayashizaki. 1998. Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *Biochemistry*, **95**: 520-524.
- Chiou-Fen, Ch. y Meyerowitz, E.M., 2000. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, **97**: 4985-4990.
- Colaco C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S. Y B. Roser. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology (NY)*, **10**: 1007-1011.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. y Crowe, L.M. 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **54**: 579-599.
- Cueto W., J.A. y Quiroga G., H.M. 2000. Fertilización de la alfalfa. Producción y utilización de la alfalfa en la zona norte de México. Libro técnico No 2. SAGAR, INIFAP, CIRNOC-CELALA. Octubre 2000. pp. 19-28.
- De Virgilio, C., Burckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T. y A. Wiemken. 1993. Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur. Jour. Of Biochem.*, **212**: 315-323.
- Dixon, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S., Sewalt, V.J. y Paiva N.L. 1996. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses –a review. *Gene*, **179**: 61-71.
- Dougherty W.A. y T.D. Parks. 1995. Transgenes and gene suppression: telling us something new?. *Current Opinion y Cell Biology.*, **7**: 399-405.
- Eastmond, P.J., van Dijken, Anja J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G., Smeekens, S.C. y I.A. Graham. 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *The Plant Journal*, **29**: 225-235.
- Eastmond, P.J., y I.A. Graham. 2003. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate. *Curr Op Plant Biol.*, **6**: 231-235.

- Elbein, A.D., 1974. The metabolism of α , α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **30**: 227-256.
- Escobar, M.A., Civerolo, E.L., Summerfelt, K.R., y A.M. Dandekar. 2001. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *PNAS*, **98**: 13437-13442.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J-B., Bellini, C. y H. Vaucheret. 2000. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *PNAS*, **97**: 11650-11654
- Goddijn, O.J.M., Vervoerd, T.C., Voogd, E., Krutwagen, W.H.H., de Graaf, P.T.H.M., Poels, J., van Dun, K., Ponstein, A.S., Damm, B. y J. Pen. 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.*, **113**: 181-190.
- Goddijn, O. y S. Smeekeens. 1998. Sensing trehalose biosynthesis in plants. *The Plant Journal*, **14**: 143-146.
- Goddijn, O.J.M., y K. van Dun. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Sci.*, **4**: 315-319.
- Haer, F. 1969. An introduction to chromatography. Ann Arbor Science Pub. Michigan.
- Hamilton, A.J., Brown, S., Han, Y.H., Ishizuka, M., Lowe, A., Solis, A.G.A. and Grierson, D. 1998. A transgene with repeated DNA causes high frequency post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato. *Plant J.*, **15**: 737-746.
- Hansen, G. y M.S. Wright. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.*, **4**: 226-231.
-
- Herrera-Estrella, L. y J. Simpson. 1988. Forcing gene expression in plants. *Plant Molecular Biology. A practical approach.* Oxford, C.H. Shaw Eds. IRL Press. Pp: 131-160.
- Hooykas, P.J.J. y R.A. Schilperoort. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol.*, **19**: 15-38.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D. y K.G. Scrimgeour. 1993. Bioquímica. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. Edición en español, 1995. Capítulo 16: Fotosíntesis.
- Inzunza I. M.A. 1991. Respuesta de la alfalfa a diferentes contenidos de humedad del suelo. *Terra*, **9**: 129-138.
- Jorgensen, R.A.; Cluster, P.D.; English, J.; Que, Q. and Napoli, C.A. 1994. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs antisense constructs and single copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Molecular Biology*, **31**: 957-973.

- Kassen, I., Mcdougall, J. Y A.R. Strom. 1994. Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene*, **145**: 9-15.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki. 1999. *Nature Biotechnology*, **17**: 287-291.
- Kidd, G. y J. Devorak. 1994. Trehalose is a sweet target for agrobiotechnology. *Bio/Technology*, **12**: 1328-1329.
- Kinney, A.J. 1998. Manipulating flux through plant metabolic pathways. *Curr. Op. In Plant Biol.*, **1**: 173-178.
- Liu, Q., Jasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., y K. Shinozaki. 1998. *The Plant Cell*, **10**: 1391-1406.
- Mandaci, S. y Dobres, M.S. 1997. A promoter directing epidermal expresión in transgenic alfalfa. *Plant Mol Biol.*, **34**: 961-965.
- Matzke, M.A. y J.M. Matzke. 1993. Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *CMLS.*, **54**: 94-103
- McKersie, B.D., Chen, Y., de Beus, M., Bowley, S.R., Bowler, C., Inze, D., D'Halluin, K. Y Botterman, J. 1993. Superoxide dsmutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, **103**: 1155-1163.
- Müller, J., Boller, T. y A., Wiemken. 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci.*, **112**: 1-9.
- Müller, J., Boller, T. y A., Wiemken. 1998. Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. Short communication. *J Plant Phy.*, **153**: 255-257.
- Müller, J., Wiemken, A. y R. Aeschbacher. 1999. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Sci.*, **147**: 37-47.
- Müller, J., Aeschbacher, R.A., Wingler, A., Boller, T. y A., Wiemken. 2001. Trehalose and trehalase in Arabidopsis. *Plant Phy.*, **125**: 1086-1093.
- Nessler, C.L., 1994. Metabolic engineering of plant secondary products. *Transgenic Research.*, **3**: 109-115.
- Nuccio, M., Rhodes, D., McNeil, S.D. y A.D. Hanson. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Op.in Plant Biol.*, **2**: 128-134.

- Nwaka, S. y H. Holzer. 1998. Molecular biology of trehalose and trehalases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucl. Ac. Res. and Mol. Biol.*, **58**: 197-237.
- Paiva C.L. y A.D. Panek, 1996. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotech. Annu. Rev.*, **2**: 293-314.
- Paul, M., Pellny, T. Y O. Goddijn. 2001. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *TRENDS Plant Sci.*, **6**: 197-200.
- Peixoto, D. y A.D. Panek. 1999. The involvement of hexokinases in trehalose síntesis. *Bioch Mol Biol Intl.*, **47**: 873-880.
- Pellny, T.K., Paul, M.J. y J.M. Goddijn. P2.6- Unravelling the role of trehalose-6-phosphate in metabolic signalling in photosynthetic tissue. En Halford, N.G. e I.A. Graham, 2002. P2- Regulation of carbon metabolism: sensing, signalling and partitioning. ELSIEVER Abstracts/Comparative Biochemistry and Physiology Part A **132**: S101-S114.
- Penna, S. 2003. Building stress tolerance through over-producing trehalosa in transgenic plants. *TRENDS Plant Sci.*, **8**: 355-357.
- Pnueli, L., Hallak-Herr, E., Rozenberg, M., Cohen, M., Goloubinoff, P., Kaplan, A., y R. Mittler. 2002. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *The Plant Journal*, **31**: 319-330.
- Quiroga G., H.M. y R.F. Contreras. 2000. Efectos de la suspensión de riegos durante el verano en la alfalfa en su año de establecimiento. XVIII Congreso Nacional de Fitogenética. Notas Científicas. Sociedad Mexicana de Fitogenética. Pp 273.
- Ramanjulu, S., y D. Bartels. 2002. Drought- and desiccation-induced modulation gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment*, **25**: 141-151.
- Rolland, F., Moore, B. y J. Sheen. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. Suplemento. *The Plant Cell*, S185-S205.
- Romero, C., Bellés, J.M., Vaya, J.L., Serrano, R. y F.A. Cullanezmacia. 1997. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*, **201**: 293-297.
- Roser, B. J. 1991. Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends Food Sci. Technol.*, **2**:166-169.
- Roser, B.J. y C. Colaco. 1993. A sweeter way to fresher food. *New Scientist*, **138**:24-28.

- Salinas, S. 2000. La producción de alfalfa en México: pasado, presente y futuro. Memorias del congreso mundial de la leche. Querétaro, Qro. pp:53-54.
- Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Capítulo 11: Fijación de dióxido de carbono y síntesis de carbohidratos. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. 4ª edición. México.
- Sambrook J. y D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual. Volúmenes 1, 2 y 3. Cold Spring Harbor, New York, USA. Tercera edición.
- Sato S., Okamoto, K., Minami, R., Kohri, H. Y S. Yamamoto. 1999. Trehalose can be used as a parenteral saccharide source in rabbits. *The Journal of Nutrition*, **129**: 158-164.
- Smeekens, S. 1998. Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr Op Plant Biol.*, **1**: 230-234.
- Smeekens, J.C. 1998. Regulating metabolism by modifying the level of trehalose-6-phosphate by inhibiting endogenous trehalase levels. Smeekens Josephus Christianus (NL); MOGEN INT (NL). Patent WO 985061-A. 12 Nov 1998.
- Tabe, L.M., Wardley-Richardson, T., Ceriotti, A., Aryan, A., McNabb, W., More, A. e Higgins, T.J. 1995. A biotechnological approach to improving the nutritive value of alfalfa. *J Anim Sci.*, **73**: 2752-2759.
- Thakur, A. 2002. RNA interferente revolution. Review article. *Elect J Biotech.*, **6**: 39-49.
- Vaucheret H., y M. Fagard. 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.*, **17**: 29-35.
- Vogel, G., Aeschbacher, R.A., Müller, J., Boller, T. y A. Wiemken. 1998. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *The Plant journal*, **13**: 673-683.
- Uritani, M., Takai, M. y K. Yoshinaga. 1995. Protective effect of disaccharides on restriction endonucleases during drying vacuum. *Journal of Biochemistry*, **117**: 774-779.
- Voinnet, O. y D.C. Baulcombe. 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, **389**: 553
- Wesley, S.V., Helliwell, Ch.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Gleave, A.P., Green, A.G. y P.M. Waterhouse. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. TECHNICAL ADVANCE. *The Plant Journal*, **27**: 581-590.
- Wigdorovitz A., Carrillo, C., Dus Santos M.J., Trono, K., Peralta, A., Gomez, M.C., Ríos, R.D., Franzone, P.M., Sadir, A.M., Escribano, J.M. y Borca M.V. 1999. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral

immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, **255**: 347-353.

Wingler, A., Fritzius, Th., Wiemken, A., Boller, Th. Y R.A. Aeschbacher. 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **124**: 105-114.

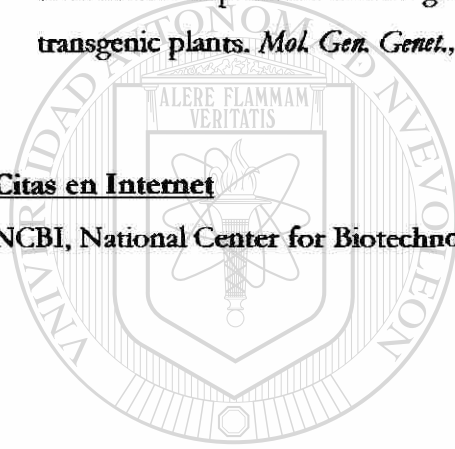
Wingler, A. 2002. The function of trehalosa biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, **60**: 437-440.

Xiong, L., Ishitani, M. y J-K. Zhu. 1999. Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in Arabidopsis. *Plan Physiology.*, **119**: 205-211.

Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki. 1992. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29A gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, **236**: 331-340.

Citas en Internet

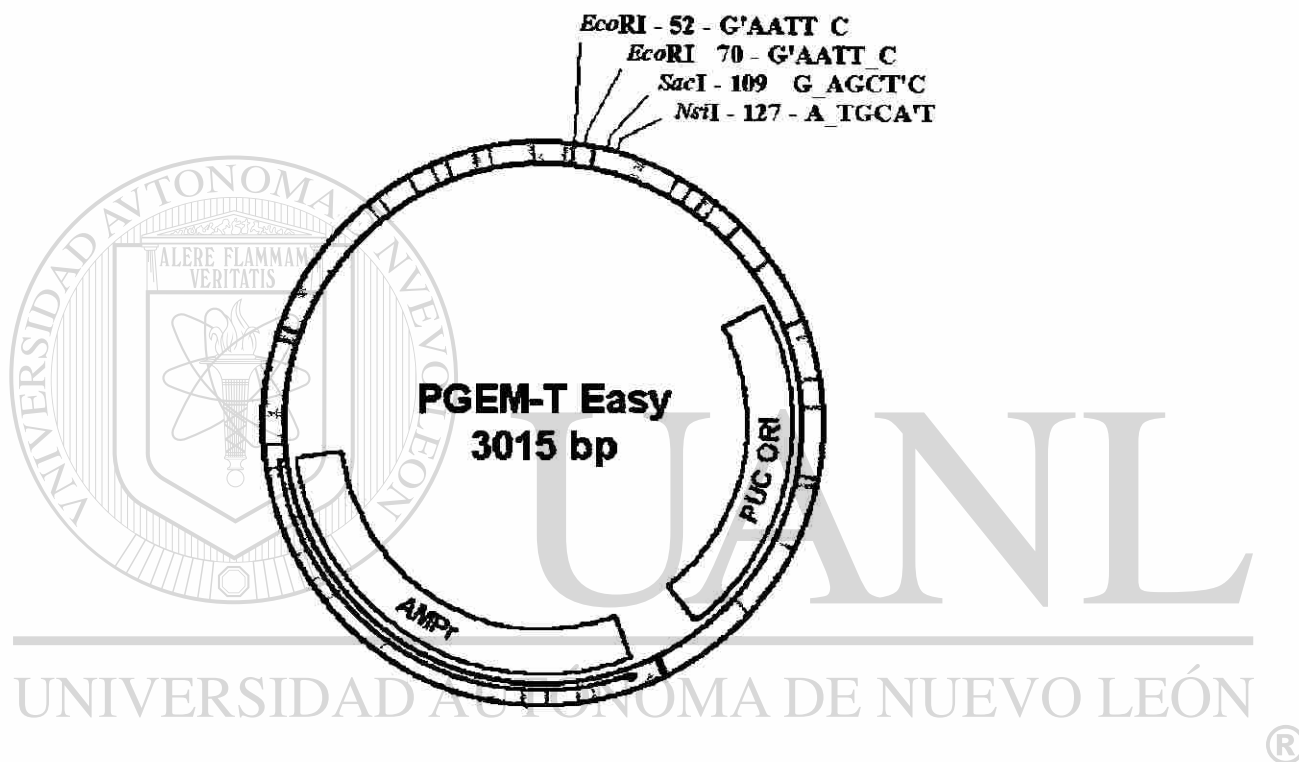
NCBI, National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>



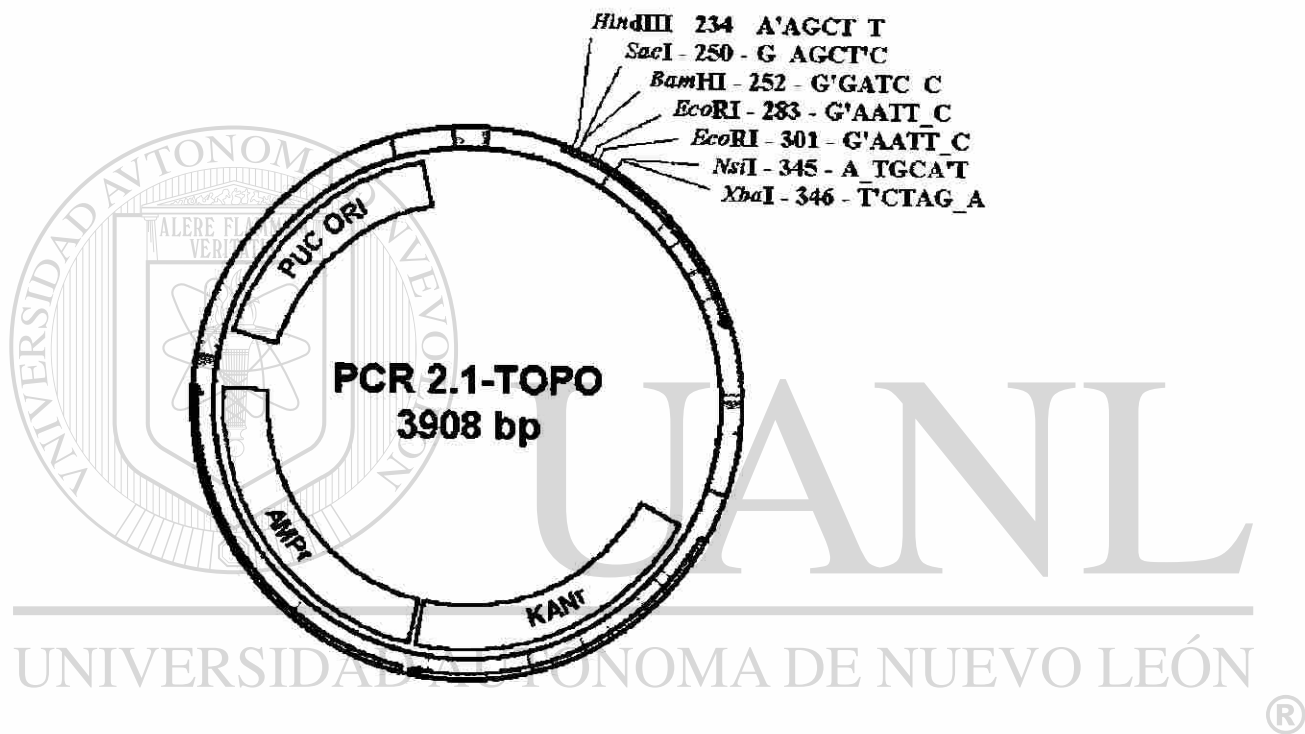
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

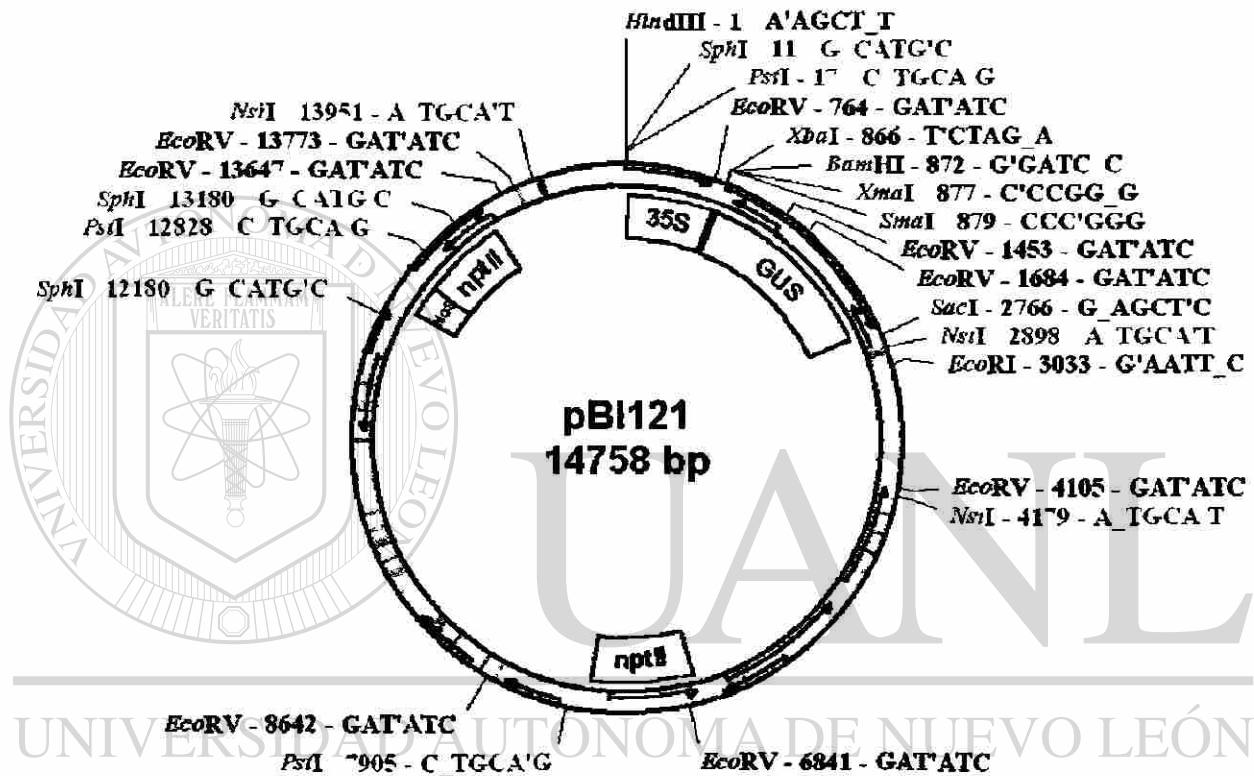
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



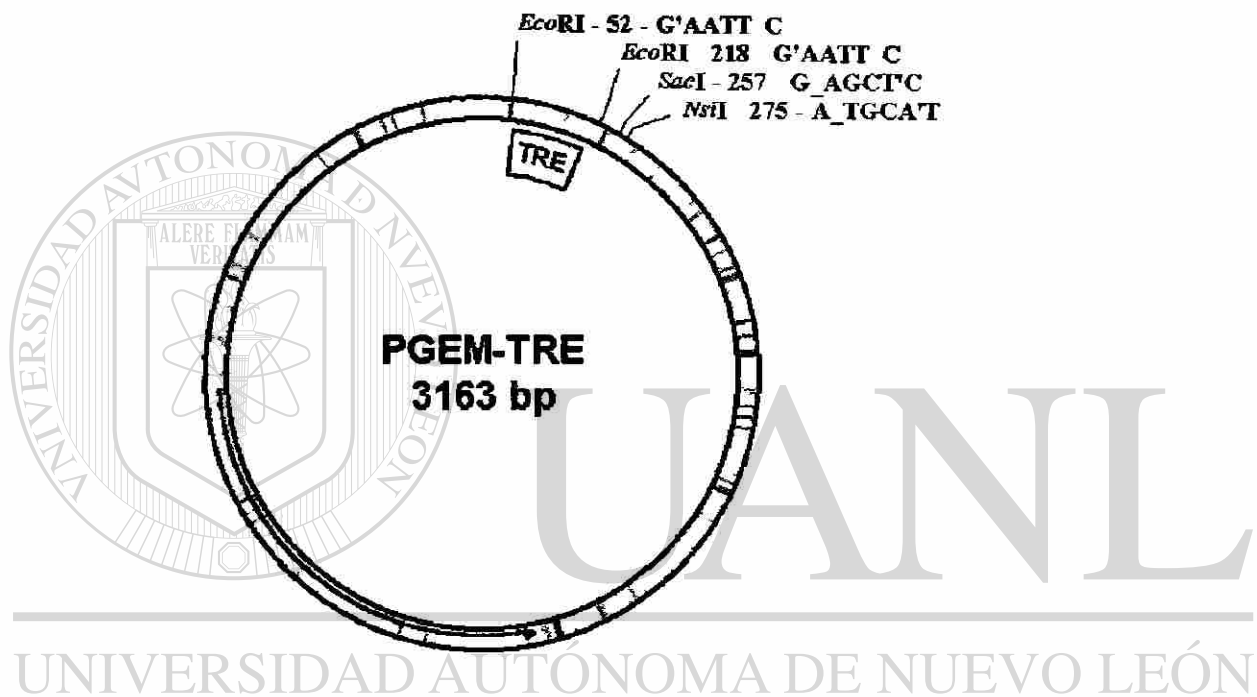
Mapa 1. Vector pGEMT Easy vector para clonación de productos de PCR (PROMEGA, Inc.).



Mapa 2. Vector TOPO TA pCR2.1 para clonación de productos de PCR (Invitrogen, Inc.).

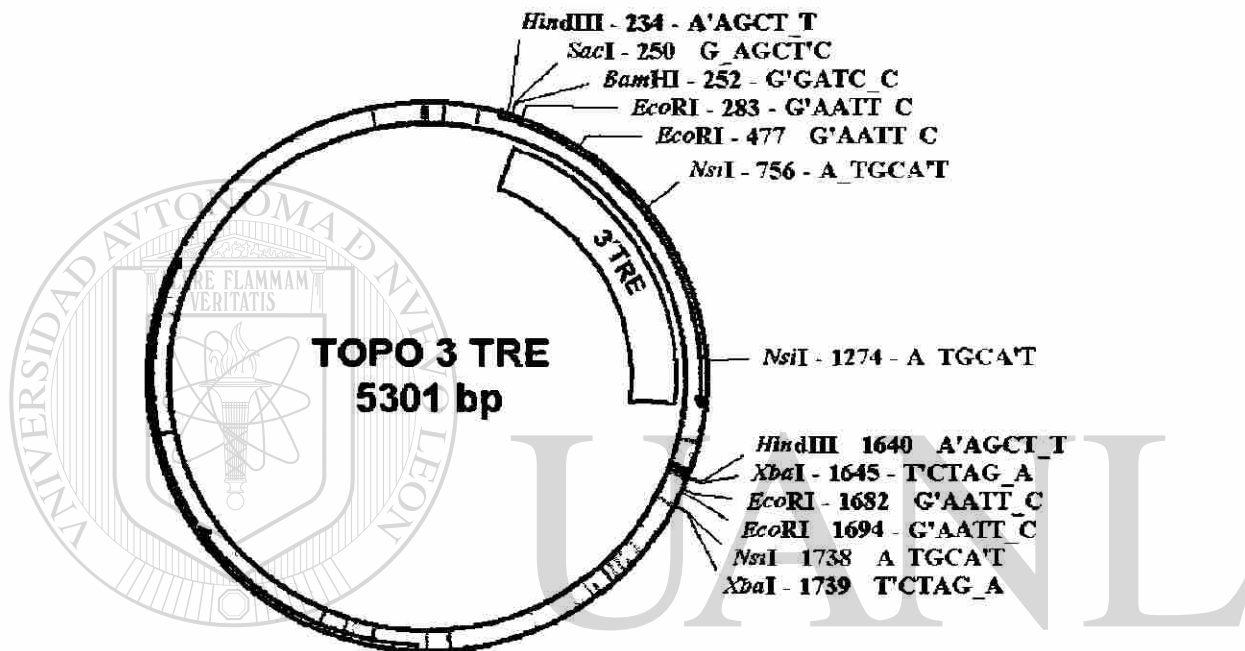


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
 Mapa 3. Vector para expresión en plantas pBI-121 (Clontech, Inc.).



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Mapa 4. Plásmido pGEM-TRE resultante de la clonación del fragmento de PCR de 150 pb de la secuencia interna de la trehalasa de alfalfa, en el vector pGEM-T Easy Vector (Promega^{MR}).

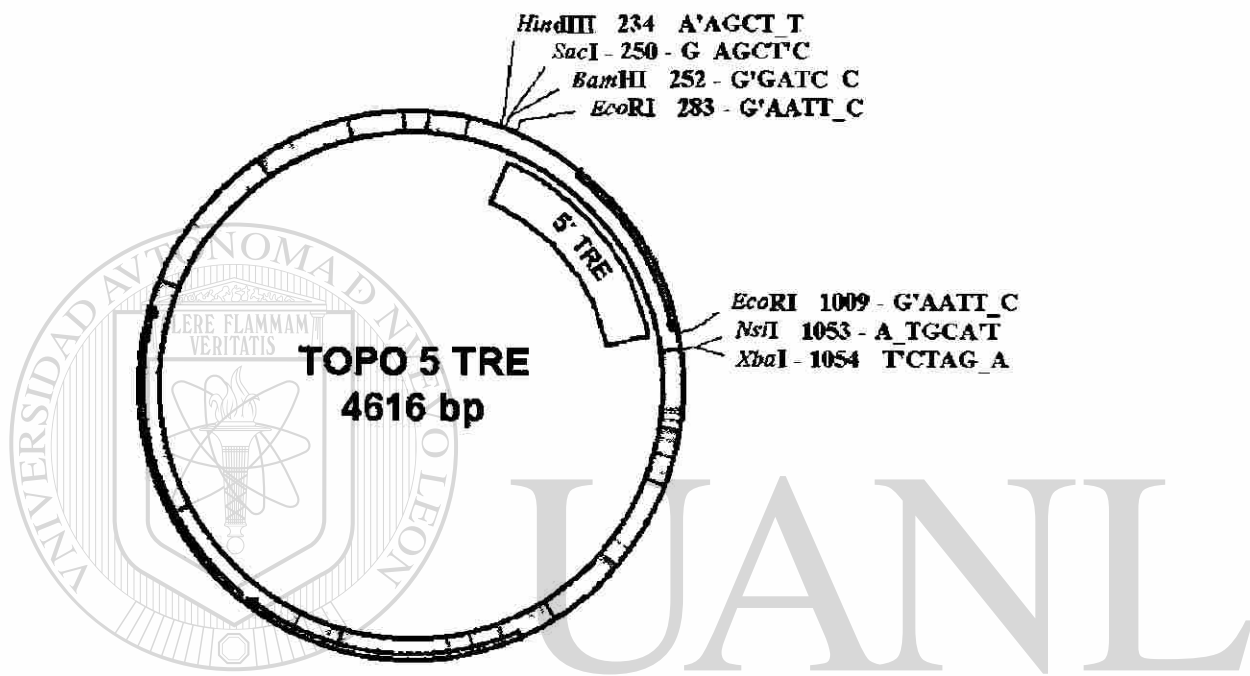


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



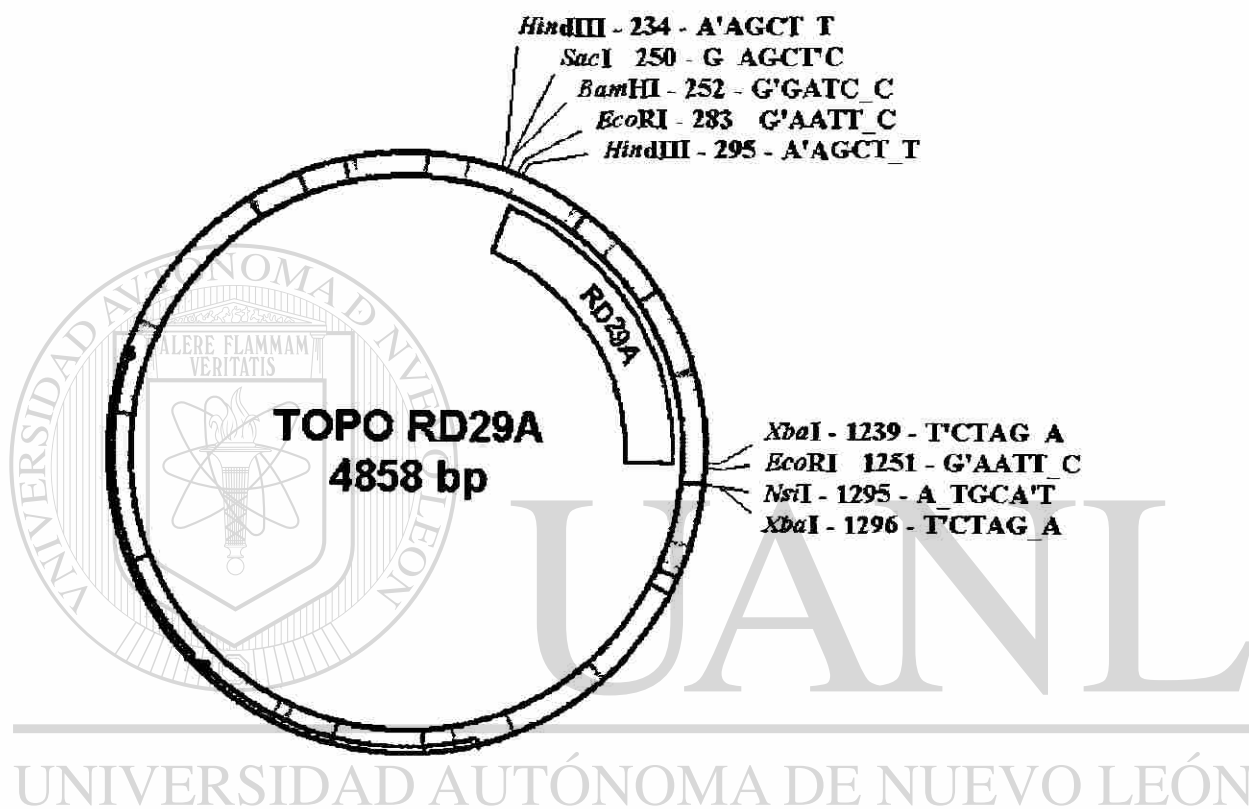
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Mapa 5. Plásmido pTOPO-3TRE resultante de la clonación del producto del protocolo 3'RACE de 1.2 Kb del extremo 3' del cDNA de la trehalasa de alfalfa, en el vector TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen, Inc.).

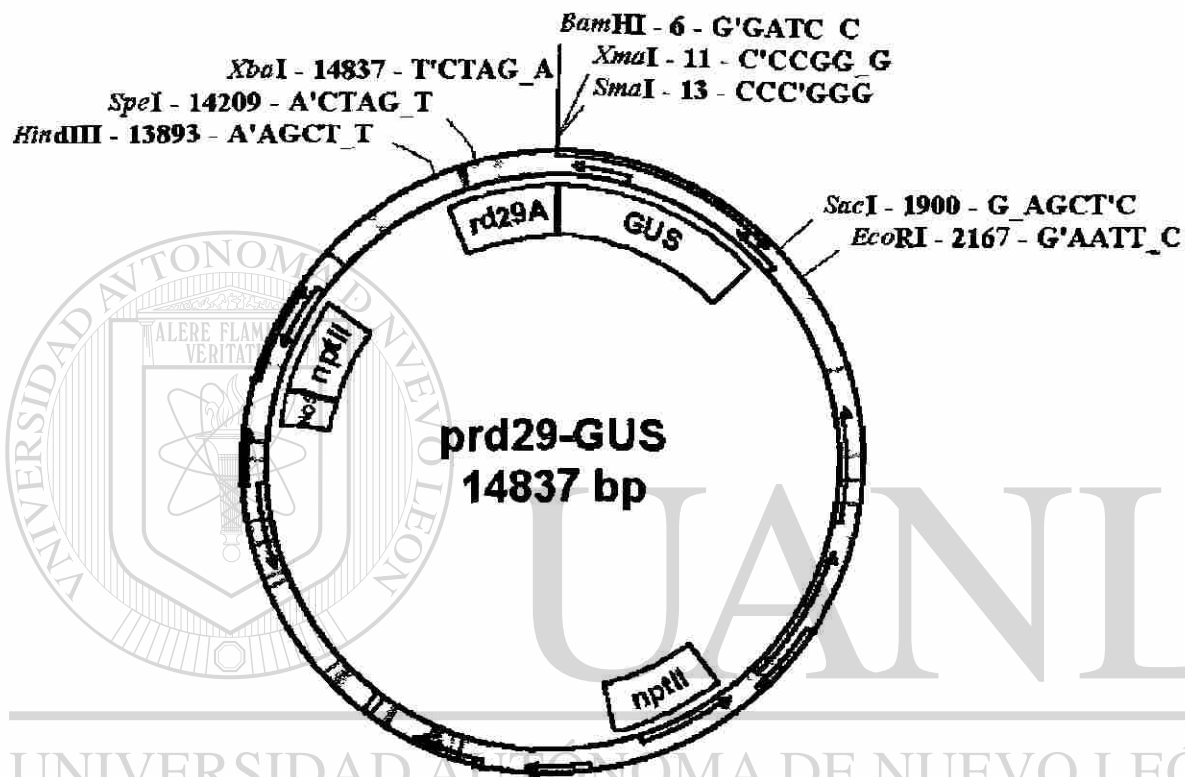


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

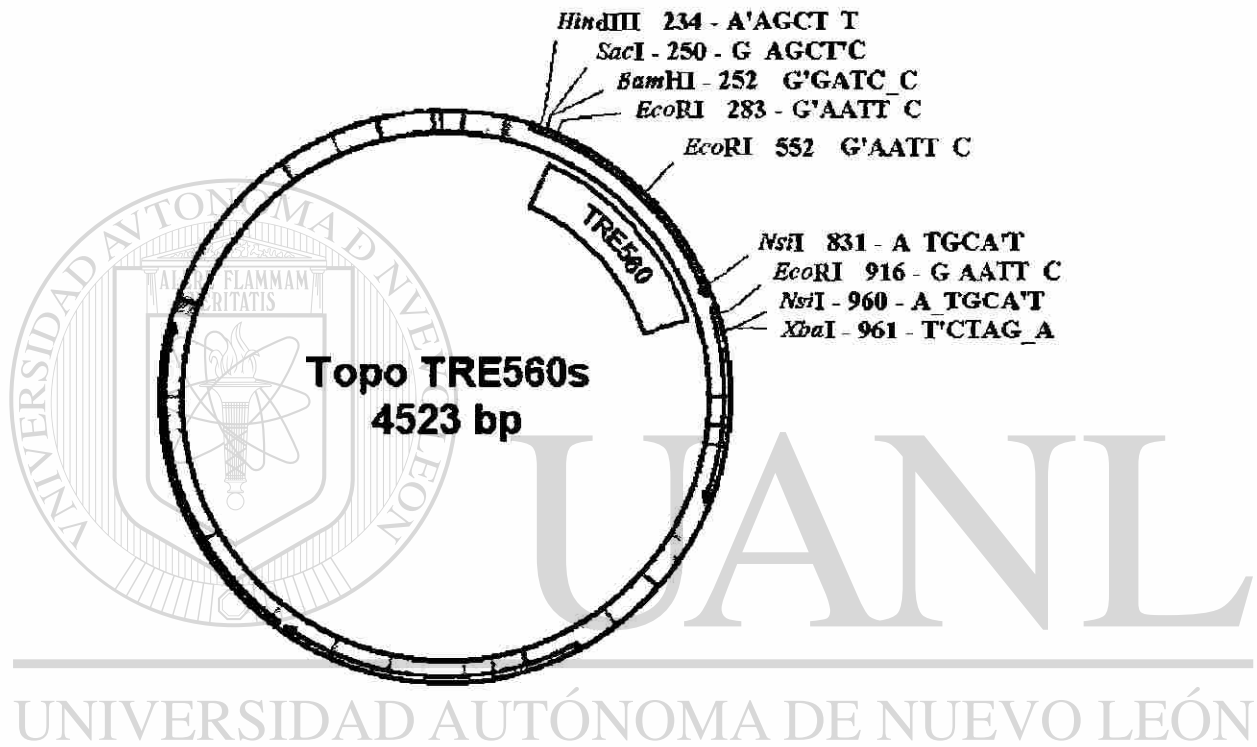
Mapa 6. Plásmido pTOPO-5TRE resultante de la clonación del producto del protocolo GeneRacer de 0.5 Kb del extremo 5' del cDNA de la trehalasa de alfalfa, en el vector TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen, Inc.).



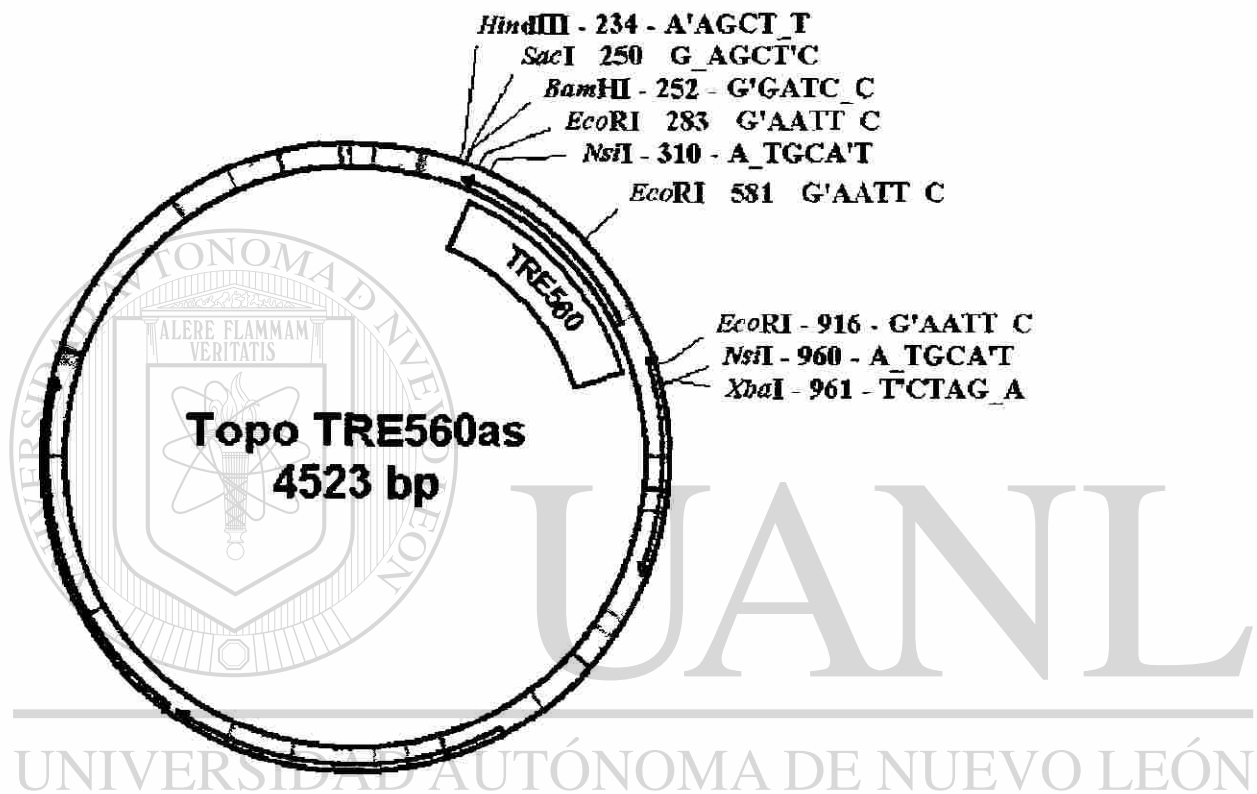
Mapa 7. Plásmido TOPO-RD29, producto de la clonación del fragmento de PCR de la secuencia promotora rd29A de *A. thaliana* en el vector TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen^{MR}).



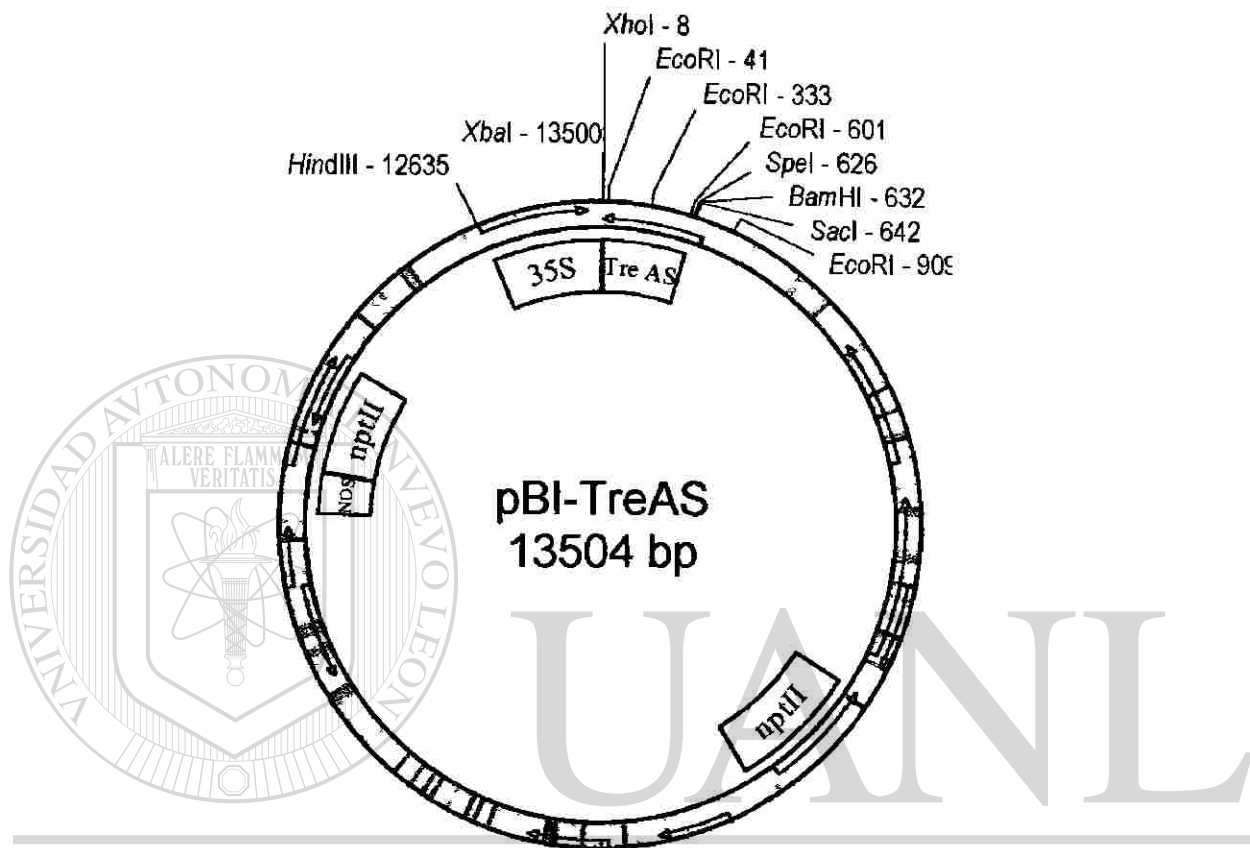
Mapa 8. Plásmido prd29-GUS, producto de la clonación de la secuencia promotora rd29A de *A.thaliana* en los sitios HindIII-XbaI del vector pBI-121, sustituyendo la secuencia promotora 35S CaMV.



Mapa 9. Plásmido TOPO-TRE560s, producto de la clonación en sentido *Sac*I-*Xba*I del fragmento de PCR de 560 pb de la secuencia interna de la trehalasa de alfalfa.

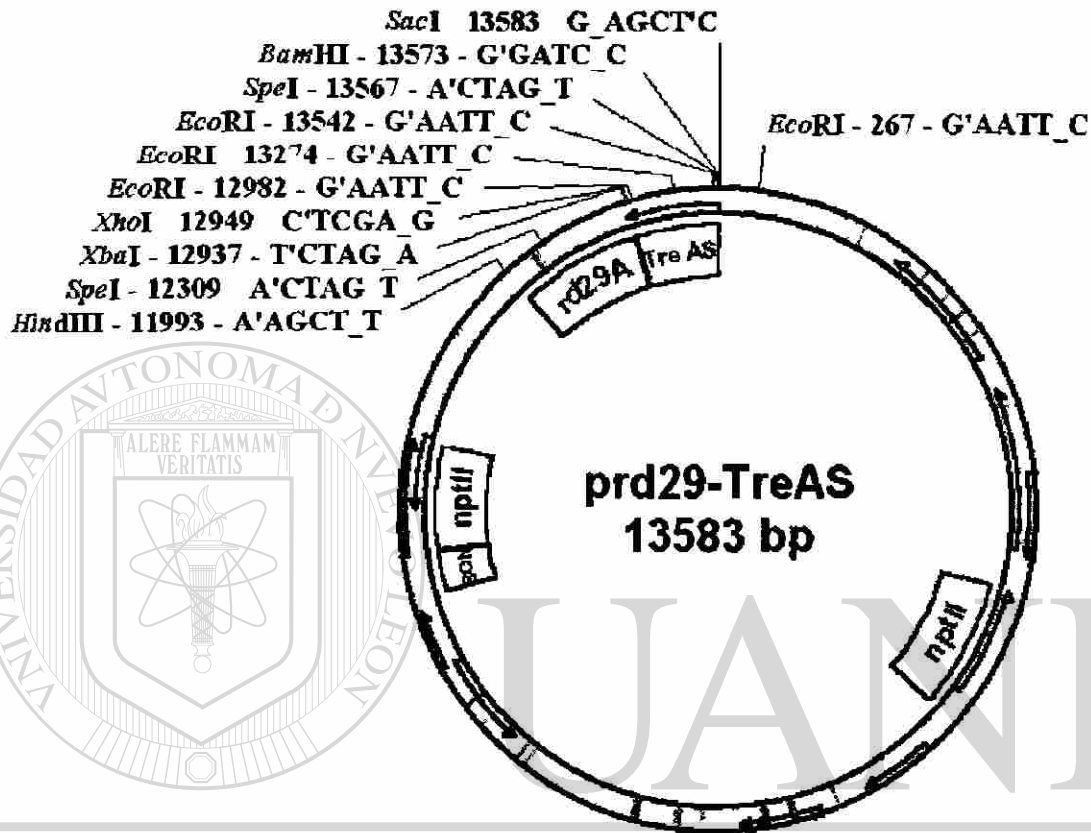


Mapa 10. Plásmido TOPO-TRE560s, producto de la clonación en sentido *Sac*I-*Xba*I del fragmento de PCR de 560 pb de la secuencia interna de la trehalasa de alfalfa.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Mapa 11. Plásmido pBI-TREas producto de la clonación de la secuencia TRE de 560 pb de la trehalasa de alfalfa en los sitios XbaI-SacI del vector pBI-121, sustituyendo el gen GUS.



Mapa 12. Plásmido prd29:TREas, producto de la clonación en antisentido de la secuencia TRE de 560 pb de la trehalasa de alfalfa, en los sitios XbaI-SacI del plásmido prd29:GUS, sustituyendo la secuencia del gen GUS.

TTATTACTGGGATTCTTATTGGGTAATTAGGGGGTTGTTGGCGAGTAAAATGTATAAGACTGCTAAATCTATT
GTCACCAATCTCATTTCATTGATTGAGGAATACGGGTTTGTGCTTAATGGTGCTAGAGCTTACTACACTAACA
GA

Secuencia 1. Fragmento de 148 pb de la secuencia interna del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

ACCAATCTCATTTTCATTGATTGAGGAATACGGGTTTGTGCTTAATGGTGCTAGAGCATACTACACTAACAGGA
GCCAGCCTCCCCTTTAAGCGCTATGATTTATGAGATATACGCTAGGACTGGTGATATAGAATTAGTTAAAAG
GTCTCTGCCTGCACTACTGAAAGAGCAGGAGTTTTGGAATTCAGATATACATAAAGTGAACATTTCCGGATGCT
CAAGGTTGCACTCGCACCTTAAATCGCTATTATGCAAGGTGGGACAAACCAAGGCCAGAATCGTCCACAATGG
ACAAGGCATCTGCTTCCAAGTTCAGGACTGTTTCAGAAAAACAACATTTTTXACCGTGAAGTAGCATCAGCTGC
TGAATCAGGATGGGATTTGAGCACAAGATGGATGAGACACCCTCCTAACTTCACAACATTTGCTTACAACATCA
GTGATACCTGTTGATTTAAATGCATTTCTACTTGGGATGGAACCTTAATATGTCCTTCTTTGCAAATGTTACTG
GAGATAATAGGACTGCTGAACACTTCCTGCAAATTTCCGATGTTAGAAAGGAGGCAATTAACCTCGGTTTTCTG
GAATGCAAAACATGAACCAATGGCTTGATTCCTGGCTCAGCAATACCACACATGAGAAGGTTCAAGTTTGGGAT
ACCCTGCACCAGAATCAAATGTATTTGCTTCCAATTTTGTTCCTTTGTGGATGAAGCCATTTTACTCAGATG
CTTTGCTAGTGAGTAATGTTCTCGAAAGTCTCAAACCTCTGGCCTGCTTCGTGCTGCTGGAGTTGCAACTTC
TTTGAGTGATTCAGGACAGCAGTGGGACTTCCCGAATGGTTGGGCTCCACTCAACACATGTTAGTTGAAGGC
CTTGTAATAATCAGGGTTGGAAGAAGCAAGGTCGTTGGCTGAAGAAATGGCCATAAGATGGATCACAACCAAT
ATATCGTTTACAAAAAACAGGTGTAATGCATGAAAAGTTTGACGTGGAACATTGCGGAGAATTTGGAGGTGG
GGTGAAATATGTACCCAGACTGGTTTTGGCTGGTCAAATGGAGTTGTGCTGGCATTCTTGGAGGAGTTTGGG
TGCCCCGAAGATCGTAAAATAGAATGCTAATGTGCTAAAAAATGAAAGGTACAATAAGTTTGGTATGCTTTAA
GAATTTACTTAGTAAATCAATTTTTCCACAAGTGGGTGAAGAAAAATTGTTTATAATTGCTTGTGTTGAAAAGC
TACTTGTAAAAGCTATAAATAAAGCAGAGATAATGAAGAACTTGATTGGCGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAATAAAGCTTCTAGAGTGCACACCATTAAGCACAAACCCGAAGGGC
GAATTC

Secuencia 2. Extremo 3' de la secuencia del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

GGACACTGACATGGACTGAAAGGAGTAGAAAATCTTTCTTGTGGCATTGATTTTGCATTGTTCTCTTCATTC
CTCATTGGTGGAAAGGAAGCAAGGAGGGGGAACATTGAAAAGACATTCCAAGCAAAGCAAACAAAAGTCCGCCA
CTTTGCTTCAAGTCAACTGCCGACTCTACAGTGACAGCATCAACTATGGACGACGACGTGAAGCCCTTCAACTC
CACTCGTATCCTTTCTCGAAATCTCCAACACACCGCATTCAACACATTCGGCAATCACAATTTCCGATCCTAA
AACCTACGTGATTTACCTCTCAAATTTCCCTTTCCGATACGGATCACGCTTCCAGAATCTTCTCAAATCC
TCGACTGGFTCAGTGTCCGTTTATGATTTGAATCGTTTTATAGAAACTTATTTTGATGGTGCAGGTGATGATC
TCGTGTACTCTGATCCAGAGGATTTTGTCCCTGAGCCTGAGGGTTTTTGCCTAAAGTAAAAACCCCTGAGGT
CAGAGCATGGGCGATTAAGGTTCAATCTCTTTGGAAAACTTGAGTAGGAAAGTATCCACTGAGGTCAAGACT
CACCTTAACCTACCATACTCTGCTTCTGTTCTGTTCTGTTGTTATCCCTGGTTCCGATTTCTGTAAGTAT
ATTACTGGGATTCCTACTGGGTAATTAGGGGGTTGTTGGCGAGTAAAATGT

Secuencia 3. Extremo 5' de la secuencia del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

PROTOCOLOS

Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala por lisis alcalina

- a) Levantar una colonia transformante y crecerla en medio LB (Tifco, Inc.) líquido con antibiótico de selección a 37°C 200 rpm durante toda la noche.
- b) recuperar la pastilla bacteriana por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 seg.
- c) resuspender la pastilla bacteriana en 100 µl de Solución I (glucosa 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8.6, EDTA 10 mM pH 8.0).
- d) Agregar 200 µl de Solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%) y mezclar suavemente por inversión.
- e) Agregar 150 µl de Solución III (acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 12%) y mezclar por agitación.
- f) Decantar sobrenadante en un tubo nuevo y agregar 1 vol de isopropanol. Incubar 2 min a temperatura ambiente.
- g) Centrifugar a 14,000 rpm durante 20 min a 4°C. Descartar sobrenadante.
- h) Lavar pastilla con 1 ml de etanol 70% y remover el exceso de alcohol. Dejar secar al aire 2 min.
- i) Resuspender la pastilla en 50 µl de agua desionizada estéril. Almacenar a -20°C.

Extracción de ácidos nucleicos de origen vegetal

1.- Extracción de RNA total mediante TriReagent^R

- a) Homogenización de tejido. Utilizando un homogenizador o Polytron, homogenizar 50-100 mg de tejido en 1 ml de TriReagent.
- b) Separación de fases. Incubar el homogenizado por 5 min. a temperatura ambiente, para permitir una completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente, añadir 200 µl de cloroformo por ml de TriReagent y agitar por 15 seg. Incubar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2-15 min, y centrifugar a 12,000 g por 15 min a 4°C. Después de centrifugar, la mezcla se separa en una fase inferior roja de fenol:cloroformo, la interfase, y la fase acuosa superior incolora. El volumen de la fase acuosa es cerca del 60% del

volumen de TriReagent utilizado para la homogenización.

c) **Precipitación de RNA.** Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y precipitar el RNA con isopropanol. Para remover las proteoglicanos y polisacáridos que contaminan la muestra de RNA, añadir a la fase acuosa 250µl de isopropanol, seguido de 250µl de una solución de alta salinidad para precipitación (0.8M de citrato de sodio y 1.2M de NaCl) por ml de TriReagent utilizado. Mezclar la solución e incubar de 5-10 min a temperatura ambiente, y centrifugar a 12,000g por 8 min a 4-25°C. Esta modificación precipita el RNA, mientras que los polisacáridos y proteoglicanos se mantienen en forma soluble.

d) **Lavado del RNA.** Remover el sobrenadante y lavar la pastilla de RNA con etanol al 75% en vortex y centrifugar a 7,500g por 5 min a 4-25°C. Agregar al menos 1 ml de etanol al 75% por cada ml de TriReagent utilizado en la homogenización. Si la pastilla de RNA se acumula en la pared del tubo y tiene tendencia a flotar, sedimentar la pastilla a 12,000g.

e) **Solubilización de RNA.** Remover el etanol del lavado y secar la pastilla de RNA al aire de 3-5 min. Es importante no secar completamente la pastilla de RNA, ya que esto disminuye su solubilidad. No seque la pastilla por centrifugación al vacío. Disuelva el RNA en agua o SDS 0.5% pipeteando un poco, e incubar por 10-15 min a 55-60°C. El agua o la solución de SDS utilizadas deben ser libres de RNasas, tratadas con dietil pirocarbonato (DEPC).

2.-. Extracción de DNA genómico.

a). Moler 3 gr de tejido en nitrógeno líquido y transferir a un tubo Falcon de 50 ml.

b) Agregar 9 ml de buffer NTES (100mM NaCl, 100mM Tris pH 7.5, 100mM EDTA pH 8.0, 1% SDS). Y mezclar suavemente.

c) agregar 6 ml de fenolcloroformo (1:1; v/v) y mezclar suavemente.

d) Centrifugar a 8,000 rpm por 20 min a 4°C.

e) Tomar la fase acuosa y transferirla a un tubo nuevo. Agregar 0.1 vol de acetato de sodio 2M (pH 4.8) y 1 vol de isopropanol. Mezclar e incubar 30 min a -20°C.

f) Centrifugar a 8,000 rpm por 30 min a 4°C.

e) Recuperar el sobrenadante y agregar 2 vol de etanol. Incubar 30 min a -20°C, y precipite por centrifugación.

f) Enjuagar la pastilla con 1-2 ml de etanol 70%. Remover el excedente de alcohol y dejar secar al aire por 5 min.

g) Disolver la pastilla en 2.5 ml de agua y agregar 2.5 ml de cloruro de litio 4M. Mezclar bien e incubar en hielo toda la noche.

h) Centrifugar a 8,000 rpm por 10 min a 4°C.

i) recupere la pastilla y enjuage en 2 ml de etanol 70%.

j) disolver la pastilla en 2 ml de agua desionizada estéril.

Síntesis de secuencias nucleotídicas: 3' RACE.

1. Manejo de RNA. Utilizar RNA total en buenas condiciones. Trabajar con puntillas y tubos esteriles en un área limpia, y utilizar guantes para evitar contaminar con RNasa.

2. Síntesis de cadena complementaria. Utilizar de 1 a 5 µg de RNA total, y llevar a cabo la síntesis por transcripción reversa, utilizando el sistema Avian Enhanced RT (SIGMA), utilizando el oligo d[Γ]23.

3. Primer PCR. Utilizar 3 µl del cDNA obtenido para llevar a cabo el primer PCR utilizando el oligo específico para la secuencia y el oligo 18HXS.

4. PCR semianidado. Utilizar de 1 µl de producto de PCR obtenido para una reacción semianidada utilizando un oligo específico más interno de la secuencia y el oligo 18HXS.

5. Clonar el producto de PCR en un vector de clonación.

Transformación de material vegetal.

1.- Preparación de partículas de Tungsteno.

La técnica utilizada fue de acuerdo a Tomes *et al.*, 1995, y modificada por Cabrera *et al.*, 1997, como sigue:

a) Pesar 60 mg de partículas de tungsteno.

b) Resuspender en 2 ml de HNO₃ 0.1N y sonicar por 20 min.

c) Centrifugar a 10,000 rpm por 2 min.

d) Eliminar el sobrenadante y aplicar 2 ml de etanol absoluto, sonicar brevemente.

- e) Centrifugar a 10,000 rpm por 2 min.
- f) Eliminar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de agua desionizada estéril.
- g) Tomar 4 alicuotas de tungsteno de 250 μ l, resuspender en 750 μ l de agua desionizada estéril en cada uno de los tubos.
- h) La concentración final de tungsteno en cada uno de los tubos es de 15 μ g/ μ l.
- i) Almacenar a -20°C.

2.- Recubrimiento de partículas de tungsteno con DNA.

La técnica utilizada fue de acuerdo a Tomes *et al.*, 1995, y modificada por Cabrera *et al.*, 1997, como sigue:

- j) Pesar 60 mg de partículas de tungsteno.
- k) Resuspender en 2 ml de HNO₃ 0.1N y sonicar por 20 min.
- l) Centrifugar a 10,000 rpm por 2 min.

3.- Regeneración de transformantes.

Los explantes bombardeados con el DNA se colocaron para su diferenciación en medio IBA (MS [Murashige y Skooge], Sac [sacarosa] 2%, BAP [bencil amino purina] 1.5 μ M, Kan [kanamicina] 100 μ g/ml), y se mantuvieron a 25°C con fotoperiodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad, por 5 semanas cuando se obtuvo la diferenciación del tejido en brotes. Dichos brotes se pasaron a medio IBA (MS 0.5X, Sac2%, IBA [ácido indol butírico] 2 μ M, Kan 100 μ g/ml) para la diferenciación del sistema radicular. Una vez regenerada la planta por completo, se mantuvieron en medio MS Sac2% Kan 100 μ g/ml, en el cual se propagaron vegetativamente hasta obtener suficientes individuos de cada línea transformante.

Determinación de la actividad trehalasa en plantas.

- a) Congelar 1 gr de muestra en nitrógeno líquido y moler. Disolver en 4 ml de buffer extracción MES (MES [KOH] 0.1M pH 6.3, PMSF 2mM, EDTA 2mM) (Sambrook y Russell, 2001).
- b) centrifugar por 20 min a 12,000 rpm a 4°C.
- c) preparar en un tubo de 1.5 ml la siguiente reacción:

700 μ l de buffer de ensayo (MES [KOH] 50mM pH 6.3)

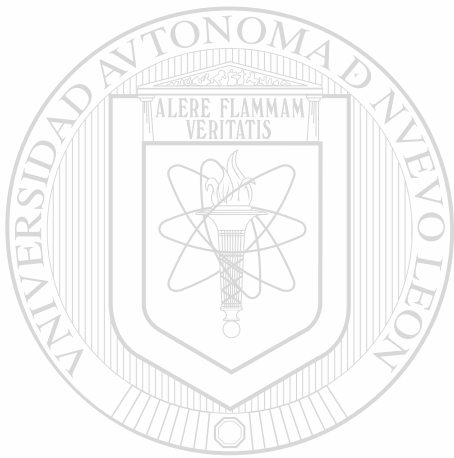
100 μ l de trehalosa 100 mM

200 μ l de extracto protéico vegetal

d) incubar la mezcla de reacción por 30 min a 37°C y detener la reacción por calentamiento a 70°C durante 10 min.

e) centrifugar por 20 min a 12,000 rpm a 4°C

f) recuperar el sobrenadante y cuantificar la producción de glucosa con el sistema GO-Assay (SIGMA).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

