

Tesis Doctoral

Aislamiento y caracterización de regiones promotoras de girasol para dirigir la expresión tejido específica de genes foráneos a semilla

Zavallo, Diego

2011

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

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

Cita tipo APA:

Zavallo, Diego. (2011). Aislamiento y caracterización de regiones promotoras de girasol para dirigir la expresión tejido específica de genes foráneos a semilla. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Zavallo, Diego. "Aislamiento y caracterización de regiones promotoras de girasol para dirigir la expresión tejido específica de genes foráneos a semilla". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE REGIONES
PROMOTORAS DE GIRASOL PARA DIRIGIR LA
EXPRESIÓN TEJIDO ESPECÍFICA DE GENES
FORÁNEOS A SEMILLA**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Diego Zavallo

Director de tesis: Dra. Ruth Heinz

Director Asistente: Dra. Marisa López Bilbao

Consejero de estudios: Dr. Esteban Hopp

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICVyA, CNIA, Instituto Nacional
de Tecnología Agropecuaria, Castelar

Buenos Aires, Febrero 2011

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE REGIONES PROMOTORAS DE GIRASOL PARA DIRIGIR LA EXPRESIÓN TEJIDO ESPECÍFICA DE GENES FORÁNEOS A SEMILLA

Resumen

Desde el inicio de la utilización de variedades transgénicas, la superficie agrobiotecnológica ha aumentado exponencialmente, con un incremento del orden de 80 veces en solo 14 años, y su uso se ha expandido a más de veinte especies vegetales. Las ventajas obtenidas con estos cultivos transgénicos de primera generación incluyen: mejor control de insectos y malezas, mayor productividad, y una reducción del uso de agroquímicos. Los avances de la biotecnología en los últimos años permitirán, probablemente en un futuro muy cercano, el desarrollo de cultivos con características de interés para los consumidores, relacionadas con una mejora en la calidad nutritiva.. En este sentido las semillas constituyen un blanco ideal para este tipo de cultivos debido a sus propiedades de dormición, almacenamiento de nutrientes y la capacidad de germinar en condiciones limitantes de nutrientes. En este trabajo, se aislaron las regiones promotoras de tres genes específicos de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L. HA89), que codifican para una proteína de transferencia de lípidos (HaAP10), una oleato desaturasa (HaFAD2-1) y una oleosina (HaOLE), las cuales fueron clonadas y caracterizadas “*in silico*”. Los fragmentos aislados de 964, 867 y 1838pb respectivamente, contienen en sus secuencias varios motivos específicos de semilla como elementos *GCN4*, motivos (*AACA*) y (*ACTG*), *Prolamine-Box*, *E-Box*, *G-Box*, sitios de unión *SEF*, *Sh1 Box* y elementos *RY/G* repetidos entre otros. A su vez, contienen motivos de respuesta a hormonas *ABRE* y *GARE* (ácido abscísico y giberélico) relacionados con desarrollo embrionario. Se realizaron análisis funcionales mediante la fusión de los promotores aislados al gen reportero GUS en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y lechuga. No se observó actividad de la proteína reportera en ningún tejido vegetativo exceptuando los cotiledones de plántulas pequeñas. Al ser analizados a lo largo del desarrollo de la semilla, se observó tinción específica restringida a tejido embrionario. En los ensayos fluorométricos cuantitativos se observó actividad en estadios tardíos del desarrollo, similares a los patrones típicos de genes de

reserva, siendo el HaFAD2-1 un promotor con una fuerte actividad específica de semilla, con niveles similares a los del promotor constitutivo 35S.

En este trabajo de tesis se confirmó que las regiones promotoras aisladas dirigen la expresión a semilla en forma específica y fuerte, con diferencias temporales, constituyendo, por lo tanto, importantes herramientas que podrán ser de utilidad en futuras aplicaciones biotecnológicas.

Palabras claves: Promotores de semilla-Girasol-Oleato desaturasa-Proteína de transferencia de lípidos-Oleosina.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SUNFLOWER PROMOTER REGIONS TO DIRECT GENE EXPRESSION TO SEED ORGAN

Abstract

The successful engineering of genetically modified (GM) crops has been increasing exponentially, and its use has been widely extended in more than 20 species. The advantages obtained with this first generation of transgenics include: herbicide and pathogen tolerance, increased productivity and reduction of agrochemical use. Second generation crops will soon bring to the consumers products with better nutritious properties. In this regard, seeds are natural storage organs that accumulate high levels of lipids and proteins and constitute ideal targets for expression of recombinant proteins to increase nutritional contents and to develop molecular farming strategies.

Here, we report the isolation and functional characterization of three novel sunflower seed-specific promoters which encoded for a sunflower lipid transfer protein HaAP10, an oleate desaturase HaFAD2-1 and an oleosin HaOLE. The 5' fragments of 964 bp, 867 bp and 1838 bp respectively, were isolated, cloned and sequenced. Bioinformatic analyses of these sequences allowed the identification of several cis-elements involved in seed-specific transacting factors such as GCN4 motif, AACA motif, ACGT element E-Boxes, SEF binding sites and Sh1 Box. Among them, it is worth mentioning that ABRE and GARE elements which are related to embryo or seed development, were also identified. Putative promoter regions of these three genes were cloned into expression vector, directing the expression of the GUS gene. *Arabidopsis thaliana* and Letuce plants were transformed with these constructions. No GUS activity was displayed in any vegetative tissue. Although, promoter activity at different seed developmental stages showed GUS expression in embryos and mature seeds. Quantitative fluorometric assays showed activity on late seed developmental stage, similar to seed storage protein patterns, being the HaFAD2-1 a strong specific seed promoter with similar expression level to the 35S constitutive promoter.

In this thesis we confirmed that the isolated regions are strong specific seed promoters, with distinct temporal expression patterns. These promoters represent potential biotechnological tools that may be useful for future biotechnological applications..

Keywords: Seed promoter- Sunflower-Oleate desaturase-Lipid transfer protein- Oleosin

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	10
LA BIOTECNOLOGÍA Y EL MEJORAMIENTO VEGETAL.....	10
APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA A ESPECIES AGRÍCOLAS.....	11
SITUACIÓN ACTUAL DE LOS CULTIVOS BIOTECNOLÓGICOS EN EL MUNDO.	12
SITUACIÓN DE LOS CULTIVOS TRANSGÉNICOS EN ARGENTINA	13
CULTIVOS TRANSGÉNICOS DE SEGUNDA GENERACIÓN	14
SEMILLAS COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN	15
PROMOTORES	17
PROMOTORES DE EXPRESIÓN EN SEMILLA	18
EL GIRASOL.....	20
LA LECHUGA.....	21
GENES CANDIDATOS DE GIRASOL CON EXPRESIÓN EN SEMILLA	21
ESTUDIOS EN GIRASOL Y LECHUGA EN NUESTRO GRUPO.....	22
OBJETIVOS.....	24
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
MATERIAL VEGETAL.....	25
MUESTREO DEL MATERIAL VEGETAL.....	26
OLIGONUCLÉOTIDOS INICIADORES UTILIZADOS.....	27
VECTORES UTILIZADOS	29
CEPAS BACTERIANAS.....	30
TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS E. COLI COMPETENTES.....	30
ELECTROPORACIÓN DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS.	31
MINIPREPARACIONES DE ADN PLASMÍDICO.....	31
GELES DE AGAROSA.	31
PURIFICACIÓN DE ADN DE AGAROSA.....	32
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	32
EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE GIRASOL.....	33
RT-PCR.....	34
5' RACE (RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS).....	35
NORTHERN BLOT.....	35
AISLAMIENTO DE REGIONES PROMOTORAS DE LOS GENES CANDIDATOS.....	36
SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS.....	37
ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS PROMOTORAS.....	37
CLONADO DE PROMOTORES PARA SU ANÁLISIS FUNCIONAL.....	38
TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA POR BOMBARDEO (BIOLÍSTICA).....	39
TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE HOJAS DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	39
TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE PLANTAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> Y CONFIRMACIÓN DE TRANSGÉNICAS POR PCR.....	40
DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA REPORTERA B-GLUCURONIDASA (GUS) MEDIANTE EL MÉTODO COLORIMÉTRICO.....	40
DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA REPORTERA B -GLUCURONIDASA (GUS) MEDIANTE EL MÉTODO FLUOROMÉTRICO.....	41
TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE PLANTAS DE LECHUGA Y CONFIRMACIÓN DE TRANSGÉNESIS POR PCR.....	41
MEDIOS DE CULTIVO.....	43
CULTIVOS BACTERIANOS	43
CULTIVOS VEGETALES	43
RESULTADOS.....	45
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES CANDIDATOS DE EXPRESIÓN ESPECÍFICA EN SEMILLAS DE GIRASOL.....	45
<i>Identificación de genes candidatos</i>	45

<i>Caracterización de genes candidatos</i>	46
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PROMOTORES ESPECÍFICOS DE SEMILLA.....	51
<i>Aislamiento de promotores</i>	51
<i>Genoteca de girasol en BACs</i>	51
<i>Genome Walker</i>	53
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS PROMOTORES	57
<i>Promotor HaAP10</i>	57
<i>Promotor HaFAD2-1</i>	58
<i>Promotor HaOLE</i>	59
ENSAYOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA MEDIANTE BOMBARDEO	60
ENSAYOS DE AGROINFILTRACIÓN DE HOJAS DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	63
CARACTERIZACIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DE LOS PROMOTORES EN EL SISTEMA MODELO <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	64
CARACTERIZACIÓN ESPACIAL DE LOS PROMOTORES EN <i>LACTUCA SATIVA</i> , ESPECIE MODELO DE LA FAMILIA COMPOSITAE.	70
DISCUSIÓN	76
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GENES CANDIDATOS DE EXPRESIÓN ESPECÍFICA EN SEMILLAS DE GIRASOL.	76
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PROMOTORES ESPECÍFICOS DE SEMILLA.....	80
CARACTERIZACIÓN DE EXPRESIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DE LOS PROMOTORES EN EL SISTEMA MODELO <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	82
CARACTERIZACIÓN ESPACIAL DE LOS PROMOTORES EN <i>LACTUCA SATIVA</i> , ESPECIE MODELO DE LA FAMILIA COMPOSITAE.	85
CONCLUSIONES	88
REFERENCIAS	90

Abreviaturas

35S: promotor 35S del virus del mosaico del coliflor

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ANA: ácido 1-naftalenacético

ARNasa A: ribonucleasa A

BAP: 6-bencilaminopurina

BSA: *bovine serum albumin* (seroalbúmina bovina)

°C: grados Celsius

cm, mm, μm , nm: centímetros, metros, milímetros, micrómetros, nanómetros

CTAB: *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (bromuro de cetiltrimetilamonio)

dNTP: deoxinucleótido trifosfato

DPF: días post floración

EDTA: Sal disódica del ácido etilen diamino tetraacético

EEA: Estación experimental agropecuaria

etc.: etcétera

EUA: Estados Unidos de América

g, mg, μg : gramos, miligramos, microgramos

G: fuerza de gravedad

GC-MS: gas chromatography-mass spectrometry (cromatografía gaseosa - espectrometría de masa)

GA: ácido giberélico

GFP: *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

GM: Genéticamente modificado

GUS: gen de la enzima β -glucuronidasa

h: horas

IB: Instituto de Biotecnología

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IPTG: Isopropil-b-tiogalactopiranosido

kpb: kilo pares de bases

l, μ l, ml: litros, microlitros, mililitros

LB: Luria Bertani

M, μ M, mM: molar, micromolar, milimolar

MES: *4-morpholineethanesulfonic acid* (ácido 4-morfolinoetanosulfónico)

min: minutos

MMA: Medio mínimo A

MS: medio Murashige Skoog

MS1/2: medio MS con la mitad de la concentración de sales

MUG: 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido

OD: *optical density*

ON: *overnight*

Nº: número

p: valor p o probabilidad de rechazar incorrectamente la hipótesis nula en una prueba estadística.

PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PPM: *Plant Preservative Mixture*, nombre comercial de la mezcla de 5-cloro-2-metil-3(2H)-isotiazolona y 2-metil-3(2H)-isotiazolona.

ppm: partes por millón

psi: *pounds per square inch* (libras por pulgada cuadrada)

PVP: polivinilpirrolidona

rpm: revoluciones por minuto

seg: segundos

SDS: *sodium dodecyl sulfate* (dodecilsulfato sódico)

SSC: *saline-sodium citrate* (citrato de sodio salino)

SSP: seed storage protein (proteínas de almacenamiento de semillas)

TAE: Tris-acetato EDTA

UV: ultravioleta

V: volts

X-Glu: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico

Introducción

La biotecnología y el mejoramiento vegetal

La biotecnología ha sido utilizada por el hombre desde los comienzos de la historia en actividades tales como la preparación del pan y de bebidas alcohólicas o el mejoramiento de cultivos y de animales domésticos. Históricamente, la biotecnología implica el uso de organismos para realizar una tarea o función. Así, procesos como la producción de cerveza, vino, queso, yogurt y pan implican el uso de bacterias o levaduras con el fin de convertir un producto natural como leche o jugo de uvas, en un producto de fermentación más apetecible como el yogurt o el vino.

En las plantas, la manipulación genética es una práctica tan antigua como la propia agricultura. Desde sus comienzos, el hombre ha intentado modificar las plantas que utiliza para dotarlas de características más ventajosas. Así, ha ido surgiendo primero de forma intuitiva y posteriormente con técnicas de mayor complejidad, lo que se denomina mejoramiento genético. En muchos casos, la especie a mejorar no posee el gen que le confiera el carácter de interés, y el mismo es portado por otra especie. Es por ello que se realizan cruzamientos interespecíficos para incorporar al genoma de la especie que estamos mejorando, el gen perteneciente a otra especie que generalmente es silvestre y es considerada como donante. De este modo el número de genes transferidos entre especies ha ido aumentando con el tiempo. Sin embargo, estas técnicas de mejoramiento tradicional consumen mucho tiempo y por lo general quedan asimismo incorporados al genoma de la especie cultivada, otros genes de poco interés agronómico provenientes de la especie donante.

Actualmente, la biotecnología moderna está compuesta por una variedad de técnicas derivadas de la investigación en biología celular y genética molecular, las cuales pueden ser utilizadas en cualquier industria que utilice microorganismos o células vegetales y animales.

Una de estas técnicas permite la introducción de genes de una forma mas controlada, eficaz y rápida que los procedimientos tradicionales de cruzamientos: la transformación genética. En este caso, el gen introducido puede pertenecer a cualquier especie, no existiendo por lo tanto la limitación de compatibilidad sexual y posibilitando la introducción de genes de bacterias, animales o plantas. (www.isaaa.org)

Aplicaciones de la biotecnología a especies agrícolas

Después de dos décadas de investigaciones intensivas y costosas, el cultivo comercial de variedades transgénicas de plantas ha tenido lugar en los últimos años con variedades transgénicas de más de veinte especies vegetales. Las más importantes, desde un punto de vista comercial, son el algodón, el maíz, la soja y la colza. Los países en que se sembraron estos cultivos incluyen algunos de los más importantes productores agrícolas del mundo: Argentina, Australia, Canadá, China, Francia, México, Sudáfrica, España y los E.U.A. Las características más frecuentes de las nuevas variedades son la resistencia a insectos (algodón, maíz), resistencia a los herbicidas (soja) y maduración lenta del fruto (tomate). Las ventajas obtenidas con estos cultivos transgénicos iniciales o transgénicos de primera generación son: mejor control de insectos y malezas, mayor productividad, y un manejo más flexible de los cultivos. Los beneficiarios de estas mejoras son principalmente los agricultores y las empresas agrícolas, pero también se benefician los consumidores, con la producción de alimentos a menores costos y con el consecuente impacto sobre los precios de productos finales. Además, se obtienen beneficios más generales a favor del ambiente y la sociedad, que se reflejan en una agricultura más sostenible y con mayor seguridad alimentaria, gracias al uso reducido de pesticidas.

Otros caracteres, que se están probando fundamentalmente en economías emergentes, incluyen variedades resistentes a virus en numerosas especies como melones, papayas, zambo, tomate y pimientos; arroz, y tomates resistentes a los insectos; papas resistentes a diferentes enfermedades, y ajíes de maduración lenta. También se está trabajando para utilizar plantas, como el maíz y el plátano, para producir vacunas y plásticos biodegradables.

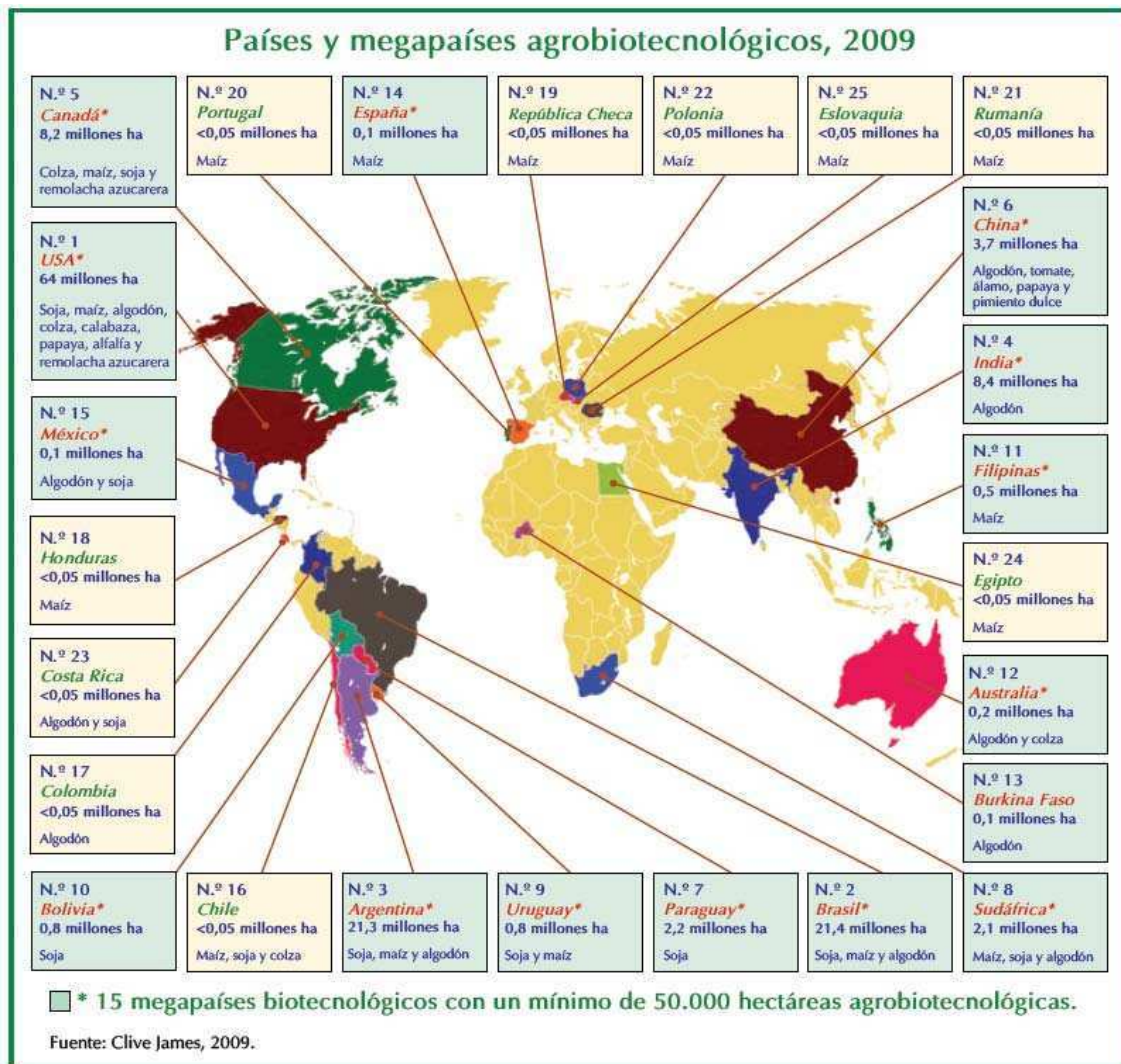
Los posteriores avances de la biotecnología tendrán, probablemente en un futuro muy cercano, cultivos con una amplia gama de características, entre las cuales serán de especial interés para los consumidores las relacionadas con una calidad nutritiva superior. Estos cultivos podrían ofrecer beneficios nutricionales a millones de personas que sufren de malnutrición y desórdenes deficitarios. En este contexto, se han identificado genes que pueden mejorar la composición de los aceites, las proteínas, los carbohidratos y los almidones de granos y tubérculos. Como caso testigo se debe mencionar al *Golden Rice* o arroz dorado, donde se ha incorporado al arroz un gen que permite la producción de beta caroteno y vitamina A. (Potrykus 2001). La utilización de

este arroz transgénico mejoraría la dieta de 180 millones de niños que sufren deficiencia de vitamina A, causante de dos millones de muertes anuales. De modo similar, la introducción de genes que tripliquen la cantidad de hierro del arroz, es una estrategia posible para suplir la deficiencia de hierro que afecta a más de dos mil millones de personas y ocasiona anemia en la mitad de ellas (Goto y col. 1999).

Situación actual de los cultivos biotecnológicos en el mundo.

La superficie agrobiotecnológica se ha multiplicado por 80 en solo 14 años, desde su adopción en 1996 hasta el año 2009. Se trata de un crecimiento sin precedentes, que pone de manifiesto que esta tecnología ha gozado de la aceptación más rápida en la historia de la agricultura. Este crecimiento refleja la confianza de millones de agricultores de todo el mundo, que han seguido incrementando su plantación de cultivos biotecnológicos año tras año desde 1996, debido a los múltiples e importantes beneficios que ofrecen (James 2009).

Los cuatro grandes cultivos transgénicos registraron cifras récord de hectáreas sembradas. Por primera vez, la soja transgénica ocupó más de tres cuartas partes de los 90 millones de hectáreas que se destinan a la producción de soja en todo el mundo, el algodón casi la mitad de los 33 millones de hectáreas dedicadas a su cultivo, el maíz transgénico más de una cuarta parte de los 158 millones de hectáreas globales existentes y la colza más de una quinta parte de los 31 millones de hectáreas destinadas a su cultivo mundial. De los 25 países agrobiotecnológicos, 16 son países en desarrollo y los otros nueve, países industrializados. Los ocho países líderes en la siembra de cultivos transgénicos, cultivaron más de un millón de hectáreas cada uno: EUA (64 millones de hectáreas), Brasil (21,4), Argentina (21,3), India (8,4), Canadá (8,2), China (3,7), Paraguay (2,2) y Sudáfrica (2,1). Los 2,7 millones de hectáreas restantes se reparten entre los 17 países restantes. La superficie agrobiotecnológica acumulada entre 1996 y 2009 asciende a casi 1.000 millones de hectáreas (949,9 millones exactamente). El cuadro muestra los 25 países con más de 50.000 hectáreas sembradas con cultivos transgénicos.



Situación de los cultivos transgénicos en Argentina

El informe de ISAAA (International Service for Acquisition of Agri-Biotech Applications, según sus siglas en inglés) señala que la Argentina continúa siendo uno de los principales países productores de cultivos genéticamente modificados (GM), con 21,3 millones de hectáreas en 2009, lo que representa el 16% del área total de transgénicos. En la campaña 2009/2010 se registró una excelente adopción de maíz GM (se estima que un 85% del maíz total) y de algodón GM (más del 95% del total), con un aumento en ambos casos de la superficie sembrada con eventos apilados (resistencia a insectos y tolerancia a herbicida). Por su parte, la soja tolerante a glifosato se mantuvo en casi el 100 por ciento del total, como en las campañas anteriores. Desde el punto de vista de las aprobaciones regulatorias, Argentina autorizó en 2009 la siembra comercial de dos nuevos eventos, uno en algodón y otro en maíz, completando así la lista de los

siguientes cultivares transgénicos en nuestro país: un evento de soja, diez de maíz y tres de algodón aprobados hasta el momento (James 2009).

Cultivos transgénicos de segunda generación

Los cultivos transgénicos actuales corresponden a lo que se denomina “la primera generación” que tiene por objetivo el aumento de la productividad de los cultivos, la reducción en el uso de agroquímicos, la conservación de la tierra arable, el agua y la energía, la reducción de la contaminación del ambiente y los beneficios para la salud humana derivados de estos aspectos. Se considera que “la segunda generación” de cultivos transgénicos tendrá más beneficios directos para los consumidores. Estos comprenden el mejoramiento de la calidad nutricional (proteínas, aceite, vitaminas y minerales), la eliminación de alérgenos, la fitorremediación (es decir la recuperación de ambientes contaminados mediante el uso de plantas) y la utilización de plantas como biorreactores para la expresión de proteínas recombinantes con fines tales como la producción de vacunas comestibles, anticuerpos y otras proteínas de uso terapéutico o industrial. Esta aplicación se conoce como «*molecular farming*» (producción de moléculas en la granja) y presenta numerosas ventajas para la producción en gran escala de estas proteínas en particular en lo que respecta a costos, practicidad y seguridad. Sin embargo, aún quedan algunos aspectos que limitan el potencial uso de estas plantas como biorreactores, como son la calidad y la homogeneidad del producto final. En este sentido, en los últimos años, ha habido un creciente interés en estudiar el control del nivel de expresión de los transgenes, así como su regulación espacial y temporal. En este marco, la identificación de promotores que definan un patrón de expresión espacio-temporal específico es fundamental para la generación de este tipo de plantas transgénicas de “segunda generación”.

Un ejemplo destacable de transgénicos de segunda generación, mencionado anteriormente, es el “arroz dorado” llamado así por la pigmentación amarilla que tienen sus granos debido a que acumula altos niveles de provitamina A en el endosperma, dirigido por el promotor de la gluteína de arroz y que se expresa únicamente en el endosperma (Potrykus 2001) de este cultivo. Este caso, es el más emblemático y fue uno de los primeros casos de transgénicos de segunda generación. Sin embargo, actualmente existen muchos casos en distintas fases de desarrollo, desde etapas de investigación, hasta aquellos en fase de regulación y comercialización. La siguiente

tabla muestra el avance logrado en diez categorías diferentes de productos transgénicos con calidades mejoradas (Graff y col. 2009).

Categoría	Publicaciones	Fases de desarrollo					Comercialización esperada			
		Inicial	Media	Avanzada	En marco regulatorio	Comercializadas	Total	Al 2010	2010-2015	Total
Proteínas y aminoácidos	33	47	12	7	1	0	100	8	6	14
Aceites y ácidos grasos	15	22	8	5	2	1	53	4	4	8
Carbohidratos y azúcares	32	65	16	10	0	0	123	2	1	3
Vitaminas, minerales y componentes funcionales	47	15	3	1	0	0	84	0	2	2
Alergenos o toxinas	18	6	0	2	0	1	9	3	0	3
Maduración y productos larga vida	19	41	10	6	5	2	83	4	3	7
Estética	15	21	5	2	1	1	43	0	3	3
Calidad de fibra	22	16	5	1	0	0	44	5	1	6
Biorremediación	2	8	0	0	0	0	10	0	0	0
“Calidad alimenticia” o “Composición de semilla”	0	2	2	3	0	0	7	2	1	3
TOTAL	203	243	61	37	9	5	558	28	21	49

Como se observa en la tabla, la mayoría de estos trabajos se enfocan en el mejoramiento en la calidad nutricional, ya sea en proteínas y aminoácidos, como en ácidos grasos y aceites. En muchos de estos casos, es muy probable que el producto final este dirigido hacia la semilla.

Semillas como sistema de expresión

La evolución de la semilla otorga una enorme adaptabilidad a las plantas debido a sus propiedades de dormición, almacenamiento de nutrientes y la capacidad de germinar en condiciones limitantes de nutrientes. Muchas de estas propiedades pueden ser

explotadas en aplicaciones biotecnológicas como el “*molecular farming*”, en especial cuando se quieren producir grandes cantidades de proteínas recombinantes (Boothe y col. 2010).

En las semillas, las moléculas de almacenamiento pueden depositarse en una variedad de tejidos, como en el embrión propiamente dicho, los cotiledones, el tegumento, el endosperma o la aleurona. Desde un punto de vista evolutivo, estos diferentes tejidos están adaptados para la competencia y supervivencia de las diferentes especies. Sin embargo, estas estrategias que usan las plantas pueden ser explotadas para estrategias de “*molecular farming*”, en donde los diferentes tejidos de la semilla pueden facilitar la acumulación de ciertos productos o incrementar la eficiencia de purificación.

Es tácito pensar que si las semillas pueden almacenar hasta un 10% de una determinada proteína o aceite individual respecto del contenido total de proteínas, también sería posible acumular esos altos niveles de una proteína recombinante. En arroz, el uso de un promotor endógeno de una proteína de reserva para regular la expresión de una lisozima humana, dió como resultado una acumulación del 13-14% del total de proteínas solubles (Huang 2004). Asimismo se ha logrado la acumulación de distintos anticuerpos en una variedad de semillas, con niveles entre 1-5% de proteína total (Fiedler y col. 1997; Van Droogenbroeck y col. 2007). Es interesante notar los niveles de expresión que se pueden llegar a obtener en *Arabidopsis*, especie utilizada como modelo para distinto tipo de estudios, donde en algunos casos se llega a niveles de acumulación de hasta un 40% de proteína total (De Jaeger y col. 2002).

Otra de las características ventajosas que presentan las semillas es su capacidad de almacenamiento estable, tal como ocurre con sus propias proteínas de reserva, lo que evita la necesidad de tener que dirigir la expresión a compartimentos subcelulares específicos. Así, fue posible acumular uridina en semillas secas de canola por tres años (Boothe y col. 1997). Este grado de estabilidad es una gran ventaja a la hora de producir proteínas recombinantes a una escala industrial.

El uso de semillas para la purificación de las proteínas recombinantes es ventajosa por varias razones. Primero, la carga bacteriana biológica es mucho menor en semillas que en tejidos vegetativos, por lo que con técnicas sencillas de esterilización se puede reducir la contaminación biológica presente en las semillas, mientras que en los tejidos vegetativos es casi imposible de lograr, sin dañar las células del mesófilo. Por otro lado, las semillas tienen menos de 10% de agua, mientras que las hojas tienen más del 90% en sus tejidos, lo que significa que para la misma cantidad de proteína producida, la

cantidad relativa de biomasa es mucho más grande en tejidos vegetativos. Por último, el contenido de proteínas en la mayoría de las hojas es menor al 5% en tejido seco, mientras que el porcentaje en semillas alcanza entre el 10% y el 40%.

Es por ello que desde un punto de vista de procesamiento a gran escala, las semillas tienen mayor capacidad de concentración inicial de producto y con menor contenido de proteasas que puedan degradar y afectar el proceso de purificación, si éste no es realizado rápidamente.

Para optimizar la producción de proteínas recombinantes en plantas, es esencial maximizar la expresión génica. Esto implica, altos niveles de transcripción en el momento adecuado y ARNm estables del gen correspondiente. En el caso de las semillas, hay un número de promotores con alta especificidad y fuerte actividad transcripcional, que corresponde al grupo de genes que codifican para las proteínas de reserva que tienen las semillas en general.

Por todas estas razones es altamente conveniente el uso de promotores específicos de semilla para maximizar la expresión de proteínas recombinantes para su producción industrial.

Promotores

Los promotores son regiones de ADN que controlan la transcripción de las regiones codificantes localizados en forma adyacentes a las mismas. Las secuencias de ADN dentro de los promotores pueden ser identificadas como sitios de unión a factores de activación en *trans*, o “factores de transcripción” los cuales pueden causar la activación o represión de la transcripción.

En la actualidad, se puede categorizar a los promotores de acuerdo al tipo de control en la expresión que tienen. En general se los puede dividir en:

- **Promotores constitutivos.** Estos promotores dirigen la expresión a todos los tejidos e independientemente de factores ambientales o de desarrollo. Debido a que su expresión normalmente no está condicionada a factores endógenos, los promotores constitutivos pueden ser activos entre especies o incluso entre reinos.
- **Promotores tejido-específico o desarrollo-específico.** Éstos dirigen la expresión de un gen a un tejido específico o en un cierto estado de desarrollo. En el caso de plantas, promotores que dirigen la expresión en tejidos fotosintéticos,

sistema vascular, tubérculos, raíces, semillas y otros órganos reproductivos pueden encontrarse en diversos sistemas heterólogos (especies poco relacionadas o incluso en otros reinos).

- **Promotores inducibles.** Su actividad está condicionada a efectos ambientales o a estímulos externos que pueden ser controlados artificialmente. Dentro de este grupo existen promotores modulados por la acción de factores abióticos (luz, niveles de oxígeno, temperatura, frío o heridas). Por otro lado también existen promotores que se activan por factores bióticos como los ataques de patógenos.

La elección y utilización de un promotor adecuado es determinante del éxito que se logre en la aplicación de técnicas de ingeniería genética para el mejoramiento vegetal. La selección del promotor dependerá, entre otros factores, del objetivo perseguido o buscado, tal como una expresión constitutiva, en un determinado momento del desarrollo o tejido específica. En la actualidad, se han aislado numerosos promotores de una gran variedad de organismos, tanto vegetales como bacterianos o virales.

El estudio de las secuencias regulatorias ha cobrado importancia en los últimos años y se puede realizar mediante predicciones realizadas *in silico* y/o empleando técnicas empíricas de biología molecular, con el uso de genes reporteros. Puede considerarse que tal vez uno de los grandes logros de la bioinformática es la identificación de promotores y sus elementos regulatorios (Lescot y col. 2002; Rombauts y col. 2002; Shahmuradov y col. 2005; Venter y Botha 2004). Los estudios empíricos pueden llevarse a cabo por medio de ensayos de expresión transitoria (Agius y col. 2005) o mediante la obtención de plantas transgénicas (Lu y col. 2007; Moskal y col. 2007; Yamada y Bohnert 2000).

Así, la identificación de los promotores y sus elementos regulatorios permite integrar la genómica comparativa, estructural y funcional (Lescot y col. 2002; Rombauts y col. 2002; Venter y Botha 2004).

Promotores de expresión en semilla

En la última década se han estudiados numerosos promotores que confieren la capacidad de expresión en las semillas, siendo los más utilizados los promotores de proteínas de reservas (SSPs) (Seed Storage Proteins, por sus siglas en inglés). Entre las monocotiledóneas, se puede citar el promotor de la D-hordeína de cebada (Horvath y col. 2000) o el de las gluteínas de arroz (Kridl y col. 1991), dónde se describen también

diferentes secuencias conservadas, cajas y motivos que actúan en *cis* y confieren la capacidad de expresión en endosperma (Washida y col. 1999). En el caso de las dicotiledóneas se han estudiado ampliamente los genes de la β -conglucina de soja (Chamberland y col. 1992; Lessard y col. 1993), la β -faseolina de la arveja (Bustos y col. 1989), la napina de *Phaseolus vulgaris* (Chandrasekharan y col. 2003) entre otras. Sin embargo, existe un número de genes que codifican para proteínas que no son de reserva pero que si se encuentran abundantemente en semilla. Estas incluyen a las oleosinas (Huang 1992), las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*, por sus siglas en inglés) (Fujiwara y col. 2002), las oleato desaturasas (Chung y col. 2008), y las sacrosas sintetasas (Rasmussen y Donaldson 2006) entre otras, aisladas y caracterizadas de diferentes especies. En girasol, existen muy pocos trabajos de caracterización de promotores que dirigen la expresión a semilla. Un ejemplo es la Helianthina (una globulina de reserva), que es la proteína mayoritaria de las semillas (Allen y col. 1985) cuyo promotor ha sido aislado y caracterizado (Jordano y col. 1989; Nunberg y col. 1994). Entre los genes de proteínas de girasol que no son de reserva y se expresan en semilla, sólo el promotor del gen LEA Ha ds10 G1 ha sido aislado y estudiado mediante ensayos de expresión transitoria en embriones de girasol (Prieto-Dapena y col. 1999). Como se mencionó anteriormente, uno de los grandes logros de la bioinformática, ha sido la identificación de los elementos regulatorios de los promotores. Muchos de estos elementos están conservados dentro de los promotores en cuanto a su especificidad en la expresión y varios han sido descritos empíricamente. En canola, un análisis del promotor *napA* reveló la presencia de complejos elementos regulatorios (*B-box*, y elementos *RY/G*), necesarios para la expresión en embrión y endosperma (Ellerstrom y col. 1996). Ensayos de mutaciones por sustitución en el promotor de faseolina de arveja, revelaron que los motivos *G-Box*, *CCAAAT box*, *E-box* (*CACCGT*) y elementos *RY*, median los niveles de expresión en embriones (Chandrasekharan y col. 2003). Muchos estudios, muestran que los motivos que confieren especificidad de semilla residen en regiones cercanas al promotor, generalmente dentro de las 500 pb del sitio de iniciación de la transcripción ((Chamberland y col. 1992; Chandrasekharan y col. 2003; Wu y col. 2000). Estudios realizados sobre la region promotora del gen de prolamina de cebada (*Hordeum vulgare* L.), trigo (wheat (*Triticum aestivum* L.) y maiz (*Zea mays* L.) evidenciaron una región conservada de solo 30 pb, la cual contenía el motivo *CGN4* y el motivo de prolamina (descritos como elementos específicos de endosperma). Adicionalmente, un elemento llamado *AACA*, fue encontrado y descrito como

específico de semilla en la regulación del arroz (*Oryza sativa* L.). Estos tres elementos, son encontrados frecuentemente en promotores de genes SSP de monocotiledoneas, los cuales son reconocidos por factores de transcripción de la familia de los bZIP, DOF, y MYB respectivamente (Vicente-Carbajosa y Carbonero 2005).

Desafortunadamente, las comparaciones entre promotores es dificultosa debido a que la evaluación de los mismos se hace con transgenes y plantas distintas (Stoger y col. 2005), y por lo tanto la interpretación de los resultados en forma cualitativa resulta compleja. A su vez, la mayoría de los estudios de promotores están basados en pocos eventos de transformación independientes, complicando aún más la comparación, ya que con los grandes tamaños de los genomas y dependiendo de los sitios de inserción de los transgenes, los niveles de expresión de promotores supuestamente fuertes, pueden mostrar una baja actividad transcripcional.

El Girasol

El girasol, *Helianthus annuus* L., comprende tres subespecies principales: *Helianthus annuus* ssp. *lenticularis*, girasol silvestre; *Helianthus annuus* ssp. *annuus*, girasol maleza y *Helianthus annuus* ssp. *macrocarpus*, girasol cultivado por sus frutos comestibles.

Su centro de origen es América del Norte, y su antecesor silvestre es una especie diploide ($2n = 2x = 34$) perteneciente a la subtribu *Helianthinae*, subfamilia *Asteroideae* y familia *Compositae* (Seiler 1997), siendo el centro de diversidad de dicha especie también América del Norte.

Es una especie alógama y autoincompatible, cuya domesticación ha permitido la autocompatibilidad y un aumento en el tamaño y en el vigor de la semilla. Esto hace que el girasol cultivado tenga varias características que facilitan el desarrollo de germoplasma autopolinizable, favoreciendo los programas de mejoramiento como el desarrollo de híbridos. El girasol cultivado puede ser cruzado sin dificultad, tiene una alta producción de semillas (aproximadamente 1000 semillas/planta) y un tiempo generacional corto de 70 a 100 días.

El girasol es sinónimo de aceite en primer lugar y de proteína en segundo lugar. Su aceite ha sido por años de tipo "linoleico", sin embargo por razones vinculadas al cuidado de la salud y a la demanda de características especiales para usos industriales, se impulsó el desarrollo del girasol medio oleico y alto oleico.

La Lechuga

La lechuga, *Lactuca sativa L.*, pertenece también a la familia de especies Compuestas, que es la más grande y diversificada dentro de las Angiospermas. Tiene la particularidad de ser una planta de gran importancia agroeconómica y al mismo tiempo es considerada una especie modelo de la familia *Compositae*, como se puede observar en el sitio Compositae Genome Project (<http://compgenomics.ucdavis.edu/>). Según la FAO (2007) la producción mundial de lechuga fue de 23.55 millones de toneladas (51% aportado por China, 22% por EEUU y 5% por España). En esta especie la aplicación de biotecnologías está muy desarrollada y ha sido bastante estudiada, desde aspectos de la genética clásica y molecular, como también a nivel de cultivo de tejido, donde se han regenerando brotes a partir de tejidos, órganos, células y protoplastos. La transformación genética por *Agrobacterium* actualmente se realiza de forma rutinaria existiendo numerosas publicaciones al respecto (ver revisión Davey et al., 2007)

Genes candidatos de girasol con expresión en semilla

En trabajos previos se han identificado una proteína de transferencia de lípidos LTP (*Lipid Transfer Protein*, por sus siglas en inglés) (Regente y de la Canal 2003), una oleato desaturasa (FAD2-1) (Martínez-Rivas y col. 2001) y una oleosina de girasol (Cummins y Murphy 1992) como proteínas específicas de semilla.

Las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) son proteínas de bajo peso molecular ampliamente estudiadas en plantas caracterizadas por la presencia de 8 cisteínas en posiciones altamente conservadas, las cuales forman 4 puentes disulfuro. Su función biológica sigue siendo incierta, pero se les han atribuido varios roles incluyendo formación de la cutina de las paredes celulares, su utilización como péptidos antimicrobiano, movilización de lípidos de reserva y elongación de la pared celular (Pagnussat y col. 2009). Los patrones de expresión reportados para las LTPs de diferentes plantas son complejos, y en gran medida controlados temporal y espacialmente (Kader 1996).

Por otro lado, las enzimas oleato desaturasas (FAD) tienen la capacidad de transformar el ácido oleico en linoleico. Estos son los ácidos predominantes en los aceites vegetales y sus proporciones relativas en semillas determinan las propiedades nutricionales y la estabilidad oxidativa de los aceites según el cultivo (Vos y Cunnane 2003). Los patrones de expresión de los genes FAD2 en ciertos cultivos tienen una alta relación con

el desarrollo de la semilla, aunque en algunos casos como *Arabidopsis*, su expresión es constitutiva (Okuley y col. 1994). En girasol, existen mutantes alto oleico donde está mutado el gen de la oleato desaturasa, permitiendo la acumulación de ácido oleico en sus semillas (Martínez-Rivas y col. 2001).

Por último, las oleosinas son pequeñas proteínas de entre 15 y 26 KDa, que cubren completamente la superficie de los cuerpos oleicos (*oil bodies*) que contienen los lípidos de reserva (Huang 1992). Cuando una semilla contiene un alto porcentaje de aceite y sus cuerpos oleicos son pequeños, la cantidad de oleosinas es alta, llegando incluso a un porcentaje considerable de las proteínas totales de la semilla (Tzen y col. 1993). En general, el patrón de expresión temporal de los genes de oleosina en semillas es muy similar al de las proteínas de reserva (SSPs) y está regulado por factores como el ABA que promueven la maduración y la embriogénesis (Huang 1992; Plant y col. 1994; Zou y col. 1995).

Estudios en girasol y lechuga en nuestro grupo

El grupo de Genómica de girasol del Instituto de Biotecnología (IB), CICVyA, INTA Castelar ha desarrollado diversas estrategias moleculares para el análisis genómico de girasol a partir del desarrollo de marcadores neutros (Paniego y col. 2002) y marcadores funcionales derivados de secuencias que se expresan o ESTs (Fernández y col. 2008; Fernández y col. 2003), el mapeo genético integrando información local y pública (Kiani y col. 2007) y el desarrollo de herramientas de citogenética molecular para integrar el mapa genético y físico del girasol cultivado (Talia y col. 2010).

A su vez, se desarrolló una plataforma de análisis de micromatriz de ADNc en base a las secuencias locales de ESTs depositadas en bases de datos como modelo exploratorio al desarrollo de una micromatriz densa de oligonucleótidos (Fernández y col. 2010). Los estudios de perfiles transcripcionales permitirán integrar la información de cambios de expresión a nivel de ARN con cambios metabólicos analizados por GC-MS en distintos sistemas biológicos abordados por nuestro grupo de trabajo, tanto para el estudio de respuestas a estreses bióticos (Peluffo y col. 2010) como abióticos (Fernández y col. 2011). La integración de estos análisis funcionales en forma simultánea con estudios de mapeo genético y de asociación (Fusari y col. 2010; Fusari y col. 2008) permiten la identificación de genes candidatos robustos y el desarrollo de

marcadores funcionales de caracteres de importancia agronómica para su aplicación en el mejoramiento molecular del cultivo.

Por otra parte, el grupo de transformación genética de especies Compuestas ha desarrollado un protocolo eficiente y reproducible de transformación estable y transitoria en girasol, así como en lechuga, especie considerada modelo dentro del grupo de las asteráceas (Radonic 2010).

El presente trabajo surge dentro de este marco como una estrategia no sólo para el desarrollo de nuevas técnicas para su aplicación en estudios genómicos y funcionales del cultivo de girasol sino también como respuesta a la necesidad de contar con promotores tejido específicos, con altos niveles de expresión en semilla y de libre acceso que puedan ser utilizados en desarrollos biotecnológicos para la mejora de caracteres de calidad en distintas especies de interés agronómico para el país.

Objetivos

Hipótesis

La hipótesis de trabajo que sustenta este plan es que es posible identificar, aislar y caracterizar funcionalmente regiones promotoras de girasol que dirijan la expresión de proteínas específicamente hacia la semilla, con niveles de expresión significativos y con diferentes patrones temporales de expresión para la generación de plantas transgénicas con aplicaciones diversas en la producción de compuestos farmacéuticos (*Molecular Farming*) y alimentos nutraceuticos.

Objetivo general

Aislamiento de la región promotora de genes candidatos de girasol de expresión en semilla y su caracterización funcional a través de la transgénesis en especies modelo y de importancia agrícola, utilizando construcciones que incluyan distintas regiones del promotor en estudio fusionadas a genes reporteros (GUS/GFP) en vectores de expresión para aplicaciones biotecnológicas.

Objetivos específicos

- Aislamiento y caracterización de genes candidatos de expresión específica en semillas de girasol.
- Aislamiento y caracterización funcional de promotores de los genes candidatos específicos de semilla.
- Caracterización espacial y temporal de los promotores en los sistemas modelos *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa*.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Girasol

Se sembraron semillas de girasol (*Helianthus annuus L.*) de la línea HA89 del programa de mejoramiento de la unidad experimental de INTA Balcarce, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Los explantos fueron cultivados bajo condiciones estándar en invernáculo (16 horas luz, 8 horas oscuridad; 20-24 °C), en macetas de un litro. Las plantas fueron regadas diariamente y fertilizadas semanalmente con Hakaphos (N-P-K) a una concentración final de 100 ppm (0.55% W/V) durante dos semanas. Luego fueron transplantadas a macetas de cinco litros hasta su cosecha.

Arabidopsis

Para los ensayos de transformación estable por el método de inmersión floral (Clough y Bent 1998) se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) cultivadas en cámaras de cría (Convicon CMP5000, Winnipeg, Manitoba, Canadá) a 22°C con un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad y una intensidad lumínica $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas transformadas fueron transferidas a invernáculo en condiciones normales de luz y temperatura tanto para la producción de semilla como para los ensayos de expresión de promotores (16 horas luz, 8 horas oscuridad; 20-24 °C).

Lechuga

Se utilizaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) de la variedad *Grand Rapids* provistas por el banco de germoplasma de la EEA-INTA La Consulta, Mendoza para los ensayos de transformación. Los explantos transgénicos fueron mantenidos en cámaras de cría (Sanyo, Electric Co, Japón) hasta su pasaje a invernáculo para la obtención de semillas.

Muestreo del material vegetal

Girasol

Se colectaron muestras de distintos tejidos de plantas de girasol correspondientes a raíces, hojas de plántulas (V2: corresponde a 2 hojas verdaderas de más de 4 cm.), hojas de planta madura (H), tallo, distintos estadios de desarrollo del capítulo de girasol desde botón floral (R1) hasta floración (R6) (Scheneiter y Miller 1981) y semillas en desarrollo a diferentes días post floración (DPF). Las denominaciones de los diferentes estadios en girasol siguen la nomenclatura de Scheneiter y Miller (1981). Todas las muestras fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas en freezer a -80°C hasta su utilización.

Arabidopsis

Las muestras obtenidas de las plantas transgénicas de Arabidopsis para los ensayos histoquímicos y fluorométricos correspondían a plántulas de estadios (1.0): cotiledones completamente abiertos, (1.02): dos hojas de roseta de 1mm de largo, (1.04): 4 hojas de roseta de 1mm de largo, y de plantas adultas donde el pedúnculo floral es visible (5.10) (Boyes y col. 2001). Para las muestras de semillas, se colectaron flores independientes al día 0 de floración, y vainas cada dos días después de la floración (DPF: 3, 7, 9, 11, 13, 15 y 18) hasta el desarrollo completo de las semillas.

Lechuga

Se cosecharon las semillas de las plantas transgénicas T1 para su evaluación en tinción histoquímica y fluorométrica. También se tomaron hojas para la detección del transgén por la técnica de PCR.

Los reactivos químicos utilizados fueron de la marca SIGMA (Argentina) en todos los casos excepto para aquellos en los que se indica explícitamente otro fabricante

Oligonucleótidos iniciadores utilizados

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados fueron diseñados con los programas Oligo 4.0 (Primer Analysis Software, National BioSciences) y con el Vector NTI (Invitrogen, Argentina), y fueron sintetizados por un servicio externo (Alpha DNA, Canadá).

Oligonucleótido	Secuencia	Descripción
LTP5 F.1	5' CATGGTGCACCCAAGTGTAG 3'	sonda Northern del gen HaAP10
LTP5 R.1	5' TGCTGGTGGAGATACCACAC 3'	sonda Northern del gen HaAP10
FAD2 F.2	5' GTGCAGGAGAATACACGTCTGT 3'	Sonda Northern del gen HaFAD2-1
FAD2 R.2	5' CAGTAAGAGGCCCATGCGAT 3'	Sonda Northern del gen HaFAD2-1
oleosin F.1	5' GACCGTCATTTACCACCACCCAACC 3'	Sonda Northern del gen HaOLE
oleosin R.1	5' AACACCAACCTGCCCCTGATCACCC 3'	Sonda Northern del gen HaOLE
LTPI F.1	5' GTTGTGAAGATGGCCTTGGT 3'	sonda Northern del gen HansLTPI
LTPI R.1	5' TGTTCCATGCACCTACAAGC 3'	sonda Northern del gen HansLTPI
EF502R.2	5' GGCCGAGGTACACGATAACT 3'	5' RACE para ADNc del gen HansLTPI
EF502R.6	5' TGATCCATCGATCTCCGTCT 3'	5' RACE (1era PCR) para el gen HansLTPI
EF502R.5	5' GGCTGATCTTGTAGGGGATG 3'	5' RACE (2da PCR) para el gen HansLTPI
AAP	5'GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGII G 3' I=INOSINA	5' RACE (Invitrogen, Argentina)
AUAP	5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'	5' RACE (Invitrogen, Argentina)
LTP5gw1	5' TGATCTAAGGTAGGGTAGGCACGGTGT 3'	Amplificación del promotor de HaAP10 mediante Genome Walker (1era PCR)
LTP5gw3	5' TAAGGTAGGGTAGGCACGGTGTGAGAT 3'	Amplificación del promotor de HaAP10 mediante Genome Walker (2da PCR)
FAD2gw1	5' ATCACATGCAAGACAGATAAACGCACA 3'	Amplificación del promotor de HaFAD2-1 mediante Genome Walker (1era PCR)
FAD2gw2	5' GACAGAGGCTTAGGGTTTCACTTCGT 3'	Amplificación del promotor de HaFAD2-1 mediante Genome Walker (2da PCR)

Oligonucléotido	Secuencia	Descripción
FAD2gw3	5' GTAGAAACGGTGAGTCTCCGCTAGTGA 3'	Amplificación del promotor de HaFAD2-1 mediante Genome Walker (1era PCR)
OLEgw1	5' GAGAGCGGCTAAGCCGAGTAAGATTCC 3'	5' RACE para ADNc del gen HaOLE
OLEgw2	5' AAGTAGGGCGATGATGGCGAGTGTCC 3'	Amplificación del promotor de HaOLE mediante Genome Walker (1era PCR) / 5' RACE (1era PCR) para el gen HaOLE
OLEgw3	5' CTGGTCGTAGCGGGACCTGTCTCTTG 3'	Amplificación del promotor de HaOLE mediante Genome Walker (2da PCR) / 5' RACE (2da PCR) para el gen HaOLE
OLEgw4	5' AACTGATTTGAAAATTGAGCGTGCTTG 3'	Ampliación del promotor de HaOLE mediante Genome Walker (1era PCR)
OLEgw5	5' ATGAACAACCTTTTTGTGTAAATTTTCG 3'	Ampliación del promotor de HaOLE mediante Genome Walker (2da PCR)
promoAP10 F4	5' AAAATACATAAGGACTCAATTTG 3'	Clonado de promotor HaAP10 en vectores de expresion
promoAP10 R3	5' GTTTGGTTATTATTATTTGT 3'	Clonado de promotor HaAP10 en vectores de expresión
promoFAD2-1 F8	5' ATAGGGGCATGAAAAGGGGGAGA 3'	Clonado de promotor HaFAD2-1 en vectores de expresión
promoFAD2-1 R3	5' AGACAGACGACGATGTGCTTCCG 3'	Clonado de promotor HaFAD2-1 en vectores de expresión
promoOLE F3	5' AAGCCGAGCCTGAACTTAAATATTTTCAGC 3'	Clonado de promotor HaOLE en vectores de expresión
promoOLE R1	5' GTGTTGGATCGAGGGAAATGG 3'	Clonado de promotor HaOLE en vectores de expresión
GUS1205	5' GATAGCGTGACAAAAACC 3'	Detección de plantas transgénicas amplificando un fragmento del gen <i>uidA</i>
GUSlow	5'GGGATCCAGGCCTTTGTTTGCCTCCCTGCTG 3'	Detección de plantas transgénicas amplificando un fragmento del gen <i>uidA</i>

Oligonucléotido	Secuencia	Descripción
Actin2-Up	5' AACATTGTGCTCAGTGGTGG 3'	Detección del gen de Actina2 de Arabidopsis como control interno
Actin2-Low	5' TCATCATACTCGGCCTTGG 3'	Detección del gen de Actina2 de Arabidopsis como control interno

Vectores utilizados

Vectores	Características relevantes	Resistencia (bacterias)	Origen
PGemT-Easy	Vector linealizado con una base 3'-T protruyente para el clonado directo de productos de PCR con alta eficiencia dada que la actividad transferasa terminal de la enzima <i>Taq</i> polimerasa deja una A en el extremo 5'. Una inserción interrumpe el marco de lectura de la enzima reportera codificada por el gen <i>lacZ</i> . El compuesto IPTG es un inductor de dicha enzima en tanto que el compuesto X-Gal es sustrato de la misma y da un producto coloreado.	Ampicilina	Promega (EUA)
pCRIITOP0	Vector linealizado con una base 3'-T protruyente para el clonado directo de productos de PCR con alta eficiencia dada que la actividad transferasa terminal de la enzima <i>Taq</i> polimerasa deja una A en el extremo 5'. Una inserción interrumpe el marco de lectura de la enzima reportera codificada por el gen <i>lacZ</i> . El compuesto IPTG es un inductor de dicha enzima en tanto que el compuesto X-Gal es sustrato de la misma y da un producto coloreado.	Ampicilina	TACloning, Invitrogen (EUA).
pCR8/GW/TOPO	Vector linealizado con una base 3'-T protruyente para el clonado directo de productos de PCR por la actividad transferasa terminal de la enzima <i>Taq</i> polimerasa deja una A en el extremo 5'. Posee los sitios de reconocimiento de la enzima "Gateway LR Clonase II"	Espectinomicina	TACloning, Invitrogen (EUA).
pAKK1431	Posee un sitio de clonado múltiple, el gen que codifica para la beta-glucuronidasa, un intrón que aumenta la transcripción y terminador t-NOS.	Ampicilina	

Vectores	Características relevantes	Resistencia (bacterias)	Origen
pKGWFS7,0	Vector binario Gateway para la recombinación de promotores río arriba del gen reportero GUS.	Espectinomicina	(Karimi y col. 2002)
<i>pMos Blue</i>	Vector utilizado para generarlas bibliotecas de BACs	Ampicilina	GE Healthcare

Cepas bacterianas

Escherichia coli

Se utilizó la cepa DH5 α para las transformaciones de todos los vectores excepto para los vectores de destino de la tecnología Gateway (Invitrogen, Argentina) para los cuales se utilizó la cepa DB3.01. Todos los cultivos fueron realizados en medio LB (medio de Luria-Delbrück, DIFCO, MI, U.S.A). La temperatura de crecimiento fue de 37°C y en los casos de cultivo líquido la agitación fue de alrededor de 100 rpm y se realizaron en tubos o erlenmeyers conteniendo un volumen de cultivo no mayor al 10% de su capacidad total. En el caso de que las cepas bacterianas estuvieran transformadas con un vector plasmídico, se agregó el antibiótico de selección adecuado al medio de cultivo.

Agrobacterium tumefaciens

Se utilizaron las cepas GV3101 que porta resistencia a rifampicina (100 mg/l) y gentamicina (40 mg/l) para las transformaciones de *Arabidopsis* y la LB4404 con las mismas resistencias para las transformaciones de lechuga. Las bacterias se cultivaron en medio LB o MMA según cada caso, a una temperatura de 28°C y con agitación.

Transformación de bacterias *E. coli* competentes.

En un tubo de polipropileno de 1,5 ml estéril se mezclaron 50 μ l de células competentes previamente descongeladas en hielo, con 4 μ l de mezcla de ligación. Se incubó durante 30 min. en hielo. Luego se transfirió durante 90 segundos a un baño termostático a 42°C y se volvió al hielo durante 2-5 min. Las bacterias se recuperaron en 1 ml de LB líquido incubando durante 1 hora a 37° C con agitación leve. Se centrifugaron 5 min. a 3500 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el medio

remanente. Las bacterias se esparcieron en placas de Petri conteniendo LB agar con ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37° C.

Electroporación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Bacterias de la cepa a GV3101 y LB4101 de *A. tumefaciens* fueron electroporadas con los distintos vectores siguiendo el protocolo de (Wen-Jun y Forde 1989). Una alícuota de 40µl de bacterias competentes se transfirió a una cubeta de electroporación (Bio-Rad, EUA) de 0,2 mm previamente enfriada. Se adicionó luego 1µl del ADN correspondiente (10-50 ng) y se aplicó inmediatamente un pulso de corriente usando un Gene Pulser® con unidad controladora de pulso (Bio-Rad, EUA). La fuerza de campo aplicada fue de 12,5 kV/cm, la capacitancia de 25 µF y la resistencia de 400W. Las constantes de tiempo oscilaron entre 8 y 12 mseg. Las células fueron transferidas inmediatamente a 1 ml de medio LB y agitadas a 28° C durante 3 hs. Luego se plaquearon en medio LB agar conteniendo rifampicina (100 mg/l), gentamicina (40 mg/l) y el antibiótico correspondiente al plásmido transformado y se incubaron durante 48-72 hs a 28° C.

Minipreparaciones de ADN plasmídico.

Las minipreparaciones de ADN plasmídico se realizaron con el método de lisis alcalina (Sambrook y col. 1989). Para el caso de las minipreparaciones a partir de *Agrobacterium*, se adicionaron 10 µl de lisozima luego de la primera solución.

Para la secuenciación de los clones recombinantes seleccionados se realizaron minipreparaciones comerciales utilizando el paquete de reactivos (*kit*) Qiaprep spin minikit (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Geles de agarosa.

Las electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa nativos (para ADN) y desnaturalizantes (para ARN) se realizaron según se describe en (Sambrook y col. 1989).

Purificación de ADN de agarosa.

Los fragmentos de digestión de ADN plasmídico, PCR, RT-PCR, los vectores recombinantes utilizados para la realización de construcciones o el clonado en pGEMtEasy y PCRII-TOPO fueron purificados con *kits* Qiaquick y Qiaex II (Qiagen, Alemania) según las recomendaciones del fabricante.

Extracción de ADN genómico.

Girasol

Se colectaron hojas de plantas jóvenes (tres semanas de edad), se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Para la extracción de ADN se utilizó el método Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se probaron los dos buffers de extracción que provee el kit PL1 (CTAB) y PL2 (SDS), obteniéndose los mismos resultados. Se analizó la integridad del ADN extraído mediante electroforesis de ácidos nucleicos en geles nativos al 1% de agarosa, de acuerdo a lo descrito en (Sambrook y col. 1989).

Arabidopsis

Se tomaron 1 o 2 hojas de planta adulta y se colocaron en un tubo de 1.5 ml, manteniéndolo en hielo. Se agregaron 700 μl de buffer de extracción (Tris-HCl, pH 8 50 mM, EDTA, pH8 10 mM, NaCl100 mM, 10 mM, SDS 1%) y se calentaron la muestras 10 minutos a 65°C . Luego se agregaron 200 μl de acetato de potasio (AcK) 5 M y se dejaron los tubos 20 minutos en hielo. Se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C . Se transfirieron los sobrenadantes a tubos limpios. Se precipitó el ADN con unos 600 μl de isopropanol y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron 10-15 minutos a máxima velocidad y se descartaron los sobrenadantes. Se lavaron los precipitados con etanol 70 % (unos 400 μl), se centrifugaron 2 minutos a 10000 rpm. Se repitió el lavado. Se centrifugaron 2 minutos a 10000 rpm, se eliminaron los sobrenadantes, se secaron los precipitados a temperatura ambiente y se resuspendieron en 20-50 μl de agua destilada o de buffer TE.

Lechuga

Para la extracción de ADN genómico de las plantas de lechuga se utilizó el mismo sistema Nucleon™ Phyt PURE™ (GE, Healthcare Life Sciences, Argentina) utilizado para girasol.

Los ADNs extraídos de las tres especies se cuantificaron por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, EUA).

Extracción de ARN total de girasol.

El ARN total de las muestras fotosintéticas (plántula, hoja madura y tallo), se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen, Argentina). Se molieron 2,5 gr de tejido con nitrógeno líquido en un mortero hasta convertirlo en un polvo homogéneo. En tubos de 50ml se fue agregado 25 ml de Trizol (Invitrogen, Argentina) en una proporción de 1 ml cada 100 mg de tejido. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min. a 4° C. Se traspasaron los sobrenadantes a otro tubo, se agregaron 2 ml de cloroformo (0,2 ml/ml Trizol), se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 2-3 min. Luego se centrifugaron a 12000 rpm durante 15-20 min. a 4° C. A la fase superior (acuosa) conteniendo el ARN de cada muestra se le agregaron 5 ml de isopropanol (0,5 ml/ml Trizol) para precipitar el ARN. Los tubos se incubaron por 15 min. a temperatura ambiente y centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min. a 4° C. Se removieron los sobrenadantes y se lavaron los precipitados con etanol 70%. Luego de centrifugar durante 5 min. a 4° C se dejaron secar los precipitados al aire y finalmente se resuspendieron en agua estéril, libre de RNAsas. Los ARN se guardaron a -80° C.

Para las muestras de los estadios reproductivos, raíz y semillas se utilizó el método de extracción de ARN desarrollado por (Salzman y col. 1999). Se molieron 3gr de tejido en mortero con nitrógeno hasta convertir las muestras en un polvo homogéneo e inmediatamente se las colocó en tubos de 50 ml a los cuales se les agregaron 30 ml del buffer de extracción. Se los agitó vigorosamente durante 2 minutos para homogeneizar las muestra, se les agregó 15 ml de cloroformo: isoamílico y se los agitó utilizando el vortex. Luego se centrifugaron a 16.000 G durante 15 minutos a 4°C para separar las fases orgánicas y acuosas. Las fases superiores (acuosas) fueron transferidas a tubos limpios y se les agregó cloroformo:isoamílico en una proporción 1:1. Este

procedimiento se repitió 2 o 3 veces hasta que la interfase este clara y límpida. Se recuperaron las fases acuosas y se las precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volumen de acetato de sodio 3,5 M y se las dejó -20°C por 16 hs.

Luego se centrifugaron por 15 minutos a 4°C. Los pellets se resuspendieron en 10 ml de agua DEPC y se les agregó el mismo volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), agitando vigorosamente durante 15 minutos. Se centrifugaron a 13.000 G por 15 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron las fases superiores (acuosas) a tubos limpios y se agregó 1X de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Este proceso se repitió 2 o 3 veces hasta obtener una interfase clara y límpida. Se recuperaron las fases acuosas y se precipitó de la misma manera descripta anteriormente.

Al día siguiente se centrifugaron por 15 minutos a 4°C y los pellets se resuspendieron en un 1ml de agua DEPC.

La cuantificación del ARN se realizó por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, EUA). La calidad del ARN extraído se verificó en geles de agarosa al 1%, según el protocolo descrito en (Sambrook y col. 1989).

RT-PCR.

La síntesis se llevó a cabo usando 1µg de ARN de los tejidos seleccionados usando la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen, Argentina) siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante.

En primer lugar se trataron los ARN con 1µl de ADNasa y 1µl de Buffer de ADNasa 10X llevándolos a un volumen final de 10µl con agua DEPC libre de ARNasas. Se incubaron 15 minutos y se inactivaron con un 1µl de EDTA (25 mM) durante 10 minutos a 65° C. A los 10µl de ARN se le agregaron 1µl de oligo(dT) y 1µl de una mezcla con dNTPs. Se calentó 5 minutos a 65°C y se incubó en hielo por 1 minuto. Luego se agregaron, 4µl de Buffer 5X [Tris-HCl (200 mM, pH 8,4), KCl (500 mM), MgCl₂ (25 mM), BSA 1(ug/ul)], 1µl de DTT (0,1 M), 1µl de RNAase OUT (inhibidor de RNAsas) y 1µl de transcriptasa reversa SuperScript III. Se incubó 1 hora a 50°C, luego se inactivó durante 15 minutos a 70°C. Se agregó 1µl de ARNasa H y se incubó a 37°C por 20 minutos para degradar el ARN remanente. El ADNc se conservó a -20°C.

5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

Se utilizó la técnica de 5' RACE para obtener el ADNc completo del gen HansLTP, de acuerdo al protocolo descrito en el kit de 5' RACE (Invitrogen, Argentina). Para sintetizar el ADNc se utilizó 1 µg de ARN total de girasol genotipo Ha89 del estadio R3, el iniciador específico EF502R.2 correspondiente al gen HansLTP y dNTPs. El ARN se desnaturalizó 10 minutos a 70° C y luego se incubó con los otros componentes de la mezcla de reacción durante 50 minutos a 50° C y durante 15 minutos a 70° C para inactivar la enzima. El ARN remanente se degradó a 37° C mediante la enzima RNasa H. El ADNc sintetizado se purificó según las especificaciones del *kit* de RACE. Posteriormente, se utilizó una alícuota del ADNc para hacer el agregado de dC en el extremo 5' con la enzima TdT (14.9 U) (Invitrogen, Argentina). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37° C, luego de lo cual se inactivó la enzima durante 10 min. a 65° C. Se utilizaron 5 µl para realizar la PCR, con el iniciador específico EF502R.6 y el iniciador AAP (Abridge Anchor Primer) (Invitrogen, Argentina). Esta primera amplificación se utilizó como templado para una segunda usando el oligonucleótido anidado EF502R.5 y el iniciador AUAP (Abridged Universal Amplification Primer) (Invitrogen, Argentina). El programa de ciclado fue el siguiente: 2 min. a 94° C, 35 ciclos de 40 seg a 94° C, 40 seg a 57° C (luego a 60° C en la segunda amplificación), 1 min y medio a 72° C y una extensión final de 10 min. a 72° C. Los productos obtenidos se corrieron en geles de agarosa, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Posteriormente se purificaron de agarosa y se secuenciaron en forma directa o fueron clonados en el vector pGEMT-Easy.

Esta técnica también fue utilizada para obtener el sitio de inicio de la transcripción del gen HaOLE. Los oligonucleótidos utilizados fueron el OLEgw1 para la síntesis del ADNc, y los iniciadores específicos OLEgw2 y OLEgw3, para la primer y segunda ronda de PCR respectivamente.

Northern blot.

Se utilizaron 10 µg de ARN extraído de cada muestra de girasol mencionada anteriormente para realizar experimentos de northern blot. Se le adicionó un volumen de buffer de corrida (MOPS 1,2X, Formamida deionizada 60,6%, Formaldehído (37%)

8,5%, Bromophenol Blue y Xylencianol 0,011%) al ARN, y se incubó por 5 min. a 65° C. Luego las muestras se corrieron en un gel de agarosa 1,5% con 1X de MOPS (Sigma, Argentina) por 5-6 horas a 60-65 V. Se visualizó brevemente a la luz UV para evaluar la integridad del ARN y se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N+ (GE, Argentina) por capilaridad en solución 6xSSC durante la noche. Posteriormente fue fijado con UV y horneado por 2 h a 80° C y se prehibridaron durante una noche con ULTRAhyb Hybridization Buffer (AMBION, EUA) a 42° C. Las hibridaciones se realizaron con sondas radiactivas correspondientes fragmentos de los ADNc de los 3 genes evaluados. Una sonda de 254 pb correspondiente al gen HaAP10, una de 250 pb del gen HaFAD2-1 y una de 457 correspondiente al gen HaOLE fueron marcadas por la técnica de iniciación al azar (*Random Priming*) con el *kit* Prime-a-Gene Labelling System (Promega, EUA) en presencia de [32P]dCTP (NEN, Perkin Elmer, MA USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las hibridaciones se realizaron a 42° C durante toda la noche con agitación suave. Las membranas se lavaron dos veces por 10 min. a 42° C con 2X SSC/ 0,1% SDS y luego con 0,1X SSC/ 0,1% SDS a 65°C por 30 minutos. Estos lavados se efectuaron con mínimas variaciones en cada uno de los northern realizados, de acuerdo a la necesidad de remoción de sonda inespecífica en cada caso. Las membranas se expusieron a pantallas para captación de radiactividad por distintos períodos de tiempo (4 h y una noche) y luego se escanearon con un detector de imágenes Typhoon Trio Scanner (GE, Argentina).

Aislamiento de regiones promotoras de los genes candidatos.

Genoteca de girasol en BACs

La genoteca BAC usada en este estudio fue construida por la Universidad de Clemson a partir del cultivar HA383 de *H. annuus*. Contiene 202.752 clones ordenados en 528 placas distribuidos en 11 filtros, y representa 8,3 veces el tamaño del genoma.

Los clones están distribuidos por duplicado en la genoteca, con un orden determinado como se observa en la Figura 6 en la sección de Resultados. Las sondas utilizadas fueron las mismas utilizadas en los ensayos de Northern blot.

Caminado cromosómico

Se utilizó el kit comercial Genome Walker™ Universal Kit (Clontech, CA, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Partiendo de ADN genómico de las hojas jóvenes de plantas de girasol descritas anteriormente, se construyeron librerías genómicas con distintas enzimas de restricción ligando adaptadores provistos por el kit. Para los distintos promotores se utilizaron oligonucleótidos específicos para los mismos junto a los provistos por el fabricante, complementarios a la secuencia de los adaptadores. En la sección de Oligonucleótidos iniciadores” se detallan los utilizados en cada caso. Con ellos se realizó una primera ronda de PCR con los iniciadores AP1 y un oligonucleotido específico para cada gen. Los productos de esta primera ronda de amplificación fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa, detectándose un patrón característico de “chorreado” en todas las librerías. Una dilución de los productos obtenidos fue utilizada para llevar a cabo la segunda ronda de PCR anidada con AP2 y un segundo oligonucleotido específico para cada gen. A todas las rondas de PCR se le realizaron sus respectivos controles. Los fragmentos amplificados fueron clonados en pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Argentina) y/o PGEMt-Easy (Promega, Biodynamics, Argentina) según las especificaciones del fabricante y luego secuenciados.

Secuenciación y análisis de los fragmentos clonados.

La secuenciación de todos los fragmentos y clones analizados se realizó a través de un secuenciador automático Genetic Analyzer ABI3130XL (Applied Biosystems, EUA) de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA (<http://www.inta.gov.ar/biotec/>). Se emplearon los oligonucleótidos presentes en los vectores de clonado, T7 y SP6 para PGEMt-Easy y M13F y M13R para los fragmentos clonados en pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Argentina) y oligonucleótidos específicos para cada fragmento aislado. Las secuencias se compararon y analizaron utilizando programas de alineamiento locales como el Blast (Altschul y col. 1990) y otros programas de análisis de secuencias como el Bioedit o el Vector NTI, de libre acceso.

Estudio de las secuencias promotoras.

Las secuencias obtenidas mediante la técnica de Genome Walker fueron analizadas empleando el programa McPromoter para la determinación del posible +1 del gen (<http://tools.genome.duke.edu/generegulation/McPromoter/>). Para el análisis de los motivos y las secuencias reguladoras del promotor propiamente dicho se emplearon los programas SignalScan (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) de la base PLACE, Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) y MatInspector (http://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html).

Clonado de promotores para su análisis funcional.

Todas las secuencias identificadas como posibles promotores fueron clonadas en vectores de expresión. Por un lado se clonaron en el vector AKK para determinar funcionalidad de los posibles promotores por bombardeo de hojas de cebolla que se describirá a continuación.

Por otro lado, las secuencias identificadas fueron clonadas en el vector pCR8/GW/TOPO TA (Invitrogen, EUA), que permite el clonado de productos de PCR, siguiendo las indicaciones del fabricante. Este vector posee resistencia a espectinomicina para la selección en bacterias. Dado que el vector pCR8/GW/TOPO TA (Invitrogen, EUA) utilizado no brinda un clonado direccional, fue necesario realizar PCRs con oligonucleótidos específicos para cada promotor y un oligonucleótido del plásmido (SP7/T3 o M13F/M13R) para determinar la orientación en la cual fue clonado el fragmento. Esta fue la forma de verificar cuál de las colonias bacterianas obtenidas poseía el inserto en la orientación necesaria para realizar la posterior recombinación.

La obtención de un vector binario con las secuencias deseadas fue necesaria para la transformación de *A. tumefaciens* y posterior transformación de tejidos vegetales. Para esto se utilizó el vector *Gateway* pKGWFS7,0 (Karimi y col. 2002), permitiendo mover secuencias de ADN en múltiples vectores para el análisis funcional y la expresión de proteínas (Hartley y col. 2000; Landy 1989). La transferencia basada en la recombinación LR de los promotores ocurre en el vector pKGWFS7,0, río arriba del gen reportero de la β -glucuronidasa.

El vector pKGWFS7,0 posee el gen *ccdB* (Bernard y Couturier 1992), que permite la selección negativa del mismo en *E. coli* DH5 α luego de la recombinación y transformación. Cuando ocurre la recombinación entre el vector pCR8/GW/TOPO TA

(Invitrogen, EUA) y el vector pKGWFS7,0, el gen es reemplazado por el fragmento de interés.

Debido a que tanto el vector pCR8/GW/TOPO TA (Invitrogen, EUA) como el vector pKGWFS7,0 poseen la resistencia al antibiótico espectinomicina, previo a la realización de la recombinación LR, fue necesario realizar la linealización del vector pCR8/GW/TOPO TA con una enzima de restricción. De este modo las colonias obtenidas serían producto de la transformación con el vector resultante de la recombinación LR.

Transformación transitoria por bombardeo (biolística).

Se colocaron hojas de cebolla en placas de Petri conteniendo medio MS (MS comercial con el agregado de 40 g/l de sorbitol) y se procedió al bombardeo de las mismas con micropartículas siguiendo el procedimiento descrito por (Cabrera-Ponce y col. 1995). El ADN plasmídico, purificado mediante columnas de Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Alemania), se precipitó sobre microproyectiles de tungsteno M10 según describe (Klein y col. 1988). Se depositaron alícuotas de 10 μ l (1,66 μ g ADN asociado con 125 μ g de tungsteno) en cada macrocarrier (disco de kapton), se dejaron secar al aire para remover el etanol y se utilizaron para bombardear. Se utilizó una versión modificada del cañón génico que trabaja según presión de helio, originalmente desarrollado por (Sanford 1990). La distancia entre la membrana de ruptura y el disco fue de 1,2 cm. El tejido blanco se colocó a 7,0 cm del punto de lanzamiento y se bombardeó a 600 psi sólo una vez. La cámara fue evacuada a 1 atmósfera y el tubo de aceleración de gas fue presurizado con helio.

Transformación transitoria de hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Para las agroinfiltraciones se cultivaron las células de *Agrobacterium* transformadas con el plásmido de interés (pKGWFS7,0) a 28°C durante 16 horas en 20 ml de LB con rifampicina (100 μ g/ml), espectinomicina (100 μ g/ml) y gentamicina (40 μ g/ml). El cultivo se centrifugó a 4000 rpm 10 min. a temperatura ambiente y el pellet se resuspendió en MES (ácido 4-morfolinoetanosulfónico) 10mM con acetosiringona (100mM). Alcanzada una densidad óptica (OD) a 600 nm de 0,5, la suspensión se

incubó 4 horas a temperatura ambiente y se infiltró en el envés de las hojas con jeringas sin aguja de 1ml. La coloración de GUS fue realizada entre los 2 y 4 días luego de la infección y luego se fotografiaron.

Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana* y confirmación de transgénicas por PCR.

Plantas de *A. thaliana* (Col-0) fueron transformadas por el método de inmersión floral (Clough y Bent 1998) con una solución de *A. tumefaciens* GV3101 transformada con los vectores binarios recombinantes correspondientes a los distintos promotores (prHaAP10, prHaFAD2-1, prHaOLE y pr35S). Las semillas cosechadas se seleccionaron placas con medio MS con kanamicina (50g/ml). Las plántulas heterocigotas resistentes a la selección fueron transferidas a macetas y crecidas en invernáculo en las condiciones normales descritas anteriormente hasta obtener la T2. Las plantas fueron autofecundadas por dos generaciones hasta obtener líneas homocigotas seleccionadas como se describió anteriormente.

Las plantas transgénicas fueron confirmadas mediante PCR detectando el inserto transformado utilizando los oligonucleótidos GUS1205 y GUSlow para amplificar un fragmento correspondiente al gen de la β -glucuronidasa. Como control interno se amplificó un fragmento del gen de Actina-2 con los oligonucleótidos específicos Actin-2Up y Actin-2Low.

Detección de la proteína reportera β -glucuronidasa (GUS) mediante el método colorimétrico.

La tinción histoquímica de la actividad GUS se realizó siguiendo el procedimiento descrito por (McCabe y col. 1988) utilizando X-Glu (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -Dglucuronido) como sustrato. Los explantos a analizar se colocaron en placas de Petri de 6 cm de diámetro y en placas de 6 posillos dependiendo la muestra a analizar y se cubrieron con solución GUS [X-Glu (0,5 mg/ml), Na₂PO₄H₂ (100 mM), EDTA (10 mM), ferrocianuro de potasio (5mM), ferrocianato de potasio (5mM), Tritón X-100

(0,1%), pH 7]. Luego, se incubaron a 37°C durante 18 hs y se observó la presencia de un precipitado azul sobre el tejido.

Para muestras o tejidos con clorofila se realizaron varios lavados con una solución de etanol 70% para aumentar el contraste y detectar la coloración azul de GUS.

Para la adecuada visualización de las semillas se realizó un protocolo modificado de clarificación utilizando medio Hoyers (agua destilada, goma arábiga, hidrato de cloral y glicerol) (Stangeland y Salehian 2002). Luego de la tinción las semillas fueron fijadas en etanol/acido acético (1:1) durante 4-6 horas, enjuagadas con etanol 100% y clarificadas con una solución de hidrato cloral (80g de hidrato cloral; 20ml de agua destilada y 10ml de glicerol) durante 18 hs.

Detección de la proteína reportera β -glucuronidasa (GUS) mediante el método fluorométrico.

La medición fluorométrica cuantitativa de la actividad GUS se realizó siguiendo el procedimiento básico usando MUG (β -D-hidrato glucorónido, Fluka, BioChemika, UK) como sustrato (Jefferson y col. 1987). Dicha técnica fue adaptada para emplear mediciones automáticas de la actividad enzimática en microplacas de 96 pocillos empleando un espectroflorímetro SpectraMax® GEMINI EM (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Los datos fueron analizados utilizando el programa SoftMaxPro5 (<http://www.moleculardevices.com/pages/software/softmax.html>). Los análisis estadísticos de los datos fueron realizados con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Infostat, version 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Transformación estable de plantas de lechuga y confirmación de transgénesis por PCR.

Para el estudio de la expresión estable del gen reportero de la β -glucuronidasa con los distintos promotores se realizaron ensayos de agroinfección de lechuga. La agroinfección se realizó utilizando el protocolo de (Curtis y col. 1994; Davey y col. 2002) con modificaciones (Radonic, 2010).

La desinfección de las semillas se realizó por sucesivos lavados. Primero con agua estéril, luego con alcohol 70 % durante 10 s, seguido de dos enjuagues con agua estéril, y con lavandina (20 %) durante 15 min. y luego se las enjuagó por lo menos 7 veces con agua estéril. Finalmente se colocaron en una solución PPM (20 mL/L) con $MgCl_2$ (0,05 mg/mL) a 4°C en oscuridad ON.

Las semillas se colocaron en placas de Petri con medio MS1/2 durante 48 h en penumbra y a 23°C en cámara de cría (*Versatile environmental test chamber*, Sanyo Electric Co, Japón). Posteriormente se modificaron las condiciones a 16 h de luz.

La cepa utilizada fue LBA4404 transformada con los plásmidos pKGWFS7 y pDZ con los distintos promotores a evaluar. El cultivo se realizó en placas de medio MMA con rifampicina (100 mg/l) y kanamicina (50 mg/l) a 28°C durante 48 h. El día de corte se inició un cultivo en medio MMA líquido a partir del total de las bacterias desarrolladas en placa a 28°C con agitación (*shaker* C25KC, New Brunswick, EUA) hasta una DO_{660} de 0,2-0,5 (DU-65 *Spectrophotometer*, Beckman Instruments, EUA).

Cuando los cotiledones estuvieron bien expandidos (10 días aproximadamente), se cortaron separándolos y realizándoles pequeñas incisiones. Luego se los colocó con la cara abaxial herida hacia abajo en placas de medio UM sólido por 24 h.

Los explantos se transfirieron a placas de Petri con UM líquido con acetosiringona (58,8 mg/L) y una dilución 1/20 de las agrobacterias. Se realizó agitación manual muy suave por 10 min, se dejaron secar sobre papel de filtro estéril y se transfirieron a placas con medio UM sólido con acetosiringona (58,8 mg/L). Se colocaron en penumbra en cámara de cría a 23°C durante 48 h.

Luego del cocultivo los explantos se transfirieron a placas de Petri con medio SIM. A los 7-10 días se transfirieron a placas con medio Regeneración de lechuga con kanamicina (50 mg/L). Se repitieron los pasajes en placa cada 10/14 días, hasta que se formaron brotes y luego se transfirieron a frascos de vidrio. Este proceso requirió aproximadamente 6 a 7 meses.

Cuando los brotes presentaron un tamaño adecuado se los separó del callo y se transfirieron a medio de enraizamiento (MS con ácido 1-naftalenacético, ANA, 0,1 mg/L)

Aquellos brotes que mostraron un desarrollo radicular adecuado, se llevaron en sus recipientes *in vitro* al invernáculo para una preaclimatación a las condiciones de temperatura y fotoperíodo de dicha área. Luego de 3-7 días, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 350 ml con una mezcla comercial conteniendo turba, perlita

y vermiculita (*Fafard Mix* N°2, Conrad Fafard, EUA). Las flores fueron cubiertas con bolsas de tela y se recolectaron las semillas obtenidas.

Las transgénicas fueron confirmadas mediante PCR detectando el inserto transformado utilizando los oligonucleótidos GUS1205 y GUSlow para amplificar un fragmento correspondiente al gen de la β -glucuronidasa. Como control interno se amplificó un fragmento del gen de Actina-2 con los oligonucleótidos específicos Actin-2Up y Actin-2Low.

Medios de Cultivo

Las sales, drogas, antibióticos y medios de cultivo utilizados fueron de las firmas Sigma-Aldrich y PhytoTechnology Labs, EUA, excepto las especificadas en el texto.

Los medios de cultivo fueron autoclavados durante 20 min. a 1,5 MPa. Las soluciones de antibióticos o de drogas termolábiles fueron esterilizadas por filtración en filtros de 0,2 μm (Millipore, Inglaterra).

Cultivos Bacterianos

LB (Luria Bertani): Extracto de levadura 5 g/L; Bactotripton (DIFCO, EUA) 10 g/L; NaCl 10 g/L. pH 7. Para medio sólido: Agar Tipo A 15 g/L.

Medio Mínimo A: KH_2PO_4 10,5 g/L; K_2HPO_4 4,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L; Citrato de sodio dihidrato 0,5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; Glucosa 2 g/L. pH 7. Para medio sólido: Agar Tipo A 10 g/L.

AIM: K_2HPO_4 10,5 g/L; KH_2PO_4 4,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L; Citrato de sodio dihidrato 5 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,06 $\mu\text{g/L}$; Glucosa 2 g/L; Glicerol 5 mL/L. pH 6,5-7. Conservación en oscuridad.

Cultivos Vegetales

MS (Murashige Skoog) 1/2: MS Sales 2,15 g/L; Sacarosa 10 g/L; Agar Tipo A 8 g/L. pH 5,7.

MS Vitaminas: Glicina 2 mg/L; Mioinositol 100 mg/L; Ácido nicotínico 0,5 mg/L; Piridoxina HCl 0,5 mg/L; Tiamina HCl 0,1 mg/L.

UM Vitaminas: Glicina 2 mg/L; Mioinositol 100 mg/L; Ácido nicotínico 5 mg/L; Piridoxina HCl 10 mg/L; Tiamina HCl 10 mg/L.

UM: MS Sales 4,3 g/L; UM Vitaminas 10 mL/L; Hidrolizado de caseína o triptona 2 g/L; Sacarosa 30 g/L; Para medio sólido: Agar Tipo A 8 g/L. pH 5,7. Adiciones luego de la esterilización por autoclavado: ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2 mg/L; Kinetina 0,25 mg/L.

Regeneración: MS Sales 4,3 g/L; MS Vitaminas 2 mL/L; Sacarosa 30 mg/L; Agar Tipo A 8 g/L. pH 5,7. Adiciones luego de la esterilización por autoclavado: BAP 0,5 mg/L; ANA 0,04 mg/L; Timentina 250 mg/L; Kanamicina 50 mg/L.

SIM: MS sales 4,3 g/L; MS vitaminas 2 mL/L; Sacarosa 30 g/L; Agar Tipo A: 8 g/L; Tiamina HCl 1 mg/L; *trans*-zeatina 2 mg/L; Timentina 250 mg/L.

Resultados

Identificación y caracterización de genes candidatos de expresión específica en semillas de girasol.

Identificación de genes candidatos

El primer objetivo planteado en esta tesis fue la identificación de genes candidatos que presenten expresión semilla-específica con el fin de aislar sus secuencias promotoras a partir de información disponible en forma pública. El primer seleccionado para su estudio fue el gen HaAP10 que codifica para una proteína de transferencia de lípidos (Lipid Transfer Protein o LTP) de girasol (Nº Acceso AF529201), cuya expresión es específica de semilla seca según se describe en el trabajo de (Regente y de la Canal 2003). Como material de partida para la evaluación de los perfiles de expresión se utilizó un plásmido que contiene el ADNc de dicho gen, el cual fue cedido por la Dra Laura de la Canal.

Por otra parte y atendiendo a que el laboratorio cuenta con un banco local de ESTs órgano específicos de girasol (Fernandez y col. 2003), se decidió evaluar la expresión de un EST que codifica para una posible LTP para determinar su patrón de expresión en distintos tejidos y verificar si es específico de semilla. Este EST en particular, EF502, proviene de una colección de ADNc substractiva de flor temprana (EF:Early Flower). Se diseñaron oligonucleótidos para realizar la técnica de 5'RACE que permitió amplificar el ADNc completo del gen correspondiente a una posible LTP no específica (HansLTP) (Tabla de Oligonucleotidos iniciadores en Materiales y Métodos). La pertenencia de dicho gen a la familia de las LTPs fue confirmada mediante análisis comparativos realizados con el programa BLASTN y BLASTX contra secuencias públicas. Posteriormente se utilizó el ADNc completo obtenido (Figura 1) para realizar los estudios de expresión.

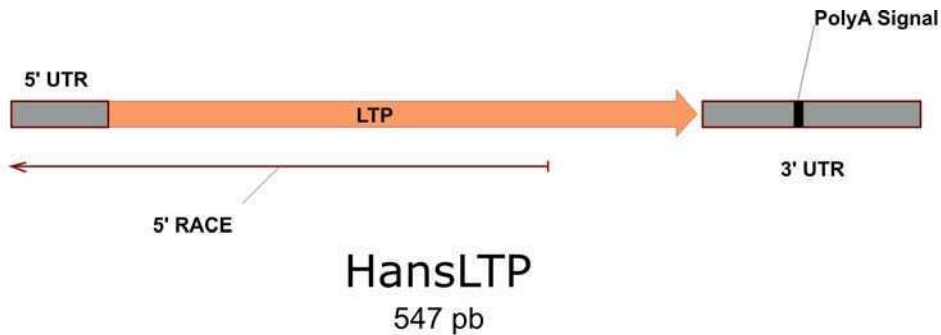


Fig 1. Esquema del ADNc completo del gen HansLTP de girasol. La figura muestra la región que fue amplificada mediante la técnica de 5' RACE.

En una segunda etapa, se realizaron búsquedas bibliográficas de genes que se expresan en semilla u órganos reproductivos de girasol. Los genes candidatos resultantes de las búsquedas fueron el gen HaFAD2-1 que codifica para una oleato desaturasa (Nº Acceso AY800244–45) (Martínez-Rivas y col. 2001) de girasol y un gen que codifica para una oleosina de girasol (HaOLE) (Nº Acceso X62352) (Cummins y Murphy 1992) para los cuales se reportó expresión en embriones en desarrollo y semilla seca. Sobre estos genes candidatos se diseñaron oligonucleótidos para amplificar sus ADNc por PCR a partir de ADN genómico (Tabla de Oligonucleotidos iniciadores en Materiales y Métodos). A pesar de que ya se ha descrito el patrón de expresión de la mayoría de los genes seleccionados, en todos los casos se realizó una caracterización molecular exhaustiva de sus patrones de expresión tanto temporal como espacial.

Caracterización de genes candidatos

Una vez elegidos los genes candidatos se procedió a la colecta y extracción de muestras de tejido de la planta de girasol para poder realizar los estudios de expresión a nivel transcripcional.

Se extrajo ARN de hoja en estadio V2 (plántula de 2 hojas verdaderas mayores a 4 cm.), hoja y tallo de plantas maduras y órganos reproductivos en estadios tempranos del desarrollo (R1-R4) según (Scheneiter y Miller 1981). Estas extracciones de ARN se realizaron utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Sin embargo para tejidos como semilla, raíz y capítulos post floración (R5-R6) (Scheneiter y Miller 1981), este método no resultó eficiente debido a los altos niveles de polifenoles y carbohidratos que co-precipitan con el ARN (Salzman y col. 1999). Por

ello se recurrió a un método que utiliza PVP soluble y precipitación con cloruro de litio, descrito en materiales y métodos, (Salzman y col. 1999) con el cual se logró obtener ARN de alta calidad y en concentraciones adecuadas para la realización de los northern blot. No obstante, cabe destacar que se presentaron dificultades en las extracciones de ARN con el método de Salzman. Se observó que para fenoles equilibrados a pH ácido (6) la pureza del ARN, en relación a la cantidad de ADN, era mayor que la obtenida al utilizar fenol pH básico (8). Esto es importante en estudios de RT-PCR y Real Time PCR donde pequeñas trazas de ADN pueden contaminar las muestras y generar falsos positivos, requiriendo de la aplicación de tratamientos mas exhaustivos.

Se realizaron estudios de expresión por RT-PCR de los 4 genes candidatos en algunos de los tejidos extraídos para obtener un primer perfil de expresión. Como se observa en la Figura 2, no se detectó amplificación en los tejidos vegetativos (hoja y tallo de plantas maduras) para ninguno de los 4 genes. Los genes HaAP10 y HaOLE presentaron expresión únicamente en semilla, mientras que HaFAD2-1 y HansLTP también lo hicieron en los estadios reproductivos tempranos. Sin embargo, como se observa en la figura la expresión en semilla del gen HansLTP es más débil que en los otros estadios.

Cuando se realizó el Northern blot correspondiente a este gen se observó expresión entre R1 y R4 y no en semilla (Figura 3), por lo que se decidió no realizar el aislamiento de su región promotora.

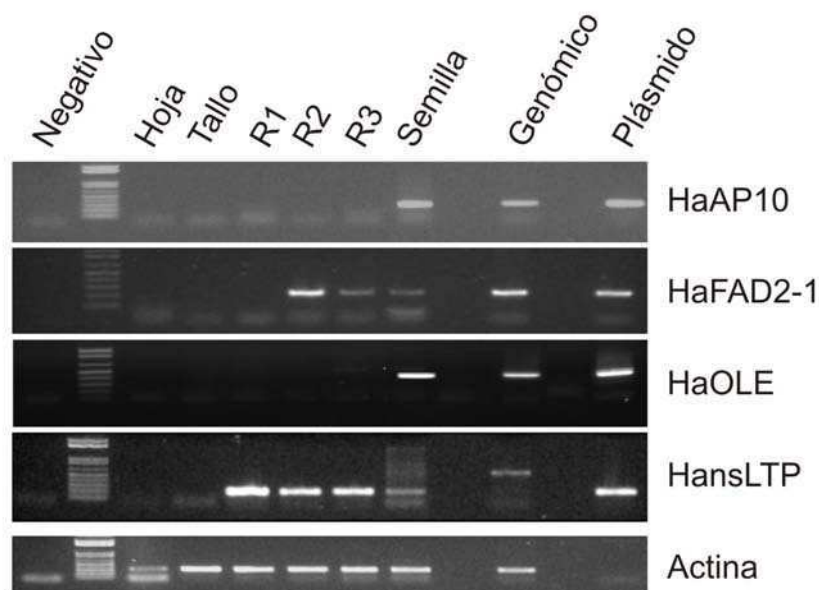


Fig 2. RT PCR de los genes candidatos en distintos tejidos de girasol. Se utilizó Actina como control de los ADNc y ADN genómico y plasmídico como controles de PCR

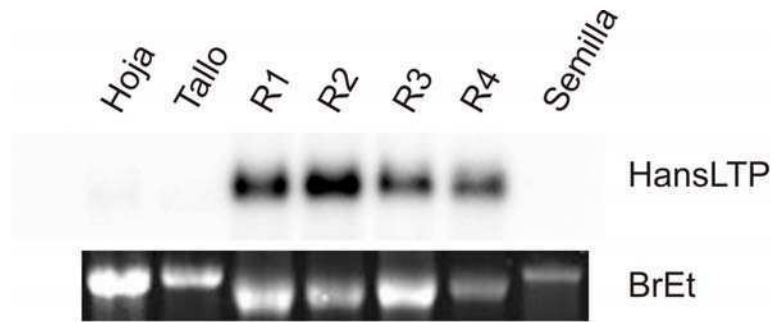


Fig 3. Northern blot del gen HansLTP en distintos estadios. 10ug de ARN de los diferentes tejidos fueron hibridizados con una sonda radioactiva correspondiente al gen HansLTP. Como control de siembra se indican las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S teñidas con bromuro de etidio.

Posteriormente se realizaron ensayos de northern blot incluyendo muestras de tejidos de raíz y de hojas (plantas en estadio V2), así como mas estadios de los órganos reproductivos (R4-R6) con el fin de obtener mas detalle del patrón de expresión de los genes. La Figura 4 muestra el perfil de expresión de los genes HaAP10, HaFAD2-1 y HaOLE en ensayos de northern blot. Tanto el gen HaAP10 como el HaOLE presentaron expresión únicamente en semilla, coincidiendo con los ensayos de RT-PCR, mientras que para el gen HaFAD2-1, también se observa expresión en capitulo en estadio R6, en donde las semillas ya están formadas o en formación. Este patrón de expresión tiene relación con lo visto en la RT-PCR, en la cual se detecta expresión de HaFAD2-1 en los estadios tempranos de floración R2 y R3. Dado que la técnica de PCR es más sensible que la de northern blot y permite detectar pequeñas cantidades de un transcripto, se puede inferir que los niveles de expresión de HaFAD2-1 en R2 y R3 deben ser muy bajos ya que no se pueden detectar en el northern blot.

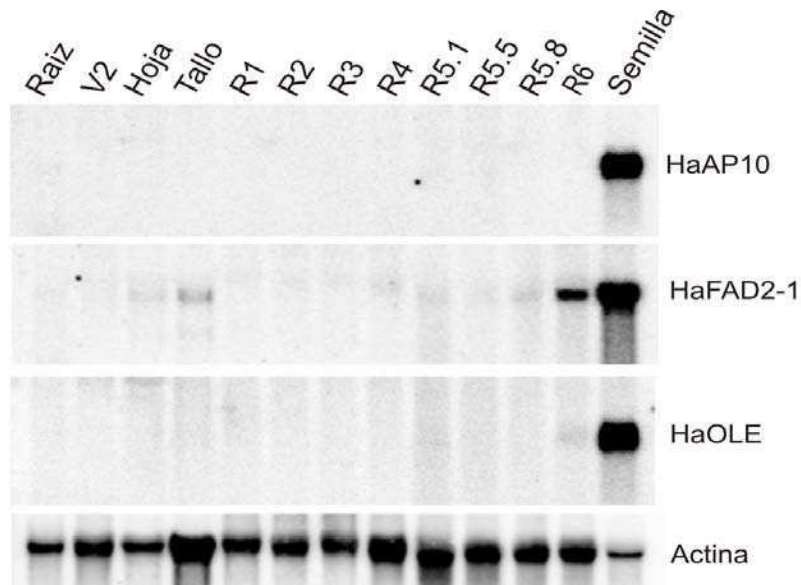


Fig 4. Northern blot utilizando 10 µg de ARN total de diferentes tejidos y estadios de girasol. Se utilizó actina como control interno. V2: Hoja de plántula; R1-R4: diferentes estadios de botón floral; R5-R6: capítulos a diferentes tiempos de floración; Semilla: semillas a los 35 días post floración.

Con objetivo de obtener una caracterización tejido específica más exhaustiva del patrón de expresión temporal de los genes, se analizó la expresión de los transcritos en semillas inmaduras a distintos días post floración, (DPF5; DPF15; DPF25; DPF35) y en semillas secas (Semilla). Los patrones de expresión evaluados por northern blot presentaron diferencias en cada gen evaluado. Cada gen tuvo su máximo de expresión en diferentes estadios. Para el gen HaAP10 el nivel máximo de transcrito fue en semillas DPF 35, para el gen HaFAD2-1 fue en semillas DPF15, mientras que para el gen HaOLE el nivel máximo fue en semillas secas (Figura 5a), obteniéndose patrones de expresión temporal diferentes para cada candidato. En la figura 5b se esquematizan capítulos de girasol a distintos tiempos post floración. La toma de las muestras se realizó tomando las semillas inmaduras de una sección triangular del capítulo como se muestra en la figura 5b.

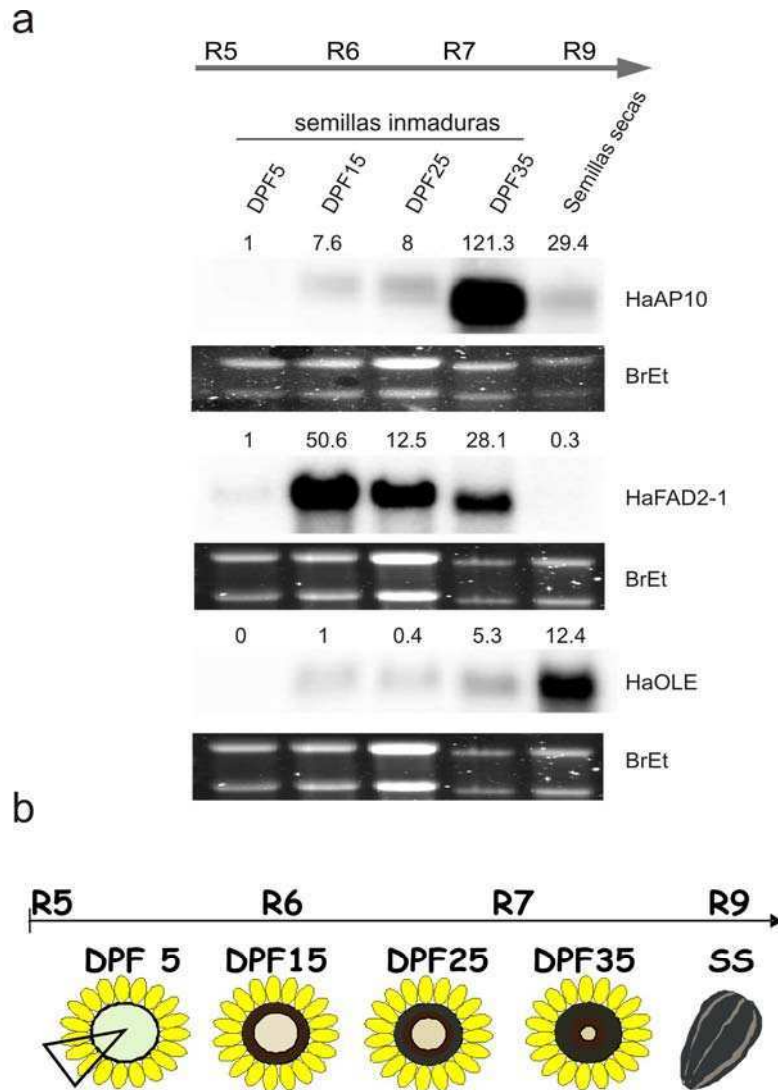


Fig 5. (a) Northern blot utilizando 10 μ g de ARN total de semillas en distintos tiempos de desarrollo. Una sección de capítulos de girasol fueron utilizados como fuente de las semillas inmaduras a diferentes días post floración. Las sondas fueron las mismas utilizadas en la figura 4. Como control de siembra se indican las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S teñidas con bromuro de etidio. **(b)** Esquema de la sección del capítulo de girasol tomada para realizar el ensayo de Northern blot de las semillas inmaduras. Se observa la progresión radial del desarrollo de las semillas dentro del capítulo.

Aislamiento y caracterización funcional de promotores específicos de semilla.

Aislamiento de promotores

En este apartado se describen las distintas técnicas que se utilizaron para aislar los promotores de los genes que finalmente fueron elegidos luego de evaluar su patrón de expresión, así como el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

Genoteca de girasol en BACs

La primera estrategia utilizada para aislar los promotores fue relevar los genes candidatos en una genoteca de girasol construida en BACs (Gentzbittel y col., 2002; CUGI, Clemson University, USA <http://www.genome.clemson.edu/>).

Los filtros de alta densidad que contienen por duplicado el total de los clones que componen la genoteca, fueron analizados por hibridación con sondas provenientes de los genes candidatos marcados con ^{32}P . Como se muestra Figura 6 A, cada BAC que resultó positivo aparece por duplicado con una disposición determinada en la grilla. Cada una de estas disposiciones corresponde a un clon BAC diferente los cuales son identificados en una planilla de referencia. Se detectaron 23 y 13 clones correspondientes a las secuencias con similitud a HansLTP y a HaAP10, respectivamente.

Una vez detectados los clones BAC que potencialmente poseen parte del gen candidato y su región reguladora, se analizaron dos posibles estrategias para acotar la búsqueda debido a la amplia capacidad de los BACs de insertar fragmentos entre 100-350 kpb.

Por un lado, se realizaron digestiones de estos BACs positivos con diferentes combinaciones de enzimas de restricción con el fin de obtener bandas de tamaños adecuados para poder ser clonadas en vectores para su posterior secuenciación. Para poder determinar cual o cuales de las bandas corresponden al gen en cuestión se volvieron a hibridar con las sondas en ensayos de Southern blot (Figura 6 B). Las bandas positivas obtenidas de esas digestiones correspondían a fragmentos mayores a 3 kpb, y si bien se intentó clonarlas repetidas veces los resultados fueron infructuosos.

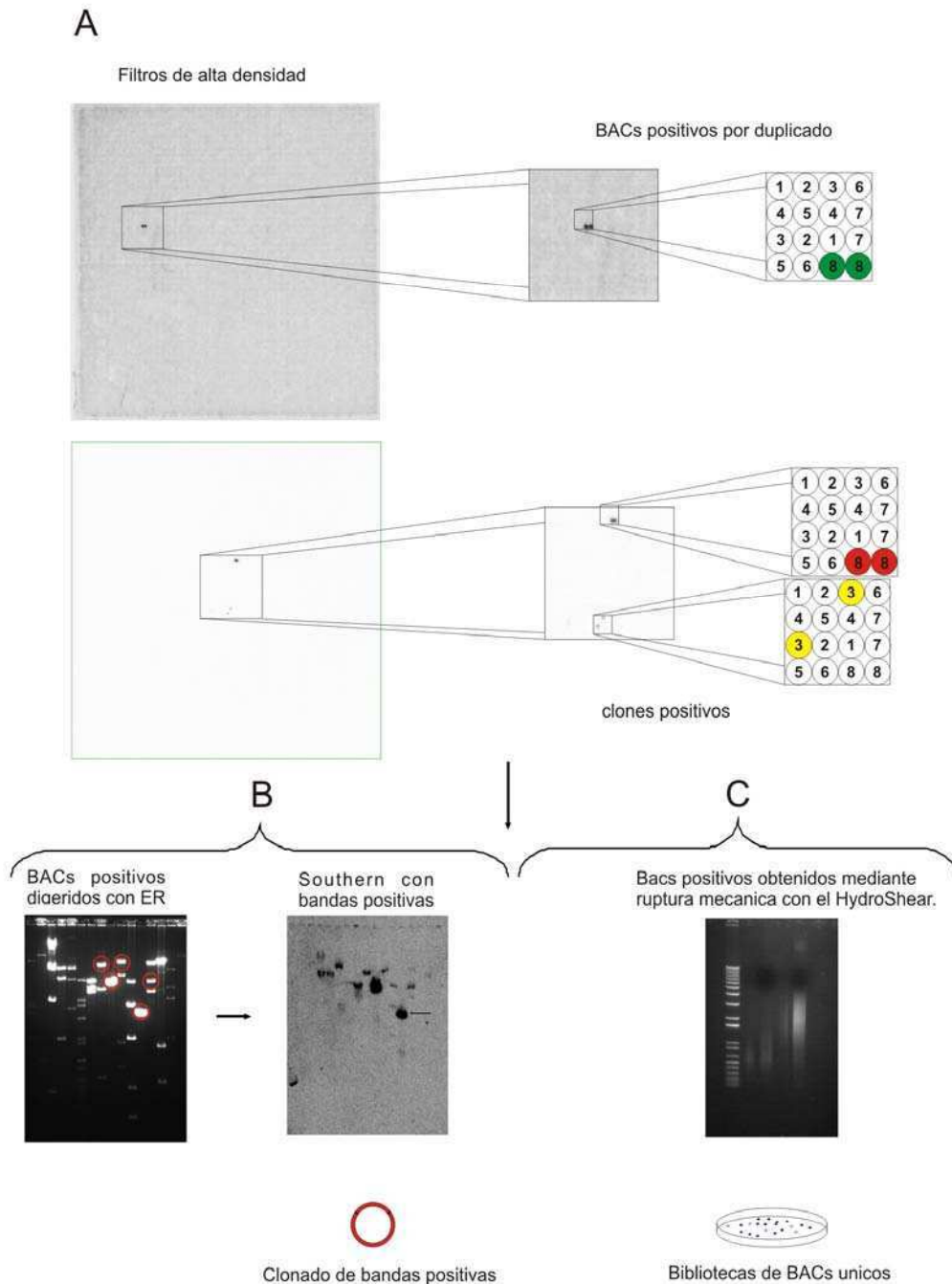


Fig 6. Esquema de la búsqueda de clones positivos de una genoteca de girasol en BACs. **(A)** Filtros de alta densidad de hibridados con sondas específicas correspondientes a los genes de interés. Se detallan los clones positivos y la manera de identificarlos. **(B)** Digestiones de los BACs positivos con enzimas de restricción e hibridación con las mismas sondas específicas en ensayos de southern blot. Las bandas positivas fueron aisladas y clonadas en vectores para su secuenciación. **(C)** Ruptura mecánica de los BACs positivos mediante el equipo HydroShear en fragmentos homogéneos de 2 a 4 kpb para generar una librería de BACs únicos

La segunda estrategia utilizada para detectar los genes candidatos dentro de los BACs fue la ruptura mecánica de los clones positivos, utilizando un equipo llamado HydroShear que sonica el ADN, fragmentándolo uniformemente entre 2 y 4 kpb para

clonarlos y generar una biblioteca a partir de un único BAC (Figura 6 C). Los fragmentos fueron clonados en el vector *PMos Blue* (GE Healthcare) siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. Se intentó generar la biblioteca repetidas veces obteniéndose no más de 50 colonias en cada transformación, de las cuales ninguna contenía el inserto deseado, comparado con un número de 100 colonias y un porcentaje de transformantes del 75% para DNA control utilizado, por lo que se concluyó que el protocolo de ruptura basado en HydroShear no fue satisfactorio.

Cabe mencionar que las sondas de los genes HaFAD2-1 y HaOLE no fueron ensayadas en estos experimentos debido a un cambio de estrategia al momento de realizarlos. De igual manera, se debe destacar que estos experimentos fueron realizados a la par con los de caracterización de los genes candidatos, por lo que al momento de realizar la búsqueda de los promotores no se había descartado el gen HansLTP.

Genome Walker

En forma alternativa al enfoque anterior, se evaluó la estrategia de caminado cromosómico utilizando el kit Genome WalkerTM Universal Kit (Clontech, USA) descrito en la sección de Materiales y Métodos (Figura 7). Este sistema permite generar 4 bibliotecas de ADN genómico digerido con diferentes enzimas de restricción que dejan extremos romos: *DraI* (DL1), *EcoRV* (DL2), *PvuII* (DL3) y *StuI* (DL4). Luego de las dos rondas de amplificación se obtuvieron bandas diferenciales en varias de las librerías para cada gen. Como control se realizaron amplificaciones empleando sólo uno u otro de los iniciadores de la segunda ronda, así como reacciones carentes de templado. En la Figura 8 se muestran los geles correspondientes a la primer y segunda ronda de amplificación para cada gen.

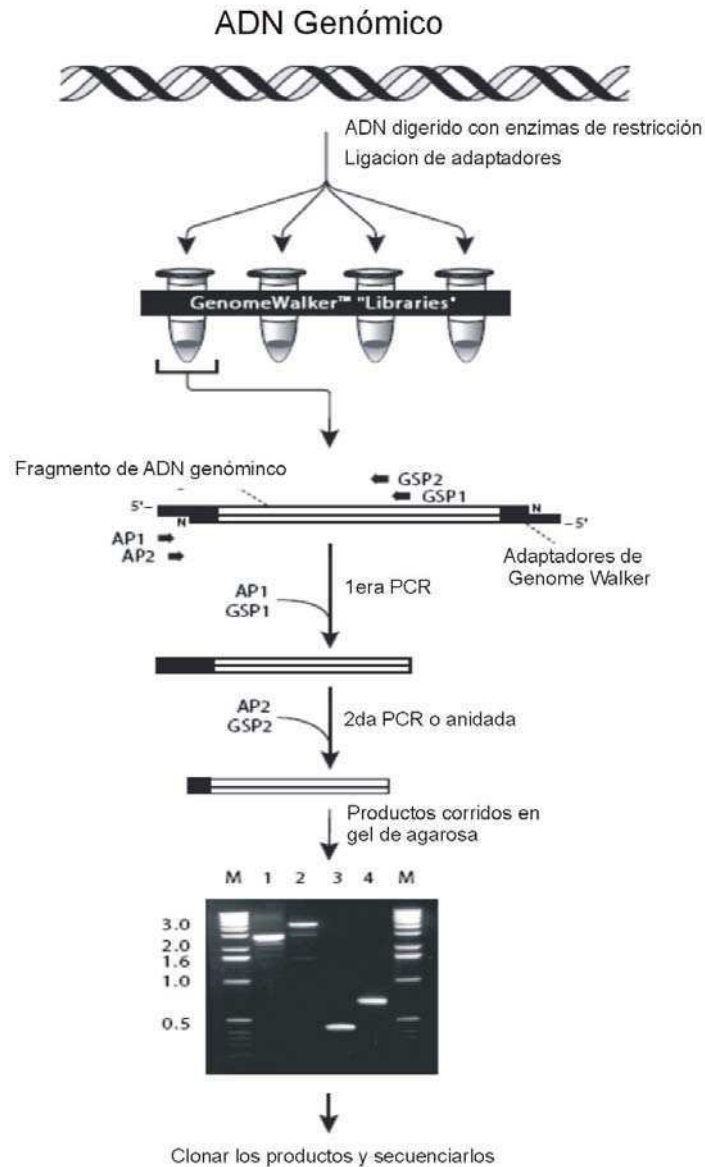


Fig 7. Esquema del protocolo del kit Genome Walker. El gel muestra un resultado típico generado por el kit. GSP representa a los oligonucleótidos específicos

De todas las bandas diferenciales identificadas (marcadas con números) se aislaron, clonaron y secuenciaron algunas de ellas.

Para los subsiguientes experimentos solo se tuvieron en cuenta aquellas bandas que al analizar su secuencia tuvieron homología con la región 5' del gen correspondiente, incluido el oligonucleótidos iniciador utilizado en la segunda ronda de amplificación.

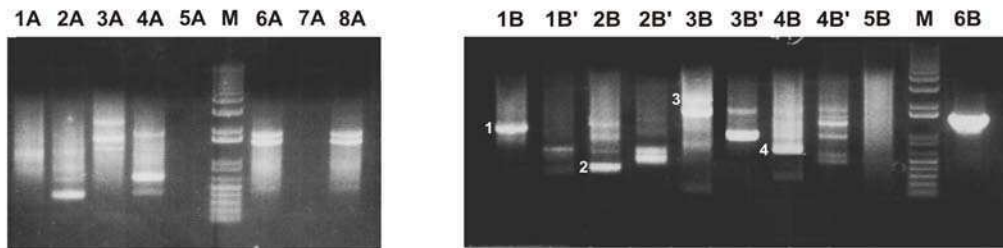
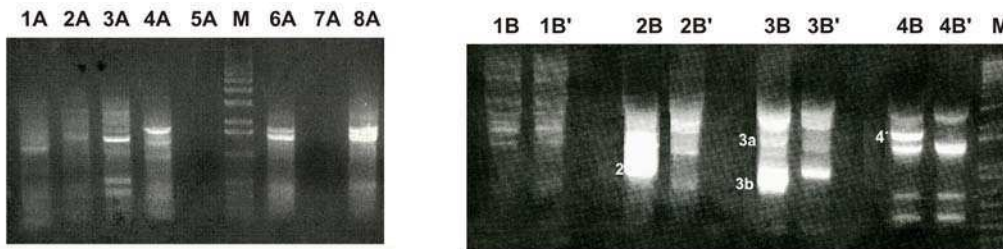
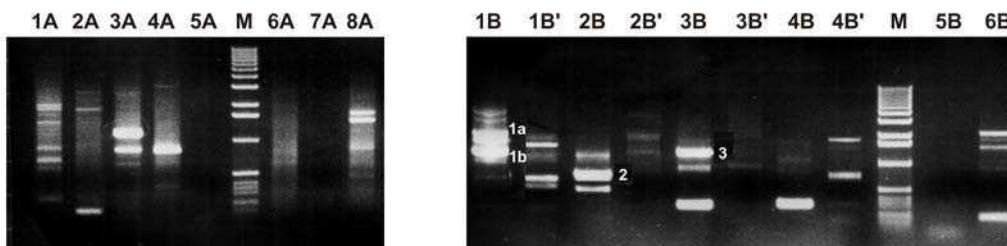
HaAP10**HaFAD2-1****HaOLE**

Fig 8. Fotografías de la técnica de caminado cromosómico utilizada para aislar las secuencias reguladoras de los genes candidatos. Los geles de la izquierda corresponden a los productos amplificados de primera ronda de PCR con los iniciadores AP1 y los específicos para cada gen. (1A-4A): amplificaciones de las cuatro librerías de ADN. 5A: control negativo sin templado. 6A: control positivo de una librería construida en paralelo a partir de ADN humano amplificada con iniciadores provistos por el kit. 7A: control negativo sin librería de ADN humano. 8A: control positivo de una librería pre-construida provista por el kit. Los geles de la derecha corresponden a los productos amplificados de la PCR anidada con los iniciadores AP2 y los específicos para cada gen utilizando como templado el producto de la primera PCR. (1B-4B): amplificaciones de las cuatro librerías de ADN. (1B'-4B'): amplificaciones de las cuatro librerías utilizando solo el iniciador AP2. 5B: control negativo utilizando como templado el producto de 5A. 6B: control positivo utilizando como templado el producto de 6A.

Promotor HaAP10

Se aislaron las 4 bandas marcadas en la Figura 8 correspondientes al gen HaAP10 con el kit Qiaex II. Debido a que la concentración de las bandas purificadas fue insuficiente para su secuenciación directa, se clonaron en el vector PCRII-TOPO y se secuenciaron previa confirmación del correcto clonado por restricción enzimática.

De las cuatro bandas aisladas solo la 3 no pudo ser clonada y secuenciada. Al analizar la secuencia del clon correspondiente a la banda 1 se obtuvo una secuencia de 1131pb, de las cuales 170 pb correspondían al gen HaAP10 incluyendo el 5' UTR, el ATG y la secuencia del iniciador LTP5gw3 con el que fue realizada la segunda ronda de PCR, mientras que el resto de la secuencia de 964pb era desconocida y no presentaba homología relevante en las bases de datos de nucleótidos.

Promotor HaFAD2-1

Se aislaron las 4 bandas marcadas en la Figura 8 correspondientes al gen HaFAD2-1 con el kit Qiaex II. En este caso, las bandas fueron clonadas en pGEMt-Easy y mandadas a secuenciar previa confirmación del correcto clonado por restricción enzimática. Nuevamente, las bandas de mayor tamaño no pudieron ser clonadas mientras que las bandas 2 y 3b fueron clonadas y secuenciadas. Al analizarlas se obtuvieron secuencias de aproximadamente 900 pb para la banda 2 y 700pb para la banda 3b la cual estaba incluida en la banda 2. Del total de la secuencia, 69 pb correspondían a una parte del 5'UTR del gen HaFAD2-1 que incluía la secuencia del iniciador FAD2gw2 con el que fue realizada la segunda ronda de PCR. El resto de la secuencia de 867 pb no presentaba homología relevante en las bases de datos de nucleótidos.

Promotor HaOLE

Se aislaron las 4 bandas marcadas en la Figura 8 correspondientes al gen HaOLE con el kit Qiaex II, las cuales fueron clonadas en pGEMt-Easy. A pesar de varios intentos solo se pudo clonar y secuenciar la banda 2. La secuencia obtenida fue de 660pb de las cuales 80pb correspondían al gen HaOLE que incluía la secuencia del iniciador OLEgw3 con el que fue realizada la segunda ronda de PCR. El resto de la secuencia no presentaba homología relevante en las bases de datos de nucleótidos.

Debido a que el promotor aislado poseía solamente 577 pb y no se pudieron clonar las bandas de mayor tamaño, se decidió realizar un nuevo ensayo de caminado cromosómico con dos nuevos iniciadores a partir de la nueva secuencia 5' aislada (OLEgw4 y OLEgw5). En la Figura 9 se observa el gel correspondiente a la segunda ronda de PCR en la cual se observan bandas diferenciales, que fueron aisladas y clonadas en PCRII-TOPO. Se realizaron numerosos intentos para obtener clones positivos de alguna de estas bandas. Finalmente se logró clonar la banda 3, que fue

secuenciada obteniéndose 1400pb extras. La secuencia analizada solapaba con la obtenida anteriormente pudiéndose armar un contig de 1838pb de la región 5' reguladora del gen HaOLE.

HaOLE

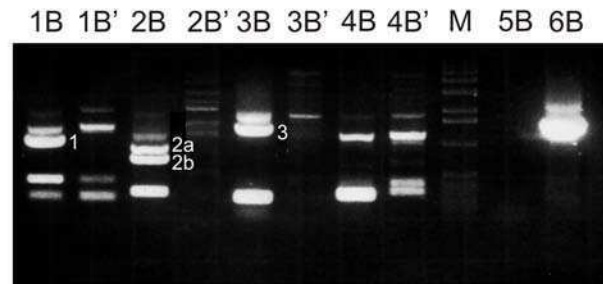


Fig 9. Fotografía de la técnica de caminado cromosómico para ampliar la secuencia reguladora del gen HaOLE. (1B-4B): amplificaciones de las cuatro librerías de ADN. (1B'-4B'): amplificaciones de las cuatro librerías utilizando solo el iniciador AP2. 5B: control negativo sin templado. 6B: control positivo utilizando como templado una librería de ADN humano.

Análisis bioinformático de los promotores

Las secuencias río arriba de los genes candidatos que no presentaron homología relevante en bases de datos nucleotídicas fueron caracterizadas bioinformáticamente. Primero se determinaron los posibles sitios de iniciación de la transcripción, denominado +1, empleando un programa de predicción de secuencias de promotores eucariotas (McPromoter). También se identificaron secuencias correspondientes a posibles TATA Box, CAT Box y motivos específicos utilizando diversos programas y bases de datos.

Promotor HaAP10

Los análisis sugirieron la existencia de tres posibles sitios +1 ubicados a 436, a 22 y a 40 pb río arriba del codón de iniciación de la traducción. Teniendo en cuenta las distancias y la secuencia de cDNA reportada se determinó que el tercer sitio era el correcto. Asimismo, se identificó una secuencia correspondiente a un motivo TATA a 25 pb río arriba del +1 seguido de un posible motivo CAAT a 321 pb río arriba del +1.

A fin de identificar potenciales elementos regulatorios en *cis*, se llevó a cabo un estudio *in silico* de la secuencia. Acorde a la base de datos y al sitio PLACE (Higo y col. 1999) se identificaron numerosos elementos regulatorios muchos de los cuales estarían involucrados en activación específica en semilla. La Tabla 1 muestra un resumen de los motivos conservados típicos de promotores así como de los motivos específicos de expresión en semilla. Cabe mencionar que también fueron encontrados motivos relacionados a inducción por auxinas y giberelinas relacionados con el desarrollo de semillas y embriones.

Motivos	Consenso	Motivos detectados en el promotor HaAP10	Posición del motivo	Referencias
Elementos frecuentes				
TATA Box	CTATAWAWA	CTATAAAA	-25 to -20	(Forde y col. 1985)
CCAAT Box	CCAAT	CCAAT	-321 to -317	(Forde y col. 1985)
Elementos específicos de semilla				
(ACE) ACGT-containing element endosperm-specific	GTACGTG	GTACGTG	-723 to -717	(Wu y col. 2000)
AACA motif, endosperm-specific	AACAAAC	AACAAAC AACAAAC	-260 a -254 -336 a -330	(Wu y col. 2000) (Yoshihara y col. 1996)
Sh1 Box, Maize	TGAATG	TGAATG TGAATG TGAATG TGAATG CATCTG	-362 a -357 -518 a -513 -551 a -546 -835 a -830 -64 a -58	(D'Aoust y col. 1999)
E-Box, sarage-protein, oilrape	CANNTG	CACTTG CAAATG CACTTG	-98 a -93 -445 a -440 -767 a -762	(Stalberg y col. 1996)
SEF4 binding site, soybean embryo factor, seed	RTTTTTR	ATTTTTA GTTTTTG	-83 a -76 -150 a -144	(Allen y col. 1989)
Elementos ABRE, GARE				
binding core bZIP, ABA response	ACACNNG	ACACTTG	-99 a -93	(Kim y col. 1997)
similar to ABRE	ACGTGTC	ACGTGTC	-588 a -582	(Ogawa y col. 2003)
GARE	TAACAAA/G	TAACAAA	-647 a -641	(Ogawa y col. 2003)
Pyrimidine Box, (ABRE and GARE)	TTTTTCC	TTTTTCC	-564 a -557	(Cercos y col. 1999)

Tabla 1. Motivos putativos en la secuencia del promotor HaAP10

Promotor HaFAD2-1

En cuanto al promotor HaFAD2-1 el mismo análisis de predicción del +1 identificó dos posibles sitios a 3015 y 2216 pb río arriba del codón de inicio de la traducción. Estas distancias tan grandes se deben a que el gen HaFAD2-1 (y en general muchas oleato desaturadas de otras especies) poseen una región 5' muy extensa de 1808 pb, llamada 5'UTR intrón. En este caso, según las distancias y la secuencia de ADNc se determinó

que el segundo sitio era el correcto. Luego se identificaron el motivo TATA a 30 pb río arriba del +1 y un posible motivo CAAT a 77 pb del inicio de la transcripción. Nuevamente se realizaron los estudios *in silico* de la secuencia y se identificaron motivos específicos de expresión en semilla, varios de los cuales eran compartidos por el promotor HaAP10. La Tabla 2 muestra el resumen de los motivos conservados y específicos para el promotor HaFAD2-1.

Motivos	Consenso	Motivos detectados en el promotor HaFAD2-1	Posición del motivo	Referencias
Elementos frecuentes				
TATA Box	CTATAWAWA	TATATAA	-30 a -24	(Forde y col. 1985)
CCAAT Box	CCAAT	CCAAT	-77 a -73	(Forde y col. 1985)
Elementos específicos de semilla				
(ACE) ACGT-containing element endosperm-specific	GTACGTG	GTACGTG	-811 a -805	(Wu y col. 2000)
AACA motif, endosperm-specific	AACAAAC	AACAAAC AACAAAC	-159 a -153 -681 a -675	(Wu y col. 2000) (Yoshihara y col. 1996)
GCN4 motif, endosperm-specific, seed, storage protein	TGA(C/G)TCA	TGAGTCA	-626 a -621	(Muller y Knudsen 1993) (Wu y col. 2000) (Yoshihara y col. 1996)
Sh1 Box, Maize	TGAATG	TGAATG	-168 a -163	(D'Aoust y col. 1999)
E-Box, storage-protein, oilrape	CANNTG	CAAGTG CAAATG CATGTG	-105 a -100 -331 a -326 -547 a -542	(Stalberg y col. 1996)
SEF1 binding site, soybean embryo factor, seed	ATATTTAWW	ATATTTAAA	-400 a -391	(Allen y col. 1989)
SEF4 binding site, soybean embryo factor, seed	RTTTTTR	ATTTTTA GTTTTTA	-673 a -667 -800 a -794	(Allen y col. 1989)
Elementos ABRE, GARE				
binding core bZIP, ABA response	ACACNNG	ACACTTG ACACTTG	-134 a -128 -186 a -180	(Kim y col. 1997)
Pyrimidine Box, (ABRE and GARE)	TTTTTTCC	TTTTTTCC	-346 a -339	(Cercos y col. 1999)
Pyrimidine Box GARE	CCTTTT	CCTTTT	-287 a -282	(Morita y col. 1998)

Tabla 2. Motivos putativos en la secuencia del promotor HaFAD2-1

Promotor HaOLE

Se realizó el mismo análisis de predicción del +1 bioinformáticamente arrojando solo un posible sitio. Sin embargo, en este caso no se pudo comparar por distancias ya que no se contaba con la secuencia completa del ARNm en las bases de datos disponibles. Es por ello, que se procedió a realizar la técnica de 5'RACE con el fin de identificar el +1 experimentalmente. Se determinó que a la secuencia depositada le faltaban dos codones, incluido el ATG de inicio de la transcripción y el 5' UTR de 8 pb. En este

caso, el +1 predicho por el análisis bioinformático no coincidió con el identificado experimentalmente el cual está a 8 pb del sitio de inicio de la traducción.

Una vez más, se identificó un elemento TATA río arriba del +1 y el único motivo CAAT encontrado se ubicaba a 853 pb del sitio de inicio de la transcripción. El análisis de motivos o elementos regulatorios arrojó varios motivos relacionados a expresión específica en semillas. La Tabla 3 muestra los motivos encontrados.

Motivos	Consenso	Motivos detectados en el promotor HaOLE	Posición del motivo	Referencias
Elementos frecuentes				
TATA Box	CTATAWAWA	TATATAA	-32 a -26	(Forde y col. 1985)
CCAAT Box	CCAAT	CCAAT	-77 a -73	(Forde y col. 1985)
Elementos específicos de semilla				
Amylase Box	TATCCAT	TATCCAT	-202 a -196	(Hwang y col. 1998)
AACA motif, endosperm-specific	AACAAAC	GTTTGTT AACAAAC	-570 a -564 -1500 a -1494	(Wu y col. 2000) (Yoshihara y col. 1996)
GCN4 motif, endosperm-specific, seed, storage protein	TGA(C/G)TCA	TGACTCA	-1743 a -1737	(Muller y Knudsen 1993) (Wu y col. 2000) (Yoshihara y col. 1996)
CACGTG motif G-Box	CACGTG	CACGTG	-68 a -64	(Hudson y col. 2003) (Menkens y col. 1995)
(CA) _n element	CNAACAC	CGAACAC	-1026 a -1020	(Ellerström y col. 1996)
E-Box, storage-protein, oilrape	CANNTG	CATATG CATGTG CAGCTG CATCTG	-509 a -504 -820 a -815 -1042 a -1037 -1063 a -1058	(Stalberg y col. 1996)
Prolamine Box	TGCAAAG	TGCAAAG	-96 a -90	(Wu y col. 2000)
RY repeat	CATGCA	CATGCA	-98 a -93	(Baumlein y col. 1992)
SEF4 binding site, soybean embryo factor, seed	RTTTTTR	TAAAAAT	-1486 a -1480	(Allen y col. 1989)
Elementos ABRE, GARE				
similar to ABRE	ACGTGTC	ACGTGTC	-67 a -61	(Ogawa y col. 2003)
Opaque 2-binding site (GARE)	GATGAYRTGG	CCATGTCATC	-81 a -72	(Lanahan y col. 1992)

Tabla 3 Motivos putativos en la secuencia del promotor HaOLE

Ensayos de expresión transitoria mediante bombardeo

Con el objetivo de realizar un análisis funcional y comprobar que las secuencias aisladas correspondían a regiones promotoras, se diseñaron iniciadores específicos para amplificar la secuencia correspondiente a los promotores sin incluir la secuencia del adaptador en el 5' ni el ATG en el 3', obteniéndose las secuencias únicas y específicas

de los posibles promotores. Estas secuencias fueron denominadas PrHaAP10, PrHaFAD2-1 y PrHaOLE., las cuales fueron clonadas en el vector AKK, río arriba del gen reportero que codifica para la enzima β -glucuronidasa..Además de los vectores con los promotores clonados, se utilizaron como control positivo el vector AKK con el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor y como controles negativo el vector vacío (Figura 10).

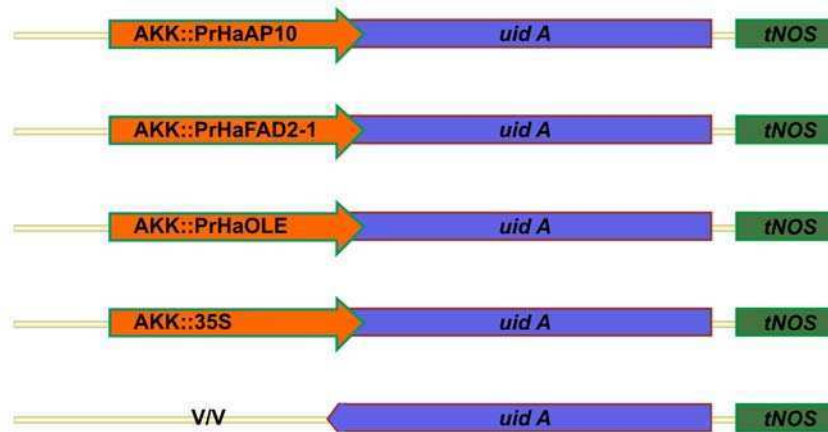


Fig 10. Esquema de los casetes de expresión de los plásmidos aptos para bombardeo génico. AKK::PrHaAP10, AKK::PrHaFAD2-1, AKK::PrHaOLE: construcciones portadoras de los posibles promotores aislados en el esqueleto del plásmido pAKK1431. v/v: construcción control carente de secuencias promotoras (vector vacío); AKK::35S: construcción control portadora del promotor doble 35S.

Se realizaron ensayos de expresión transitoria con los plásmidos resultantes, por bombardeo de hojas de cebolla y fue posible detectar la expresión de la proteína reportera para los 3 promotores (Figura 11), confirmándose que las secuencias aisladas correspondían a regiones promotoras funcionales.

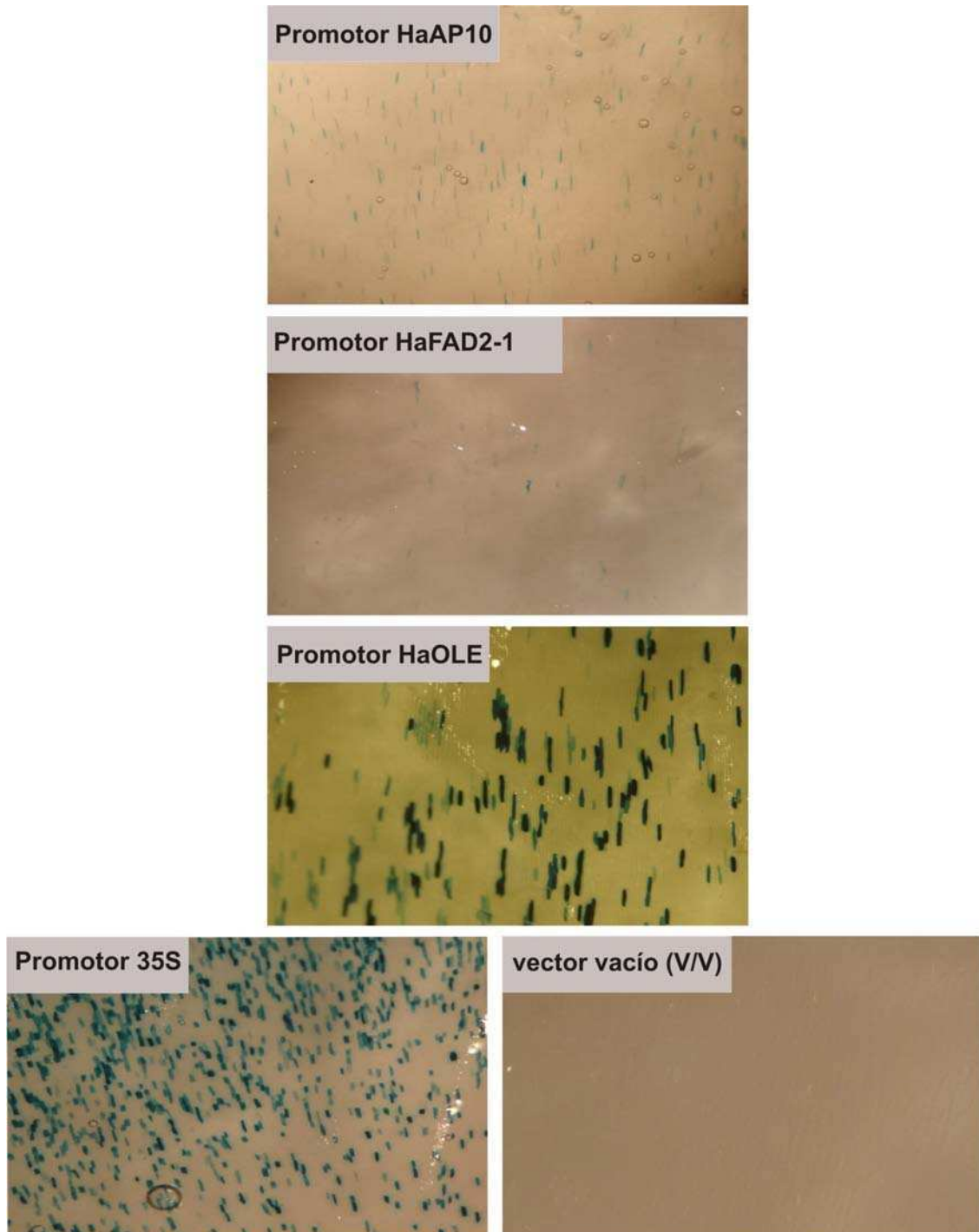


Fig 11. Ensayos de transformación transitoria en hojas de cebolla con los promotores HaAP10, HaFAD2-1 y HaOLE. Se observa tinción en los tres casos con distintas intensidades. El promotor 35S y el vector vacío se muestran como control positivo y negativo respectivamente.

Ensayos de agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Con el objetivo final de caracterizar las regiones promotoras *in vivo*, los promotores PrHaAP10, PrHaFAD2-1, PrHaOLE fueron clonados con el sistema Gateway utilizando el vector pCR8/GW/TOPO TA. Una vez obtenidos los plásmidos se recombinaron con el vector binario pKGWFS7,0 apto para la transformación estable. Las construcciones resultantes se esquematizan en la Figura 12.

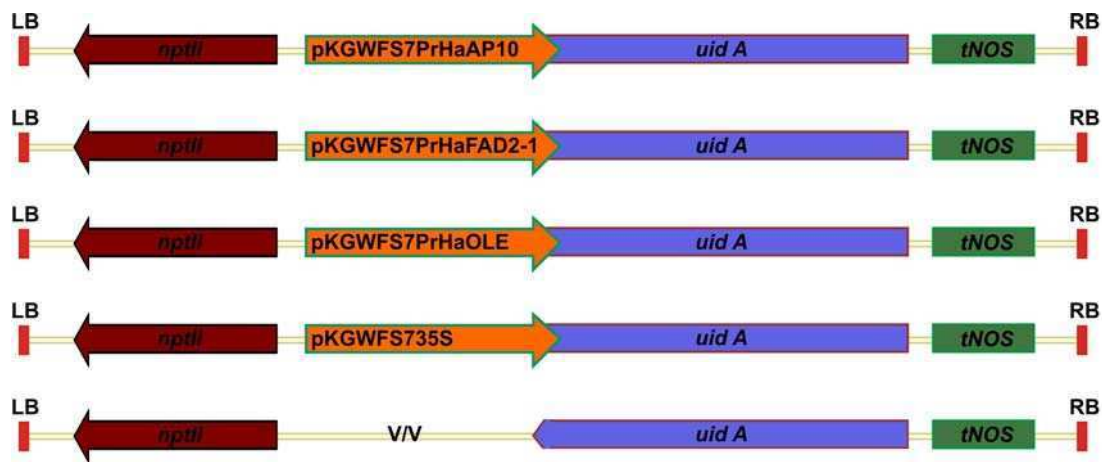


Fig 12. Esquema de los elementos presentes en los plásmidos binarios entre ambos bordes. pKGWFS7PrHaAP10; pKGWFS7PrHaFAD2-1; pKGWFS7PrHaOLE: construcciones portadoras de los promotores de los genes HaAP10, HaFAD2-1 y HaOLE en el esqueleto del plásmido pKGWFS7. Las construcciones controles son: pKGWFS735S, portadora del promotor 35S y V/V carente de secuencias promotoras (vector vacío). LB y RB corresponden a los bordes izquierdo y derecho reconocidos por las agrobacterias para la recombinación en el genoma de la planta.

Para verificar la integridad de los mismos se transformaron agrobacterias de la cepa GV3101 y se llevaron a cabo ensayos de agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Se realizó un esquema de agroinfiltración utilizando los promotores a evaluar junto con sus controles en la misma hoja (Figura 13).

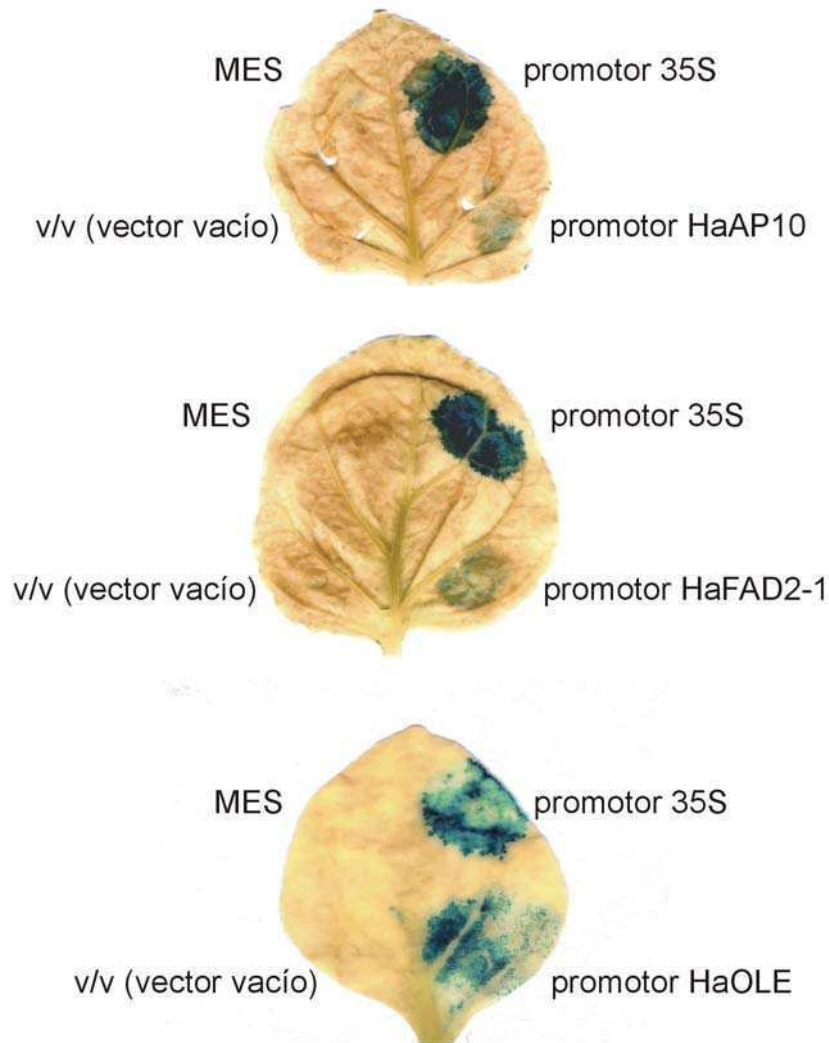


Fig 13. Ensayo de transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana* con los promotores HaAP10, HaFAD2-1 y HaOLE en vectores binarios. El promotor 35S se utilizó como control positivo, mientras que el vector vacío y una solución de MES como controles negativos.

Caracterización espacial y temporal de los promotores en el sistema modelo *Arabidopsis thaliana*.

En esta sección se realizó la caracterización funcional de los promotores HaAP10 y HaFAD2 y se avanzó en la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis* homocigotas para el promotor HaOLE.

Con el fin de estudiar *in vivo* la expresión dirigida por las regiones promotoras de los distintos genes candidatos se obtuvieron plantas transgénicas del sistema modelo *Arabidopsis thaliana* utilizando las construcciones descritas en la sección anterior (Figura 12). Luego de los ensayos de transformación y la selección en medio con antibiótico, varias plántulas fueron pasadas a tierra para generar plantas homocigotas como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Así, se obtuvieron líneas estables para cada promotor a evaluar, incluyendo los controles 35S y v/v. La presencia del gen de la β -glucuronidasa fue confirmada mediante PCR en todas las líneas transgénicas. Para los subsiguientes ensayos de expresión fueron utilizadas dos líneas homocigotas para el promotor HaAP10, dos para el HaFAD2-1, dos para el control 35S y dos para el vector vacío.

En primer lugar, se detectó la expresión de la proteína reportera mediante el método colorimétrico en plántulas a diferentes estadios de desarrollo vegetativo hasta planta adulta en estadio 5.10 (Boyes y col. 2001). Como se muestra en la Figura 14 las plántulas de las líneas HaAP10 y HaFAD2-1 no presentan coloración de la proteína reportera más allá del estadio 1.02 y solo en los cotiledones. Por otro lado, como era esperado, las líneas 35S mostraron tinción en todas las fases del desarrollo vegetativo mientras que las líneas con el vector vacío no presentaron coloración en ningún tejido ni estadio del desarrollo, por lo que éstas últimas no se incluyeron en la Figura 14.

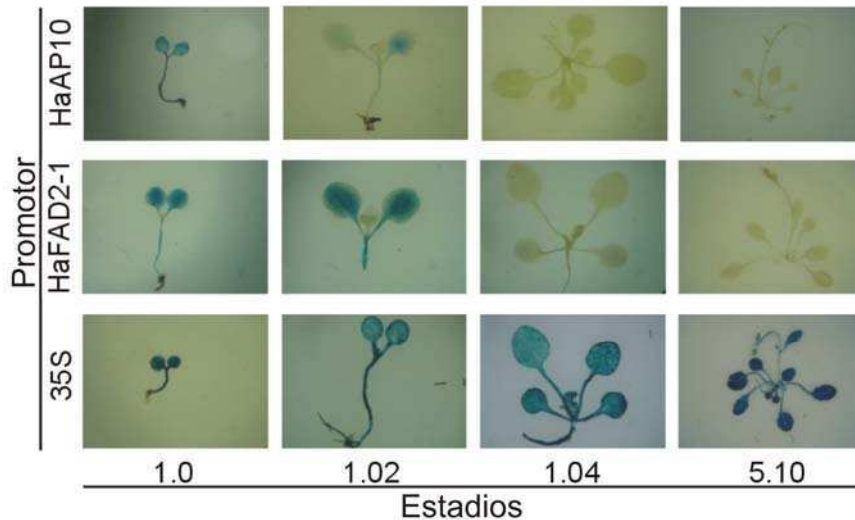


Fig 14. Patrón de expresión temporal y espacial de GUS en plantas de *Arabidopsis thaliana* portadoras de los promotores HaAP10, HaFAD2-1 y 35S. Las plantas fueron cosechadas y teñidas en los estadios 1.0, 1.02, 1.04, y 5.10 de desarrollo según Boyes y col. 2001. En la figura se muestra una línea representativa de cada construcción.

Una vez descrito el patrón de expresión en los tejidos vegetativos, se procedió a medir y comparar la actividad de los promotores en diferentes estadios de desarrollo reproductivo mediante los métodos colorimétricos y fluorométricos. La Figura 15 muestra la expresión de GUS a lo largo del desarrollo, desde embriones en estadio globular a semillas maduras. Como era esperado, la línea 35S presenta una fuerte tinción a lo largo del desarrollo, desde DPF3 a DPF13, y en toda la semilla (embrión, endosperma y tegumento). En contraste, las líneas HaAP10 y HaFAD2-1 presentan un patrón de expresión específico, con tinción de GUS solo en los estadios tardíos del desarrollo embrionario y confinado solo en el embrión. Ninguna de las tres líneas presenta tinción a los DPF15 y DPF18, probablemente debido a la incapacidad del sustrato de GUS de penetrar el tegumento de las semillas.

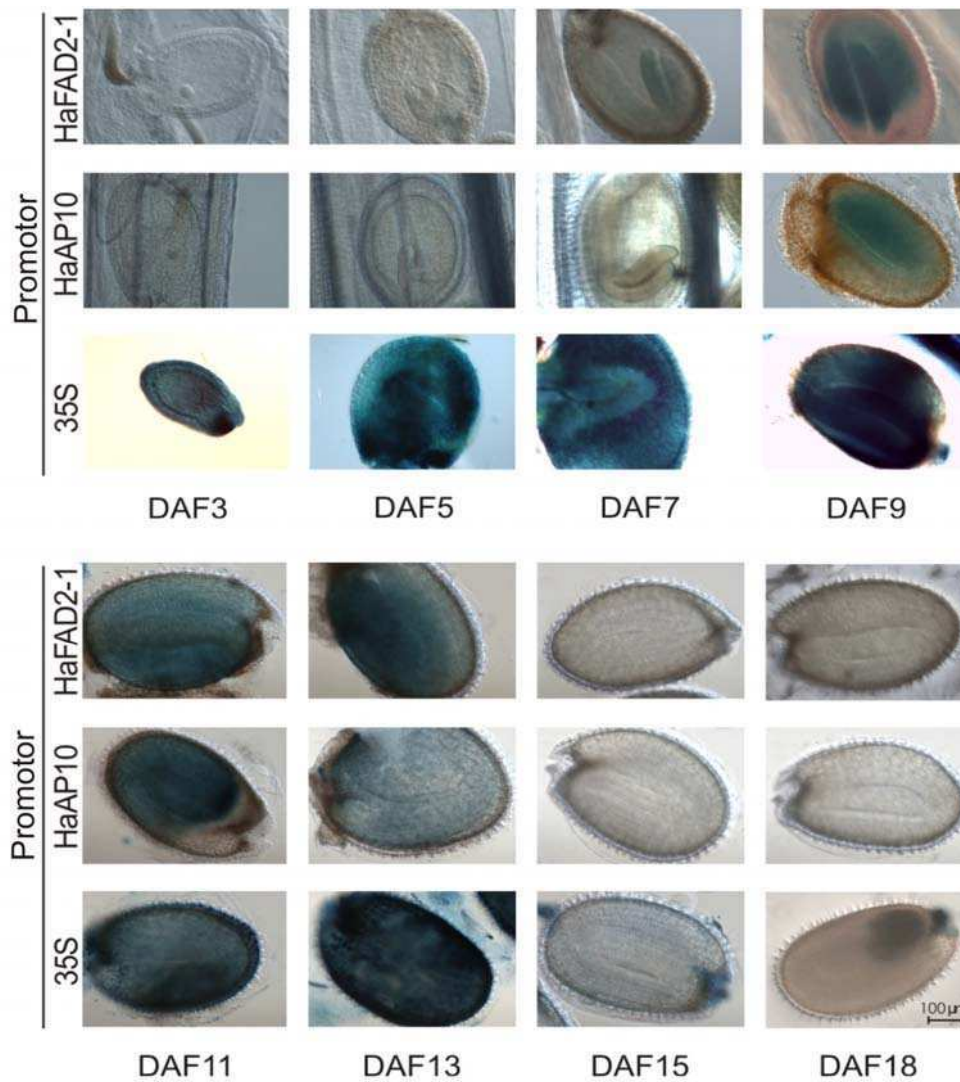


Fig 15. Localización histoquímica de la actividad de GUS al lo largo del desarrollo de semillas transgénicas de *Arabidopsis* portadoras de los promotores HaAP10, HaFAD2-1 y 35S. Las vainas fueron cosechadas a los 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 18 días post floración (DPF). Se presenta una línea representativa de cada construcción para las tinciones (HaAP10 2a, HaFAD2-1 8e y 35S 12d).

Con el fin de analizar los niveles de expresión de los promotores, se realizaron ensayos cuantitativos de MUG en dos líneas independientes por cada construcción promotor-reportero (Figura 16a).

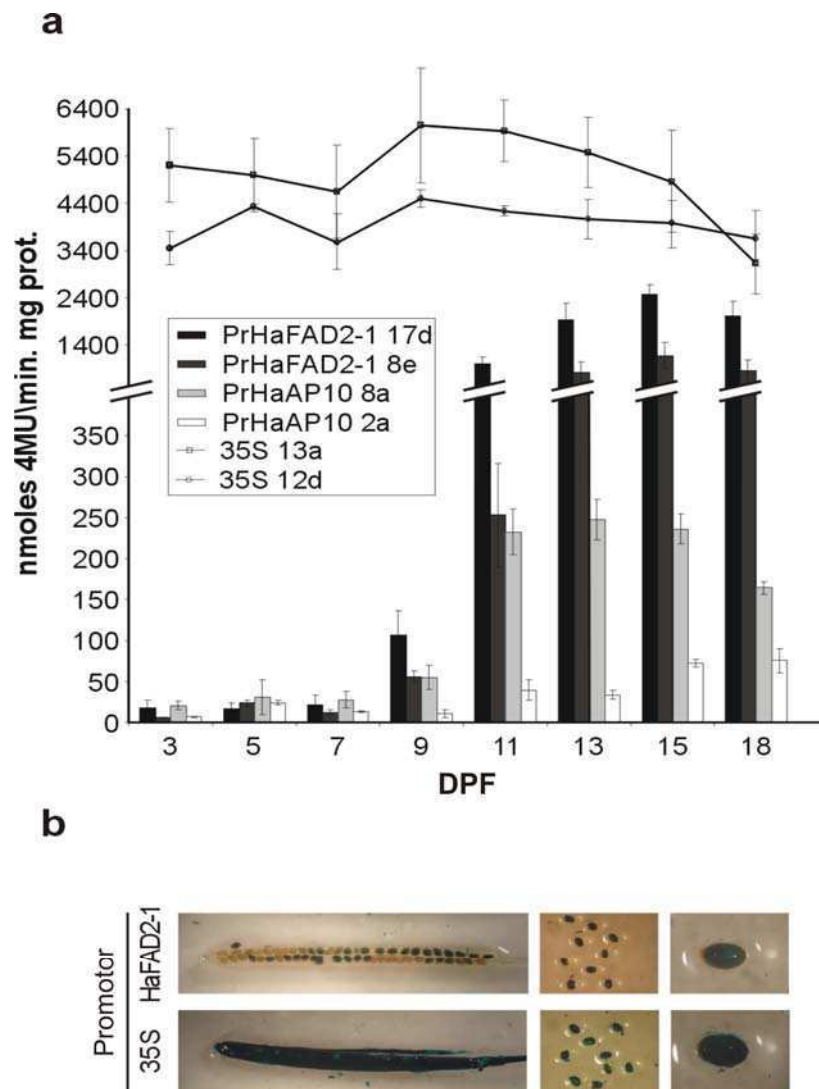


Fig 16. Patrón de expresión temporal de los promotores específicos de semilla HaAP10 y HaFAD2-1, y el promotor 35S. **(a)** La actividad de GUS fue medida en nmoles de 4-metilumbeliferona (MU) producido por minuto por mg. de proteína. Tres replicas biológicas en dos líneas independientes para cada construcción fueron utilizadas para los valores de GUS con sus errores estándar. Los gráficos de barras representan a los promotores específicos de semilla. Los gráficos de líneas representan al promotor 35S. **(b)** Comparación de la expresión espacial entre el promotor HaFAD2-1 y 35S en vainas de *Arabidopsis* transgénicas.

Al igual que para el ensayo colorimétrico, las muestras se tomaron a lo largo del desarrollo embrionario (DPF3-DPF18). Los promotores HaAP10 y HaFAD2-1 muestran un aumento de la actividad de GUS durante el desarrollo embrionario ($p < 0,01$). Asimismo, la actividad de GUS en las dos líneas independientes del promotor HaFAD2-1 fue considerablemente mayor que las de las líneas del promotor HaAP10, llegando a valores 25 veces mayores entre los estadios DPF11 y DPF18 para las líneas 17d y 2a ($p < 0,05$, Tabla 4). A su vez, se observó un aumento significativo en la

actividad de GUS entre los DPF7 y DPF13 para los dos promotores (Tabla 5). Estos estadios coinciden con la transición entre el fin de la morfogénesis del embrión y el inicio de la fase de maduración de la semilla.

	DPF			
	11	13	15	18
FAD2-1 17d vs FAD2-1 8e	0.32	0.49	0.44	0.44
FAD2-1 17d vs AP10 2a	0.04*	0.04*	0.03*	0.03*
FAD2-1 17d vs AP10 8a	0.28	0.17	0.15	0.15
FAD2-1 8e vs AP10 2a	0.28	0.17	0.17	0.17
FAD2-1 8e vs AP10 8a	0.94	0.49	0.49	0.49
AP10 8a vs AP10 2a	0.32	0.49	0.49	0.49

Tabla 4. comparación de a pares entre las líneas de los promotores dentro de días post floración (DPF). (prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

	Líneas de los promotores			
	FAD2-1 17d	FAD2-1 8e	AP10 8a	AP10 2a
DAF7 vs DAF9	0.3	0.69	0.49	0.86
DAF7 vs DAF11	0.12	0.00081*	0.03*	0.0022*
DAF7 vs DAF13	0.02*	0.02*	0.01*	0.12
DAF9 vs DAF11	0.6	0.0032*	0.13	0.0012*
DAF9 vs DAF13	0.17	0.06	0.05	0.08
DAF11 vs DAF13	0.39	0.3	0.64	0.13

Tabla 5. comparación de a pares entre días post floración (DPF) dentro de líneas de los promotores. (prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

Las líneas transgénicas portadoras de la construcción 35S muestran una actividad fluorométrica uniforme a lo largo de todo el desarrollo de la semilla, incluyendo los estadios DPF15 y DPF18, confirmando la incapacidad del sustrato de GUS para penetrar eficientemente el tegumento de las semillas maduras, como se sugirió previamente. (Figura 15, Figura 16a).

Al comparar los niveles de expresión entre todas las líneas transgénicas (los promotores específicos de semilla y el 35S constitutivo) dentro de cada estadio de desarrollo (DPF) se observó una actividad similar sin diferencias significativas para los DPF11 al DPF18 entre las líneas de HaFAD2-1 y las de 35S, indicando que cuando es activado, el promotor HaFAD2-1 es tan fuerte como el 35S en semillas. Este dato se puede evidenciar aun más, si se tiene en cuenta que el material con el que se realizaron los experimentos son vainas enteras. Como se observa en la figura 16b, la expresión del

promotor 35S es constitutiva y por ende la actividad observada corresponde a toda la vaina, mientras que para el caso del promotor HaFAD2-1 la actividad de GUS solo la aportó el tejido embrionario (Figura 16b) por lo que se estaría subestimando la actividad del mismo, siendo entonces ésta actividad aún mas fuerte que la actividad producida por el promotor 35S.

Caracterización espacial de los promotores en *Lactuca sativa*, especie modelo de la familia Compositae.

Luego del estudio realizado en *Arabidopsis*, se propuso analizar la expresión dirigida por las regiones promotoras en lechuga, sistema modelo de las plantas compuestas, con el fin de evaluar la actividad de estos promotores en una especie filogenéticamente relacionada al girasol.

Se realizaron cuatro ensayos de transformación genética de lechuga con las construcciones HaAP10, HaFAD2-1 y 35S. Se obtuvieron brotes de lechuga a partir de callos embriogénicos capaces de regenerar y enraizar en presencia del agente selectivo kanamicina, sólo con la construcción HaAP10. Estos brotes fueron trasladados al invernáculo para su desarrollo hasta madurez fisiológica. Cada uno de los brotes representa un evento de transformación independiente.

En la figura 17 se muestra el proceso de obtención de plantas de lechuga transgénicas a partir de callos embriogénicos en medio de selección, las plántulas que logran sobrevivir y el pasaje a invernáculo de las mismas.



Fig 17. Ensayo de transformación de lechuga. **(a)** callos transformados en medio de selección con kanamicina. **(b)** brotes resistentes surgidos de callos. **(c)** plántulas resistentes separadas de los callos en medio de enraizamiento. **(d)** plántulas con radículas en desarrollo. **(e)** plantas de lechuga transplantadas a maceta en invernáculo. **(f)** inflorescencia de una planta de lechuga transformada.

Del total de plantas transplantadas a invernáculo, 14 fueron seleccionadas para seguir su desarrollo y obtener su descendencia, las cual fue baja en términos de producción de semillas. Este efecto probablemente esté relacionado al fotoperíodo y la calidad de luz más que a un efecto de estrés generado por la transformación, selección y manipulación del cultivo *in vitro*, ya que se observaron diferencias entre plantas crecidas en distintos invernáculos. Con las semillas obtenidas se realizaron ensayos histoquímicos y fluorométricos para analizar la expresión del gen reportero. También se sembraron algunas de ellas para avanzar en una nueva generación.

A partir de ADN extraído de hojas de las plantas *T1*, se realizó un ensayo de PCR, en el que se observó que la mayoría mostraba amplificación del fragmento correspondiente al gen *uidA*, como se muestra en la figura 18. Sin embargo, las líneas 2 y 8, no mostraron este fragmento tratándose posiblemente de escapes a la selección con kanamicina.

La figura 19a muestra los niveles de expresión de este mismo gen *uidA* de las semillas de las 14 líneas *T1*. Como se observa en la figura, los niveles de expresión de cada línea son variables, probablemente debido a los distintos sitios de inserción del transgen, encontrándose diferencias de hasta un orden de magnitud (línea 4 y línea 9). En este análisis también se incluyeron las líneas 2 y 8 como controles negativos de la actividad fluorométrica.

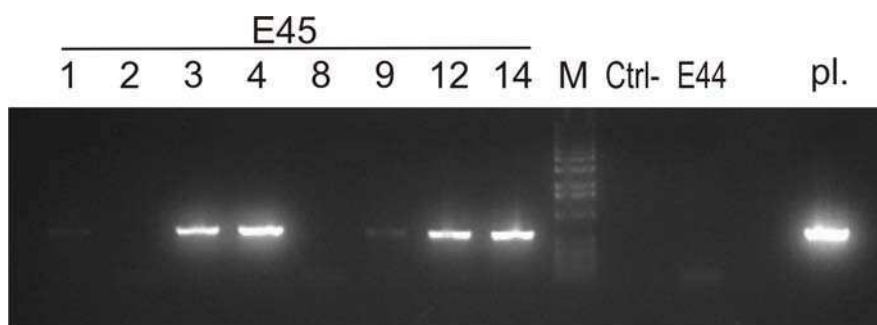


Fig 18. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de un fragmento del gen *uidA* para la detección de plantas transgénicas de lechuga. **E45:** plantas T1 portando la construcción del promotor HaAP10; **E44:** ensayo portando otra construcción sin el gen *uidA*; **Ctrl -:** planta no transformada; **PI:** vector Tgw::PrHAP10 como control positivo.

La figura 19b muestra tinción histoquímica en semillas *T1* de algunas de las líneas obtenidas. Se realizó un corte en el tegumento de las mismas con el fin de permitir la entrada del sustrato de GUS. En general, no se observa una tinción uniforme en toda la semilla, sólo en zonas alrededor de las heridas realizadas. Sin embargo esta coloración

no puede ser atribuída a la herida *per se* ya que en las líneas 2 y 8 no hay tinción visible aún cuando se realizaron las heridas (Figura 19b). Para poder visualizar mejor la tinción de las semillas, se retiró el tegumento y se decoloraron las semillas con alcohol.

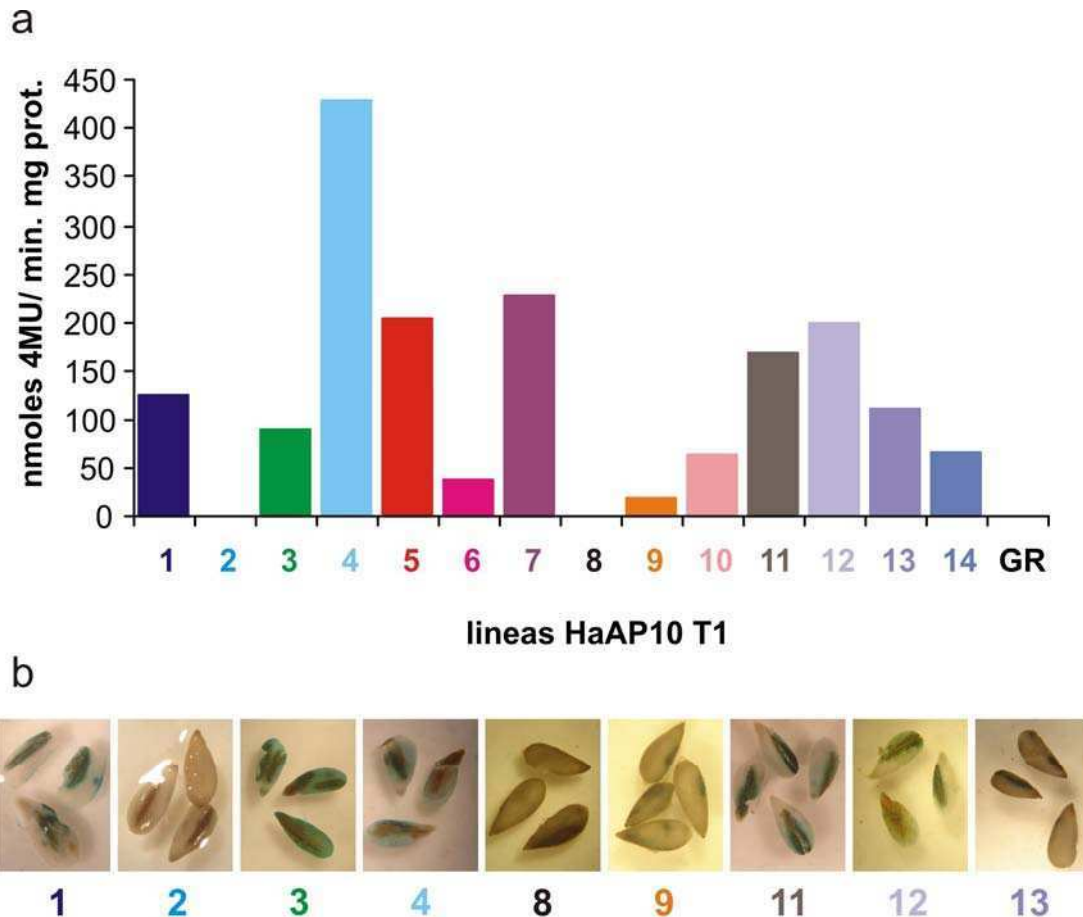


Fig 19. Patrón de expresión del promotor HaAP10 en semillas de lechuga. **(a)** actividad de GUS medida en nmoles de 4-metilumbeliferona (MU) producido por minuto por mg. de proteína de 14 líneas con la construcción HaAP10. GR corresponde a semillas de la variedad *Grand Rapid* sin transformar utilizadas como control negativo. **(b)** Localización histoquímica de la actividad de GUS de semillas transgénicas de lechuga portadoras del promotor HaAP10.

Debido a que los callos embriogénicos, obtenidos a partir de los explantos transformados con *Agrobacterium*, mantienen su capacidad de regenerar brotes en el medio selectivo por 6 a 8 meses, los brotes fueron transplantados a maceta en distintos tiempos, por lo que fue posible evaluar la generación T2 de las primeras líneas cosechadas (líneas 1, 2 y 3) dentro de este trabajo de tesis. De cada una de estas 3 líneas se sembraron cuatro semillas y luego de 7 meses de desarrollo de las plantas, se cosecharon sus semillas. Posteriormente se utilizaron 12 semillas de cada planta para el

análisis fluorométrico de la generación *T2*, tal como se muestra en el esquema de la figura 20.

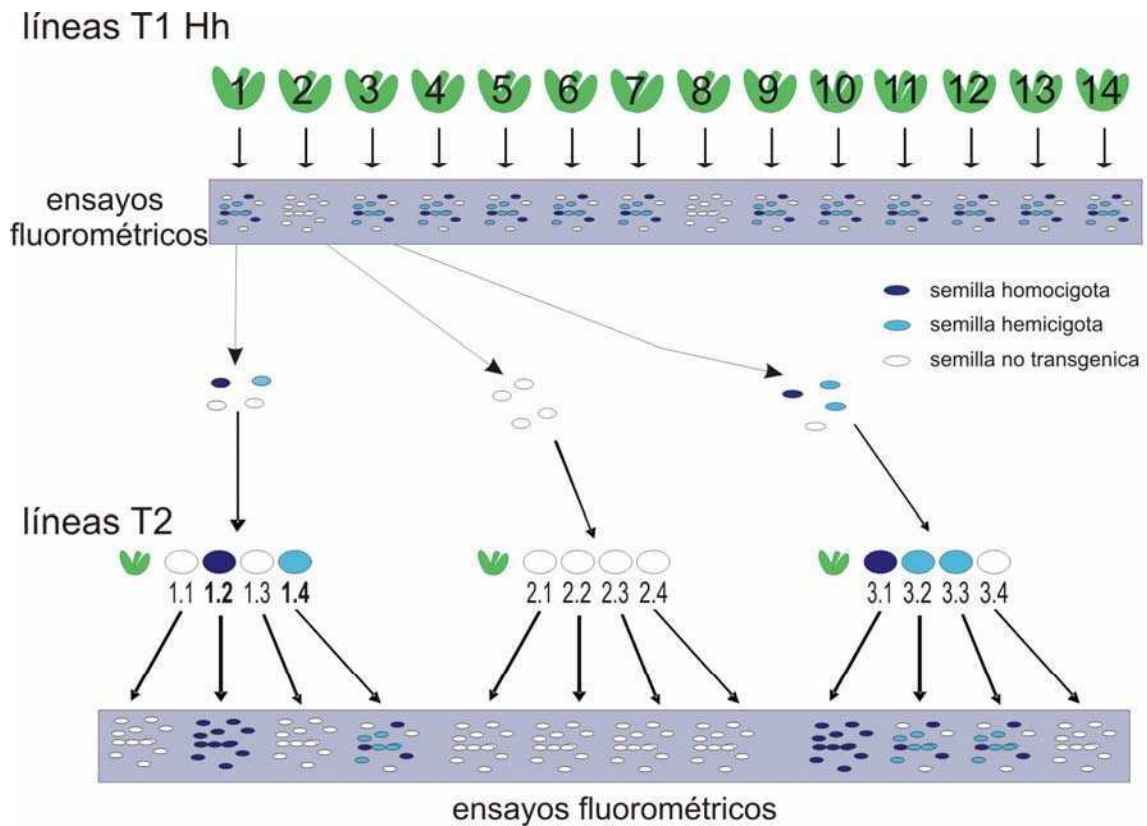
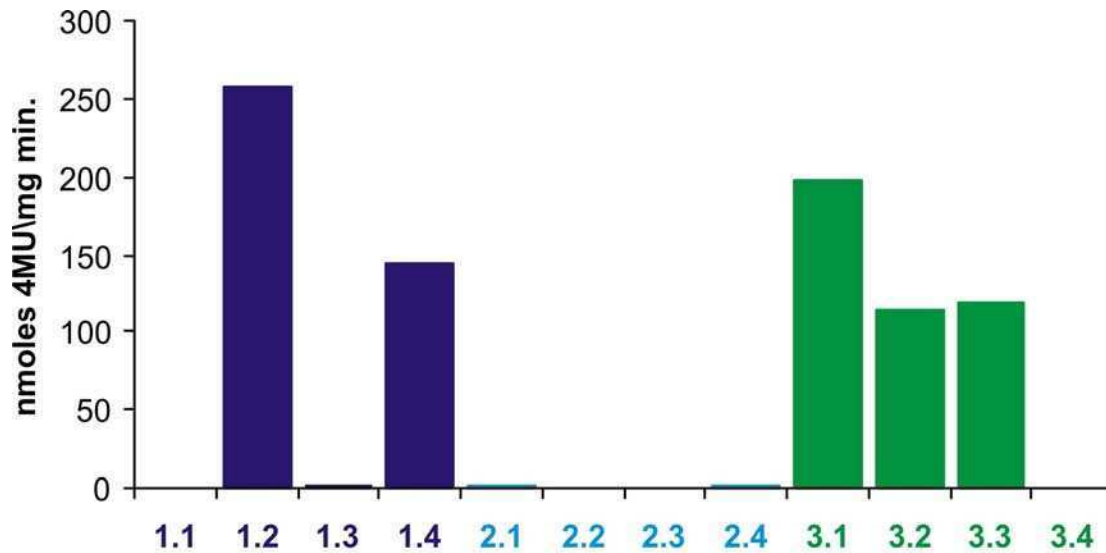


Fig 20. Esquema de obtención de muestras para los ensayos fluorométricos en semillas de lechuga. Los ensayos fluorométricos en el panel superior corresponden a los de la figura 19 realizados a semillas de las 14 líneas T1. Los ensayos del panel inferior corresponden a los de la figura 21 realizados a semillas de la generación T2 de las líneas 1, 2 y 3.

La figura 21 muestra los ensayos fluorométricos e histoquímicos de las semillas de la generación *T2* de las líneas 1, 2 y 3. Ninguna de las semillas de las cuatro plantas descendientes de la línea 2 presenta actividad del gen reportero, en concordancia con los ensayos de fluorometría y de PCR de la generación *T1*. Por otro lado las semillas de la generación *T2* de las líneas 1 y 3 presentan un nivel de actividad heterogéneo que correspondería a las distintas dosis génicas en plantas homocigotas (1.2 y 3.1), hemicigotas (1.4, 3.2 y 3.3) y no transgénicas (1.1, 1.3 y 3.4) para el transgén.



líneas HaAP10 T2

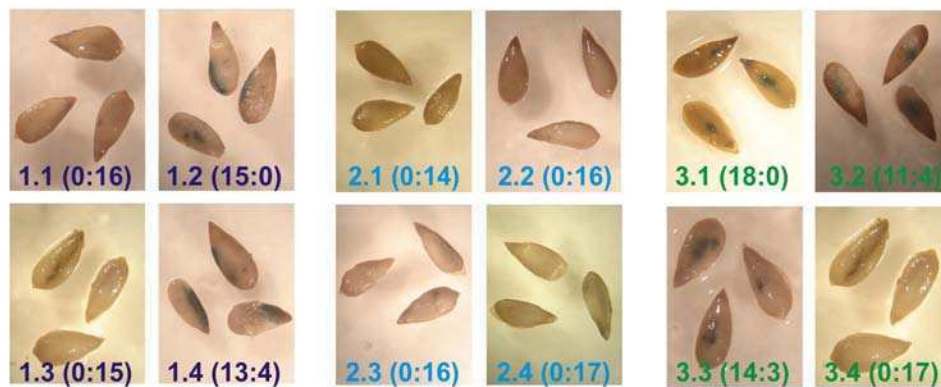


Fig 21. Patrón de expresión del promotor HaAP10 en semillas de lechuga de plantas de líneas T2. **(a)** actividad de GUS medida en nmoles de 4-metilumbeliferona (MU) producido por minuto por mg. de proteína. 10 semillas de cada línea son utilizadas para las mediciones. **(b)** Localización histoquímica de la actividad de GUS de semillas transgénicas de lechuga de las mismas líneas portadoras del promotor HaAP10. Los números entre parentesis corresponden a la proporción de semillas teñidas contra no teñidas.

Dentro de la línea 1, la actividad fluorométrica de las semillas de la planta *T1 1* es similar a la de la *T2 1.4*, mientras que la actividad de *T2 1.2* es mayor. Debido a que estas plantas son de la misma línea, y por lo tanto el transgén está en el mismo sitio de inserción, las diferencias entre las *T2 1.2* y *1.4* pueden ser atribuidas al número de copias (una o dos dependiendo si son hemicigotas u homocigotas) y a la cantidad de semillas evaluadas que posean el transgén (la planta *1.2* es homocigota y por lo tanto las 12 semillas evaluadas eran transgénicas, mientras que la planta *1.4* es hemicigota, con lo cual algunas eran no transgénicas y otras eran hemicigotas). El esquema de la figura 20 grafica este caso.

De igual manera, las semillas de las plantas *T1 3*, *T2 3.2* y *T2 3.3* tienen niveles similares de expresión (hemicigotas), mientras las de *T2 3.1* prácticamente los duplica (homocigota).

Otro hecho que sustenta la hipótesis de que las plantas *T2 1.2* y *T2 3.1* son homocigotas es que de las aproximadamente 17 semillas por planta sometidas a tinción histoquímica de GUS, todas presentaron coloración azul, mientras que las semillas de *T2 1.4*, *T2 3.2* y *T2 3.3* lo hicieron en una proporción 3:1 (Figura 21).

Discusión

Aislamiento y caracterización de genes candidatos de expresión específica en semillas de girasol.

El aislamiento y la caracterización de promotores específicos de semilla representan un paso clave en el desarrollo de proyectos biotecnológicos involucrados en la expresión de genes de interés en semillas de cultivos agrónomicamente importantes. Dependiendo del objetivo de la aplicación, los patrones de expresión, tanto temporal como espacial, son factores a tener en cuenta en la selección de promotores acordes, por lo que la correcta elección de los genes con promotores adecuados es clave, y representa el punto de partida en este tipo de proyectos.

Los genes que codifican para proteínas de reserva en semillas son los primeros candidatos abordados en la búsqueda de promotores específicos de semilla. En girasol, la proteína mayoritaria de reserva en semillas es la heliantina, una globulina de reserva (Allen y col. 1985) cuyo promotor ha sido aislado y caracterizado (Jordano y col. 1989; Nunberg y col. 1994). Sus transcritos alcanzan niveles de expresión máximos entre 12 y 15 DPF, decreciendo los mismos a medida que la semilla continúa su desarrollo, siendo indetectables en semillas maduras (Allen y col. 1985).

Debido a que la principal proteína de reserva de girasol ya ha sido ampliamente caracterizada y que a su vez posee un patrón de expresión definido, se amplió la búsqueda a proteínas de expresión específica en semilla cuya función principal no es de reserva.

Como se describió en la sección Resultados, el primer gen candidato seleccionado surgió de una colaboración con el grupo de la Dra. Laura de la Canal, de la Universidad de Mar del Plata, que aisló y caracterizó la secuencia codificante de una proteína de transferencia de lípidos (LTP) (HaAP10), que presentaba expresión únicamente en semillas secas (Regente y de la Canal 2003). Considerando este antecedente, se incluyó en la evaluación otro gen candidato (HansLTP), derivado de un banco local de ESTs, aislado de una colección de ADNc substractiva de flor temprana de girasol, desarrollada en el Instituto de Biotecnología (Fernandez y col. 2003). Dicha secuencia presentaba

similitud a una LTP de acuerdo a análisis comparativos realizados con el programa BLASTN y BLASTX contra secuencias públicas.

Por otro lado, se realizó una búsqueda bibliográfica de genes de girasol específicos de semilla, y se seleccionaron dos genes candidatos para el aislamiento de sus regiones promotoras. Si bien se identificaron otros genes de posible interés, éstos fueron descartados, ya sea porque sus promotores habían sido aislados previamente, como en el caso del gen Ha ds10 G1 (Prieto-Dapena y col. 1999), o porque eran factores de transcripción inducibles por diferentes tipos de estrés y/u hormonas (Dezar y col. 2005; Rojas y col. 2002).

Uno de los genes seleccionados (HaFAD2-1) codifica para una oleato desaturasa (Martinez-Rivas y col. 2001), y se expresa específicamente en embriones en desarrollo de girasol. En este caso, los investigadores caracterizaron el perfil de expresión del gen HaFAD2-1 a diferentes días post-floración (DPF), pudiendo determinar un patrón temporal específico de expresión durante el proceso de desarrollo y maduración de semilla.

El otro gen seleccionado a partir de la búsqueda bibliográfica codifica para una oleasina de girasol, también de expresión específica en semillas. Los ensayos de northern blot de estudios previos, revelaron expresión en embriones en desarrollo tardío y en semillas secas (Cummins y Murphy 1992).

Si bien para algunos de estos genes seleccionados, existía información previa de patrones de expresión, la misma era parcial o incompleta para confirmar expresión específica en semilla. En el trabajo de Regente y de la Canal se presenta el perfil de expresión analizado por northern blot del gen HaAP10 en una amplia variedad de tejidos, pero dicho trabajo no focaliza en el perfil temporal de expresión de semillas en desarrollo, mientras que en la publicación sobre el gen HaFAD2-1, si bien el análisis de expresión fue más abarcativo en ese aspecto, no resultó clara la toma de muestras de los embriones en desarrollo en cuanto al estadio de los mismos (Martinez-Rivas y col. 2001). Debido a estas diferencias en la toma y cantidad de muestras para la caracterización de los perfiles de expresión obtenidos en dichos trabajos, se decidió realizar un análisis más exhaustivo de los patrones de expresión, así como homogeneizar la toma de muestras. Así, se analizó un mayor número de muestras tomadas a diferentes días post-floración, a distintos tiempos del proceso de desarrollo reproductivo y de maduración de semillas..

Los ensayos realizados en este trabajo para determinar los perfiles de expresión de los 4 genes candidatos seleccionados, utilizando tanto la técnica de RT-PCR (Figura 2) como northern blot (Figura 4), arrojaron resultados similares en cuanto a los patrones de expresión para tres de los genes candidatos evaluados. A partir de estos estudios de expresión, fue posible descartar al gen HansLTP para realizar el aislamiento de su promotor, debido al bajo nivel de su expresión en semilla, que pudo ser detectado por la técnica de RT-PCR (Figura 2), pero no por northern blot (Figura 3). Es un hecho conocido que cada una de éstas técnicas tienen sus ventajas y que sus niveles de sensibilidad son diferentes, quedando expuesto en este caso que fueron complementarias en cuanto a la decisión de seleccionar los genes con promotores específicos y fuertes.

La toma de muestras para estudiar los perfiles de expresión de los 4 genes candidatos, en especial las muestras correspondientes a los estadios reproductivos y las semillas inmaduras, se realizó teniendo en consideración que el capítulo de girasol es una inflorescencia donde el desarrollo y maduración de sus flores y semillas no ocurre de forma homogénea, sino que se comienza en las flores más externas y prosigue hacia el interior del capítulo.

Para el caso de las muestras de R1 a R6 observado en la Figura 4, se tomó una sección triangular representativa del capítulo, abarcando todo el radio e incluyendo receptáculo, brácteas, flores liguladas, flores y aquenios en formación según el estadio, de manera de tener representados todos los tipos de tejido del capítulo. De igual manera, las muestras de las semillas inmaduras para los ensayos de northern blot de la Figura 5, fueron tomadas cada cinco días partiendo del estadio R5 (teniendo en cuenta que el inicio de la floración según (Scheneiter y Miller 1981) comienza en el estadio R5.1), también de una sección representativa triangular abarcando todo el radio pero incluyendo únicamente a las semillas. Este tipo de toma de muestra, involucra a semillas en distinto grado de desarrollo por lo expuesto anteriormente, de manera que a medida que pasan los días post floración, aumenta la proporción de semillas maduras en cada una de las muestras. En lo que se refiere a la toma de muestras, se evaluó la posibilidad de tomar las semillas de la circunferencia exterior del capítulo que están en el mismo grado de desarrollo, para asegurar la homogeneidad de los tejidos en evaluación. Si bien un muestreo de tejidos individuales hubiera sido más preciso, consideramos que el mismo implicaría mayores dificultades en la estandarización y establecimiento de parámetros tales como el número de hileras de aquenios que se debían tomar en cada caso.

Asimismo, en el caso de haber considerado la toma solamente de los aquenios más externos al capítulo, el número de plantas de girasol necesarias hubiera superado la capacidad del lugar disponible en el IB, destinado al ensayo. Por lo expuesto anteriormente, se realizó un muestreo más operativo, de una muestra compuesta, representada por el sector triangular del capítulo, conformada por semillas en distinto estadio de desarrollo, tomada en la misma forma a distintos días post-floración.

Los ensayos de expresión temporal mostraron que el pico de expresión del gen HaAP10 fue a los 35 DPF, concomitantemente con el periodo de acumulación de macromoléculas en la semilla de girasol (Kaushik y col. 2009; Mazhar y col. 1998). Asimismo, este patrón de expresión coincide con la movilización de lípidos de reserva, uno de los roles propuestos para las LTPs (Edqvist y Farbos 2002; Kader 1997; Kader 1996). Sin embargo, en el trabajo de Gonorazky y colaboradores, relacionado con la actividad antifúngica de HaAP10, detectan presencia de la proteína hasta 5 días post germinación en los cotiledones, y priorizan su rol como proteína antimicrobiana, en contraposición con su supuesto rol en la movilización de lípidos (Gonorazky y col. 2005). De todas formas, estos resultados no se contradicen con los presentados en este trabajo, debido a que si bien el pico máximo de expresión del transcripto fue a los 35 DPF, la expresión, acumulación y estabilidad de la proteína puede ser mucho mayor. Por otro lado, en este trabajo de tesis no se realizaron ensayos de northern blot de semillas de girasol en germinación, por lo que no se puede determinar si hay niveles de transcripto detectables a los 5 días post imbibición.

Respecto al rol propuesto para esta LTP en particular, Pagnussat y colaboradores detectaron presencia de HaAP10 tanto en la fracción extracelular, típica de las LTPs y relacionada con su rol en defensa, como también intracelularmente en estructuras no identificadas (Pagnussat y col. 2009). Esta inesperada ubicación, pocas veces reportada, podría reforzar la idea de que esta LTP tenga un rol específico en la maduración de la semilla.

Por otro lado, el gen HaFAD2-1 tuvo su máximo de expresión a los 15 DPF para luego ir decreciendo hasta el final del desarrollo de la semilla. Este patrón coincide con el que tienen las oleato desaturasas en relación a su función en la conversión de ácido oleico a linoleico durante el desarrollo embrionario de los lípidos de reserva en semillas inmaduras (Hernández y col. 2009; Li y col. 2008; Martínez-Rivas y col. 2001).

Por último, para el gen de oleosina (HaOLE), se observó el pico máximo de expresión en semillas maduras, coincidiendo con el estadio en que la mayoría de los aceites se

acumulan en este tipo de tejidos (Giannoulia y col. 2007; Huang 1992; Sarmiento y col. 1997). En realidad, los aceites de almacenamiento se depositan en estructuras llamadas cuerpos oleicos en semillas en desarrollo, aunque varía según la especie (Huang 1992). La biogénesis y ontogénesis de estos cuerpos oleicos (*oil-bodies*) ha sido, y sigue siendo, una área continua de investigación. Los primeros estudios indicaban la presencia de unas proteínas características, y posteriormente, (Huang 1992) identificó un tipo particular de proteínas que unían a *oil-bodies* y las llamó oleosinas. Estas, estabilizan la superficie del cuerpo oleico en una sincronización entre aceites y oleosinas, para luego formar los paquetes de cuerpos oleicos característicos de plantas oleaginosas. Sin embargo, Murphy y colaboradores, sugieren que los aceites se acumulan en el citoplasma, y solo se asocian a las oleosinas en estadios tardíos de la maduración de las semillas (Murphy 1993).

Estas diferencias temporales de expresión en estos genes de semilla, pueden resultar de gran interés si se contempla la posibilidad de utilizar las regiones reguladoras que se aislen de estos genes, para sus posibles usos como herramientas biotecnológicas.

Aislamiento y caracterización funcional de promotores específicos de semilla.

En trabajos previos se describió una región 5' UTR inusualmente larga en los genes FAD2 aislados de plantas tan diversas como *Arabidopsis* (Okuley y col. 1994), algodón (Liu y col. 2001), girasol (Schuppert y col. 2006) o sésamo (Kim y col. 2006). En este último trabajo en sésamo se caracterizó el promotor SeFAD2-1 y se encontraron varios elementos regulatorios que aumentaban la expresión del gen en su región 5' UTR.. Sin embargo, este incremento en los niveles de expresión fue observado no sólo en las semillas sino también en plántulas y otros tejidos, como vainas, hojas y raíces, indicando que la presencia del 5' UTR conllevó una disminución en la especificidad de tejido. En ensayos de deleciones se observó que la ausencia de esta región producía la recuperación de la especificidad de tejido en la semilla. Es por ello, que restringimos nuestro estudio a la región promotora de 867pb de HaFAD2-1 aislado inicialmente, sin buscar obtener una secuencia de mayor longitud para mantener la especificidad de tejido.

Luego de evaluar diversas técnicas para el aislamiento de los promotores seleccionados, se concluyó que la estrategia de caminado cromosómico utilizando el kit Genome Walker, fue la más adecuada en términos de rapidez y sencillez. En este trabajo de Tesis fue posible aislar 3 posibles regiones reguladoras de los genes específicos de semilla. Se asilaron, clonaron y secuenciaron fragmentos de 964pb, 867pb y 1838pb río arriba de los sitios de inicio de HaAP10, HaFAD2-1 y HaOLE respectivamente. Los análisis bioinformáticos permitieron detectar en todos los casos, elementos frecuentes de promotores como TATA y CCAT *Box*. Asimismo, se identificaron numerosos activadores de la transcripción (CACT) (Forde y col. 1985), localizados principalmente en la zonas más alejadas al codón de inicio de la transcripción, lo cual indicaría la importancia de tener secuencias de considerable tamaño para poder ser utilizadas como promotores funcionales.

Por otro lado, los análisis bioinformáticos también arrojaron la presencia de varios motivos involucrados en la activación transcripcional específica de semilla. Entre los motivos identificados se destacan los siguientes: *GCN4-Motif*, elementos (*AACA*) y (*ACTG*), *Prolamine-Box* (Muller y Knudsen 1993; Wu y col. 2000; Yoshihara y col. 1996), *E-Boxes* (Stalberg y col. 1996), *G-Boxes* (Hudson y Quail 2003; Menkens y col. 1995), *SEF binding sites* (Allen y col. 1989), *Sh1 Box* (D'Aoust y col. 1999) y elementos *RY/G* repetidos (Baumlein y col. 1992). Estos motivos han sido identificados como característicos de genes expresados en semillas en distintos trabajos. Los motivos *GCN4*, (*AACA*), (*ACTG*) y *Prolamine-Box* fueron identificados frecuentemente en promotores de genes SSPs en monocotiledóneas a los cuales se unen factores de transcripción de la familia bZIP, DOF y MYB (Vicente-Carbajosa y Carbonero 2005).

En el trabajo de Chandrasekharan y colaboradores se realizaron mutaciones en motivos ampliamente descriptos en dicotiledóneas como los elementos *RY*, *E-Boxes* y *G-Boxes*, demostrando su participación en los niveles de expresión en embriones (Chandrasekharan y col. 2003).

Fauteux y Stromvik realizaron análisis comparativos de 54 promotores de genes SSPs representando tres familias de plantas (Gramíneas, Brasicáceas, y Leguminosas), en los cuales encontraron numerosos motivos conservados en las tres familias. A su vez, encontraron motivos distintivos para cada familia, en posiciones altamente conservadas (Fauteux y Stromvik 2009). Si bien el girasol pertenece a la familia de las Asteráceas, podemos encontrar la mayoría de estos motivos, incluyendo posiciones conservadas,

dentro de nuestros promotores, concluyendo que los motivos específicos de semillas están altamente conservados en distintas especies.

Cabe destacar, que otros motivos de respuesta a hormonas también fueron identificados, entre ellos elementos ABRE (*ABA response element*), GARE (*GA response element*) y *Pyrimidine-Box* (Cercos y col. 1999; Kim y col. 1997; Morita y col. 1998; Ogawa y col. 2003). En todos los casos, estos motivos están relacionados con el desarrollo del embrión y de la semilla por lo que serían importantes en la especificidad de tejido, a pesar de que en este trabajo no han sido evaluadas las respuestas a hormonas.

Basándose en los motivos específicos de semilla y en los elementos de respuesta a hormonas identificados en los análisis bioinformáticos, las secuencias aisladas fueron seleccionadas como candidatos para ensayos de expresión de genes reporteros a semilla.

Caracterización de expresión espacial y temporal de los promotores en el sistema modelo *Arabidopsis thaliana*.

En este trabajo se realizó la caracterización funcional de los promotores HaAP10 y HaFAD2 que será discutida en esta sección y se avanzó en la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis* homocigotas para el promotor HaOLE.

Luego de probar la funcionalidad de las secuencias aisladas mediante ensayos de expresión transitoria en hojas de cebolla y de *Nicotiana benthamiana* (Figuras 11 y 13), se realizó la caracterización biológica de los promotores en el sistema de *Arabidopsis thaliana*. Esta especie es frecuentemente utilizada como modelo ya que presenta grandes ventajas como: su tamaño pequeño, crecimiento rápido, fácil de transformar, genoma completamente secuenciado, por lo que ha sido ampliamente utilizada en estudios de genómica funcional.

En primer lugar, se realizaron ensayos colorimétricos mediante la técnica histoquímica de GUS en tejidos vegetativos de plantas transgénicas para las construcciones con los promotores. No se observó actividad de GUS en ningún tejido vegetativo en coincidencia con los patrones de expresión realizados en girasol, exceptuando los cotiledones de plántula (1.02) en los cuales se detectó actividad de la proteína reportera. Sin embargo, esta baja actividad de GUS observada puede ser consecuencia de la

presencia de la proteína β -glucuronidasa residual de las semillas, y no debida a la transcripción de ARNm *de novo*. Estos ensayos fueron confirmados mediante la técnica fluorométrica de MUG, con idénticos resultados.

Una vez confirmada, la falta de expresión en tejidos vegetativos dirigida por los promotores, se decidió realizar los experimentos en los tejidos reproductivos. Al igual que en girasol, el diseño experimental en cuanto a la toma de muestras, fue clave para determinar un patrón de expresión fiable. Atendiendo a que es sabido que el desarrollo reproductivo de *Arabidopsis* es más corto que el de girasol, la toma de muestras para las semillas inmaduras se realizó cada dos días y no cada cinco, resultando en ocho muestras a lo largo de dieciocho días. Además del rápido crecimiento, otra ventaja del sistema de *Arabidopsis* (además del rápido crecimiento mencionado anteriormente) es la posibilidad de observar los distintos estadios del desarrollo embrionario dentro de la semilla. Esto se pudo lograr mediante la técnica de clarificación de las vainas y semillas, puesta a punto en este trabajo, utilizando un microscopio DIC (*Differential interference contrast*). De esta manera, se logró identificar de manera precisa aquellos tejidos que presentaron expresión del gen reportero dentro de la semilla (Figura 15).

Las líneas transgénicas portadoras del promotor viral 35S mostraron una alta intensidad de tinción en todos los tejidos (embrión, endosperma y tegumento) a lo largo de todo el desarrollo, tal como era de esperar para un promotor constitutivo. En contraste, las líneas HaFAD2-1 y HaAP10 revelaron un patrón de expresión específico, solo en estadios tardíos del desarrollo, confinado en tejido embrionario.

Sin embargo, tal como se describió en la sección de Resultados, ninguna de las tres líneas presentó coloración en los estadios DPF15 y DPF18, probablemente debido a la incapacidad del sustrato de GUS de penetrar el tegumento de las semillas. Con la finalidad de confirmar esta imposibilidad, se realizaron diversos protocolos que incluyeron desde tratamientos químicos con ácido clorhídrico hasta tratamientos mecánicos con esferas de vidrio para lograr la ruptura del tegumento. Se lograron resultados parciales ya que en algunos casos se obtuvo coloración azul pero a costa del rompimiento de las semillas. Para poder estandarizar los resultados de los estadios DPF15 y DPF18 se realizaron ensayos fluorométricos en los cuales se realizó el machacado total de las semillas, para homogenizar las comparaciones.

En los ensayos fluorométricos, en los cuales se realizó el mismo muestreo que para los ensayos histoquímicos, se utilizaron dos líneas independientes para cada construcción. Como se observa en la Figura 16, la actividad de las líneas transgénicas conteniendo

construcciones del promotor HaFAD2-1 fue significativamente mayor que la actividad de las líneas del promotor HaAP10. Más allá de la mayor expresión dirigida por HaFAD2-1, este agrupamiento entre líneas del mismo promotor en cuanto a actividad, descarta la posibilidad de un efecto de posicionamiento en la inserción de los transgenes.

Debido a que la mayor diferencia entre los dos promotores es la presencia del motivo GCN4, presente en HaFAD2-1 y no en HaAP10, podría considerarse este motivo como la principal causa de estas diferencias en los niveles de expresión, y un motivo clave en la actividad transcripcional del promotor en semillas (Muller y Knudsen 1993; Wu y col. 2000; Yoshihara y col. 1996).

Comparando los niveles de expresión entre todos los promotores, se observó una actividad similar entre los promotores HaFAD2-1 y 35S para los estadios finales del proceso de maduración, indicando que el promotor específico de semilla HaFAD2-1 es tan fuerte como el promotor constitutivo 35S. Este dato se puede evidenciar aun más, si se tiene en cuenta que el material con el que se realizaron los experimentos son vainas enteras y tal como se observa en la Figura 16b, la expresión observada del promotor 35S corresponde a las semillas más el tejido que forma la vaina, mientras que para el caso del promotor HaFAD2-1 la actividad de GUS sólo la aportó el tejido embrionario (Figura 16b), por lo que se estaría subestimando su actividad real, siendo por lo tanto un promotor más fuerte que el 35S.

En este sentido, se evaluó el efecto de limitar la toma de muestras únicamente a las semillas para estudiar los patrones de expresión en esta etapa final de la maduración. Esta posibilidad se descartó debido a la dificultad técnica que implica la separación de las semillas inmaduras de sus vainas en los estadios tempranos. De todas maneras, dicha comparación no hubiera sido del todo precisa ya que las líneas 35S, aún despojadas de la vaina, todavía aportarían actividad enzimática de los otros tejidos que componen la semilla, como el tegumento y en menor medida el endosperma.

Por otro lado, se observó, por parte de los dos promotores específicos, un aumento significativo de la actividad entre los estadios DPF7 y DFP13. Este aumento coincide con la transición entre la fase de morfogénesis del embrión, que va desde el estadio globular a torpedo (en la que se determina la estructura básica de la planta), y la fase de maduración en la que la semilla empieza a acumular macromoléculas, incluyendo proteínas, lípidos y almidón (Bradford y Nonogaki 2007). Se puede concluir entonces, que los patrones de expresión derivados de los promotores HaFAD2-1 y HaAP10 en las

plantas de *Arabidopsis* transgénicas, son similares a los reportados por genes del tipo SSPs (Fujiwara y col. 2002).

Las diferencias en los patrones de expresión temporales entre los dos genes HaFAD2-1 y HaAP10 encontradas en girasol (Figura 5), no fueron detectadas en las plantas de *Arabidopsis* transformadas con estos promotores, utilizando el gen reportero GUS. Estos resultados sugieren que ciertos motivos responsables del patrón de expresión temporal particular observado en girasol no se encuentran presentes en las secuencias promotoras aisladas, o que no pueden ser reconocidos por los factores de transcripción presentes en las semillas de *Arabidopsis*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo revelaron que los promotores HaFAD2-1 y HaAP10 son específicamente activos en embriones en desarrollo, con niveles de expresión elevados, particularmente el HaFAD2-1, llegando a niveles similares al 35S. Estos promotores representan potenciales herramientas biotecnológicas para la modificación de semillas en plantas de interés agronómico.

Caracterización espacial de los promotores en *Lactuca sativa*, especie modelo de la familia Compositae.

Además del estudio realizado en *Arabidopsis*, se propuso analizar la expresión dirigida por las regiones promotoras en lechuga (*Lactuca sativa*), sistema modelo de las plantas compuestas, con el fin de evaluar la actividad de estos promotores en una especie filogenéticamente relacionada al girasol.

La transformación genética de lechuga se realiza rutinariamente en numerosos laboratorios del mundo {Davey, 2007 #327}, no solo para obtener plantas de lechuga con mejoras para su producción sino que existen numerosas publicaciones donde se propone su utilización para la producción de diferentes moléculas, constituyendo un buen ejemplo de plantas transgénicas de segunda o tercera generación. Entre estas propuestas se encuentra la utilización de lechuga como sistema de expresión de miraculina, una proteína modificadora del sabor, que es una alternativa natural a los edulcorantes artificiales {Hyeon-Jin Sun, 2006 #328}. También se describió su uso como plataforma para la producción de inmunógenos que serían utilizados como vacunas de origen vegetal para prevenir enfermedades provocadas por bacterias como la

neumonía y peste bubónica {Rosales-Mendoza, 2010 #329} o por virus como el sarampión {Webster, 2006 #330}.

En concordancia con estos antecedentes, en nuestro grupo de trabajo, previamente, se puso a punto el sistema de transformación, selección y regeneración de plantas transgénicas de lechuga. variedad Grand Rapids {Radonic, 2010 #291}.

Sin embargo, a pesar de lo mencionado en los párrafos precedentes, la transformación de lechuga no se puede comparar a las ventajas que presenta la transformación de *Arabidopsis*. Uno de los puntos fundamentales es que la obtención de brotes regenerados, luego de la transformación de los explantos de lechuga, se comienza a producir a partir del 7mo mes, realizando pasajes de callos cada 20 días en frascos con medio selectivo de regeneración, como ya se mencionó en Resultados. Además, las plantas T0 pasadas al invernáculo necesitan unos 5 meses para que se desarrollen todas las inflorescencias y producir semillas maduras. De esta manera, se necesita mucho más tiempo y espacio que en los ensayos de transformación de *Arabidopsis*, método que se realiza por inmersión floral y que en aproximadamente 3 meses se obtienen plantas con semillas. Por estas razones, la cantidad de ensayos de transformación realizados en lechuga no pudo ser tan elevada como en el sistema de *Arabidopsis*.

Se realizaron 4 ensayos de transformación y se obtuvieron brotes regenerantes en el agente selectivo kanamicina solo a partir de la construcción HaAP10.

Como se mencionó en Resultados, 14 plantas pasadas a invernáculo completaron su desarrollo. La cantidad de semillas producidas en cada planta fue muy baja, siendo en algunos casos de unas pocas semillas. Esto puede ser atribuido a la época del año en las que se pasaron las plántulas al invernáculo, que no cuenta con lámparas de sodio sino con luz artificial común. De hecho, las plantas T2 surgidas de sembrar directamente semillas en macetas, en otro invernáculo y otra época del año, produjeron una gran cantidad de semillas viables.

Por otro lado, de las 14 plantas mencionadas, solo dos resultaron ser escapes a la selección. Esto fue confirmado por PCR (Figura 18), y por los ensayos fluorométricos e histoquímicos (Figura 19).

Se analizaron los niveles de expresión de las semillas de plantas T1 y T2 de lechugas transgénicas para la construcción de promotor HaAP10, pudiéndose determinar que plantas eran homocigotas, hemicigotas y no transgénicas mediante ensayos fluorométricos e histoquímicos del gen reportero. Las semillas que resultaron

homocigotas serán plantadas para poder realizar ensayos similares a los hechos en *Arabidopsis*.

En cuanto a la tinción histoquímica, se observaron las mismas dificultades que con las semillas maduras de *Arabidopsis*. La barrera que genera el tegumento de las semillas a la entrada del sustrato de GUS resultó ser un problema a la hora de visualizar la tinción. Si bien, como se mencionó anteriormente, se realizaron distintas pruebas con las semillas de *Arabidopsis* (ruptura mecánica y tratamiento con ácido clorhídrico), la optimización de un método eficiente de tinción, que no comprometa la estructura de las semillas, constituye un punto importante a superar en futuros experimentos.

Cabe destacar que los niveles de expresión alcanzados en las semillas de lechuga de las líneas HaAP10 en los ensayos fluorométricos son similares a los obtenidos con las semillas de *Arabidopsis* para el mismo promotor. Si bien se podría esperar un aumento en la expresión por tratarse de una planta filogenéticamente emparentada al girasol (familia *Compositae*), el hecho de que no haya ocurrido se puede deber a múltiples causas, entre las cuales podemos mencionar que los motivos del promotor HaAP10 sean reconocidos por FT presentes en ambas especies y por ello no se encontraron diferencias significativas en la expresión. Otra explicación a los niveles similares de expresión, pueda deberse a que al no ser el promotor completo, falten elementos reguladores fundamentales para alcanzar los niveles máximos de expresión. Por otro lado, también es posible que los niveles de expresión alcanzados sean los máximos para dicho promotor.

Los niveles de expresión alcanzados en semilla de lechuga, así como el patrón de expresión dirigido por el promotor HaAP10, señala que este elemento sería un excelente candidato para dirigir la expresión de genes de interés en especies de importancia agronómica.

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo son:

- Los genes HaAP10, HaFAD2-1 y HaOLE fueron seleccionados como candidatos para el aislamiento de sus regiones promotoras atendiendo a los patrones de expresión espacial y temporal específicos de semillas de girasol.
- Los tres genes candidatos presentaron diferencias temporales en los picos de expresión durante el desarrollo embrionario.
- El gen HansLTP, considerado en primera instancia como un buen candidato, fue descartado para el aislamiento de su promotor debido a su baja expresión en semillas.
- La técnica de caminado cromosómico resultó de gran utilidad en el aislamiento de los promotores en cuanto a su rapidez y sencillez, en contraste con la búsqueda de genes candidatos mediante la genoteca de girasol en BACs.
- Los análisis bioinformáticos de las tres secuencias promotoras arrojaron un alto número de elementos reguladores involucrados en el desarrollo embrionario y de semilla, incluyendo algunos descriptos como esenciales en la especificidad de semilla.
- Los promotores HaFAD2-1 y HaAP10 no presentaron actividad del gen reportero en tejidos vegetativos de plantas transgénicas de *Arabidopsis*.
- Los promotores HaFAD2-1 y HaAP10 son específicamente activos en embriones en desarrollo, con niveles de expresión elevados, particularmente el HaFAD2-1, llegando a niveles similares al promotor constitutivo 35S.

- Se lograron obtener plantas transgénicas de lechuga expresando el promotor HaAP10 específicamente en semillas con niveles similares a lo de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* para el mismo promotor.

Los niveles de expresión alcanzados en semilla, así como el patrón temporal de expresión dirigido por los promotores caracterizados en este trabajo, señala a estos elementos como herramientas claves para su futura aplicación en mejoramiento de aspectos de calidad, dirigiendo la expresión de genes candidatos claves, en especies agronómicamente importantes.

Lic. Diego Zavallo
Doctorando

Dra. Ruth Heinz
Director

Dra. Marisa Lopez Bilbao
Director Asistente

Referencias

Agius F, Amaya I, Botella MA, Valpuesta V (2005) Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression. *J Exp Bot* 56:37-46

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410

Allen RD, Bernier F, Lessard PA, Beachy RN (1989) Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer. *Plant Cell* 1:623-631

Allen RD, Nessler CL, Thomas TL (1985) Developmental expression of sunflower 11S storage protein genes. *Plant Molecular Biology* 5:165-173

Baumlein H, Nagy I, Villarroel R, Inze D, Wobus U (1992) Cis-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. *Plant J* 2:233-239

Bernard P, Couturier M (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226:735-745

Boothe J, Nykiforuk C, Shen Y, Zaplachinski S, Szarka S, Kuhlman P, Murray E, Morck D, Moloney MM (2010) Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnol J* 8:588-606

Boothe JG, Saponja JA, Parmenter DL (1997) Molecular farming in plants: Oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drug Development Research* 42:172-181

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Grolach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13:1499-1510

Bradford KJ, Nonogaki H (2007) Seed Development, Dormancy and Germination. *Annual Plant Reviews* 27:

Bustos MM, Gultinan MJ, Jordano J, Begum D, Kalkan FA, Hall TC (1989) Regulation of beta-glucuronidase expression in transgenic tobacco plants by an A/T-rich, cis-acting sequence found upstream of a French bean beta-phaseolin gene. *Plant Cell* 1:839-853

- Cabrera-Ponce J, Vegas-García A, Herrera-Estrella L (1995) Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Rep* 15:1-7
- Cercos M, Gomez-Cadenas A, Ho T-HD (1999) Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. *The Plant Journal* 19:107-118
- Clough S, Bent A (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735–743
- Cummins I, Murphy DJ (1992) cDNA sequence of a sunflower oleosin and transcript tissue specificity. *Plant Mol Biol* 19:873-876
- Curtis I, Power J, Blackhall N, de Laat A, Davey R (1994) Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Experimental Botany* 45:1441-1449
- Chamberland S, Daigle N, Bernier F (1992) The legumin boxes and the 3' part of a soybean beta-conglycinin promoter are involved in seed gene expression in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* 19:937-949
- Chandrasekharan MB, Bishop KJ, Hall TC (2003) Module-specific regulation of the beta-phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J* 33:853-866
- Chung K-J, Hwang S-K, Hahn B-S, Kim K-H, Kim J-B, Kim Y-H, Yang J-S, Ha S-H (2008) Authentic seed-specific activity of the *Perilla* oleosin 19 gene promoter in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 27:29–37
- D'Aoust M-A, Nguyen-Quoc B, Le V-Q, Yelle S (1999) Upstream regulatory regions from the maize *Sh1* promoter confer tissue specific expression of the *b*-glucuronidase gene in tomato. *Plant Cell Rep* 18:803-808
- Davey M, McCabe M, Mohapatra U, Power J, Khachatourians G, McHughen A, Scorza R, Nip W, Hui Y (2002) Genetic manipulation of lettuce. *Transgenic Plants and Crops* 613:
- De Jaeger G, Scheffer S, Jacobs A, Zambre M, Zobell O, Goossens A, Depicker A, Angenon G (2002) Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotechnol* 20:1265-1268
- Dezar CA, Gago GM, Gonzalez DH, Chan RL (2005) *Hahb-4*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Res* 14:429-440

- Edqvist J, Farbos I (2002) Characterization of germination-specific lipid transfer proteins from *Euphorbia lagascae*. *Planta* 215:41-50
- Ellerstrom M, Stalberg K, Ezcurra I, Rask L (1996) Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Mol Biol* 32:1019-1027
- Fauteux F, Stromvik MV (2009) Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in Brassicaceae, Fabaceae and Poaceae. *BMC Plant Biol* 9:126
- Fernandez P, Di Rienzo J, Dosio GAA, Aguirrezábal LAN, Hopp HE, Paniego N, Heinz RA (2010) Sunflower cytological characterization by in situ hybridization using homologous rDNA sequences and a BAC clone containing highly represented repetitive retrotransposon like sequences. *Plant Cell Reports*
- Fernandez P, Di Rienzo J, Fernandez L, Hopp H, Paniego N, Heinz R (2008) Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. *BMC plant biology* 8:11
- Fernandez P, Di Rienzo J, Moschen S, Dosio G, Aguirrezábal L, Hopp H, Paniego N, Heinz R (2011) Comparison of predictive methods and biological validation for qPCR reference genes in sunflower leaf senescence transcript analysis. *Plant cell reports* 1-12
- Fernandez P, Paniego N, Lew S, Hopp HE, Heinz RA (2003) Differential representation of sunflower ESTs in enriched organ-specific cDNA libraries in a small scale sequencing project. *BMC Genomics* 4:40
- Fiedler U, Phillips J, Artsaenko O, Conrad U (1997) Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* 3:205-216
- Forde BG, Heyworth A, Pywell J, Kreis M (1985) Nucleotide sequence of a B1 hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize. *Nucleic Acids Res* 13:7327-7339
- Fujiwara T, Nambarab E, Yamagishi K, D.B. G, Naitoc S (2002) *The Arabidopsis Book: Storage Proteins*. American Society of Plant Biologists
- Fusari C, Lia V, Nishinakamasu V, Zubrzycki J, Puebla A, Maligne A, Hopp H, Heinz R, Paniego N (2010) Single nucleotide polymorphism genotyping by heteroduplex analysis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Breeding* 1-17
- Fusari CM, Lia VV, Hopp HE, Heinz RA, Paniego NB (2008) Identification of single nucleotide polymorphisms and analysis of linkage disequilibrium in sunflower elite inbred lines using the candidate gene approach. *BMC Plant Biol* 8:7
- Giannoulia K, Banilas G, Hatzopoulos P (2007) Oleosin gene expression in olive. *J Plant Physiol* 164:104-107

- Gonorazky AG, Regente MC, de la Canal L (2005) Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *J Plant Physiol* 162:618-624
- Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* 17:282 - 286
- Graff GD, Zilberman D, Bennett AB (2009) The contraction of agbiotech product quality innovation. *Nat Biotech* 27:702-704
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10:1788-1795
- Hernández ML, Padilla MN, Mancha M, Martnez-Rivas JM (2009) Expression Analysis Identifies FAD2-2 as the Olive Oleate Desaturase Gene Mainly Responsible for the Linoleic Acid Content in Virgin Olive Oil. *J Agric Food Chem* 57:6199-6206
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* 27:297-300
- Horvath H, Huang J, Wong O, Kohl E, Okita T, Kannangara CG, von Wettstein D (2000) The production of recombinant proteins in transgenic barley grains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1914-1919
- Huang AHC (1992) Oil Bodies and Oleosins in Seeds. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol BioI* 43:177-200
- Huang N (2004) High-level protein expression system uses selfpollinating crops as hosts. *BioProcess International* 2:54-59
- Hudson ME, Quail PH (2003) Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol* 133:1605-1616
- James C (2009) Resumen del informe sobre “La situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/genéticamente modificados en 2009”. ISAAA
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907
- Jordano J, Almoguera C, Thomas TL (1989) A sunflower helianthinin gene upstream sequence ensemble contains an enhancer and sites of nuclear protein interaction. *Plant Cell* 1:855-866

- Kader J (1997) Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends Plant Sci* 2:66-70
- Kader JC (1996) Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:627-654
- Karimi M, Inze D, Depicker A (2002) Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193-195
- Kaushik V, Yadav M, Bhatla S (2009) Temporal and spatial analysis of lipid accumulation, oleosin expression and fatty acid partitioning during seed development in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiol Plant* 32:199-204
- Kiani S, Talia P, Maury P, Grieu P, Heinz R, Perrault A, Nishinakamasu V, Hopp E, Gentzbittel L, Paniego N (2007) Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science* 172:773-787
- Kim M, Kim H, Shin J, Chung C-H, Ohlrogge J, Suh M (2006) Seed-specific expression of sesame microsomal oleic acid desaturase is controlled by combinatorial properties between negative cis-regulatory elements in the SeFAD2 promoter and enhancers in the 5'-UTR intron *Molecular Genetics and Genomics* 276:351-368
- Kim SY, Chung H-J, Thomas TL (1997) Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the *Dc3* promoter using a modified yeast one-hybrid system. *The Plant Journal* 11:1237-1251
- Klein TM, Fromm M, Weissinger A, Tomes D, Schaaf S, Sletten M, Sanford JC (1988) Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4305-4309
- Kridl J, McCarter D, Rose R, Scherer D, Knutzon D, Radke S, Knauf V (1991) Isolation and characterization of an expressed napin gene from *Brassica rapa*. *Seed Sci Res* 1:209-219
- Landy A (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58:913-949
- Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 30:325-327
- Lessard PA, Allen RD, Fujiwara T, Beachy RN (1993) Upstream regulatory sequences from two beta-conglycinin genes. *Plant Mol Biol* 22:873-885

- Li L, Wang X, Gai J, Yu D (2008) Isolation and characterization of a seed-specific isoform of microsomal omega-6 fatty acid desaturase gene (FAD2-1B) from soybean. *J. DNA Seq* 19:28-36.
- Liu Q, Brubaker CL, Green AG, Marshall DR, Sharp PJ, Singh SP (2001) Evolution of the FAD2-1 fatty acid desaturase 5' UTR intron and the molecular systematics of *Gossypium* (Malvaceae). *Am J Bot* 88:92-102
- Lu S, Gu H, Yuan X, Wang X, Wu AM, Qu L, Liu JY (2007) The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions responsible for tissue-specific and inducible expression in transgenic *Arabidopsis*. *Transgenic Res* 16:177-191
- Martinez-Rivas JM, Sperling P, Lühs W, Heinz E (2001) Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (FAD2) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Breeding* 8:159-168
- Mazhar H, Quayle R, Fido R, Stobart A, Napier J, Shewry P (1998) Synthesis of storage reserves in developing seeds of sunflower. *Phytochemistry* 48:429-432
- McCabe D, Swain W, Martinell B, Christou P (1988) *Bio/Technology* 6::
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR (1995) The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci* 20:506-510
- Morita A, Umemura T-a, Kuroyanagi M, Futsuhara Y, Perata P, Yamaguchi J (1998) Functional dissection of a sugar-repressed K-amylase gene (RAmy1A) promoter in rice embryos. *FEBS Letters* 423:81-85
- Moskal WA, Jr., Wu HC, Underwood BA, Wang W, Town CD, Xiao Y (2007) Experimental validation of novel genes predicted in the un-annotated regions of the *Arabidopsis* genome. *BMC Genomics* 8:18
- Muller M, Knudsen S (1993) The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box. *Plant J* 4:343-355
- Murphy DJ (1993) Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog Lipid Res* 32:247-280
- Nunberg AN, Li Z, Bogue MA, Vivekananda J, Reddy AS, Thomas TL (1994) Developmental and hormonal regulation of sunflower helianthinin genes: proximal promoter sequences confer regionalized seed expression. *Plant Cell* 6:473-486

- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003) Gibberellin Biosynthesis and Response during Arabidopsis Seed Germination. *The Plant Cell* 15:1591–1604
- Okuley J, Lightner J, Feldmann K, Yadav N, Lark E, Browse J (1994) Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* 6:147-158
- Pagnussat LA, Lombardo C, Regente M, Pinedo M, Martin M, de la Canal L (2009) Unexpected localization of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *J Plant Physiol* 166:797-806
- Paniego N, Echaide M, Muñoz M, Fernández L, Torales S, Faccio P, Fuxan I, Carrera M, Zandomeni R, Suárez E (2002) Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* 45:34-43
- Peluffo L, Lia V, Troglia C, Maringolo C, Norma P, Escande A, Esteban Hopp H, Lytovchenko A, Fernie AR, Heinz R, Carrari F (2010) Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Phytochemistry* 71:70-80
- Plant AL, van Rooijen GJ, Anderson CP, Moloney MM (1994) Regulation of an Arabidopsis oleosin gene promoter in transgenic *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 25:193-205
- Potrykus I (2001) Golden rice and beyond. *Plant Physiol* 125:1157-1161
- Prieto-Dapena P, Almoguera C, Rojas A, Jordano J (1999) Seed-specific expression patterns and regulation by ABI3 of an unusual late embryogenesis-abundant gene in sunflower. *Plant Mol Biol* 39:615-627
- Radonic L (2010) Nuevas estrategias para la transformación y expresión de genes de interés en girasol. U.B.A.
- Rasmussen T, Donaldson I (2006) Investigation of the endosperm-specific sucrose synthase promoter from rice using transient expression of reporter genes in guar seed tissue. *Plant cell reports* 25:1035-1042
- Regente M, de la Canal L (2003) A cDNA encoding a putative lipid transfer protein expressed in sunflower seeds. *J Plant Physiol* 160:201-203
- Rojas A, Almoguera C, Carranco R, Scharf KD, Jordano J (2002) Selective activation of the developmentally regulated Ha hsp17.6 G1 promoter by heat stress transcription factors. *Plant Physiol* 129:1207-1215
- Rombauts S, Dehais P, Montagu MV, Rouze P (2002) PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Research* 27:295-296

Salzman RA, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa PM, Bressan RA (1999) An Improved RNA Isolation Method for Plant Tissues Containing High Levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter* 17:11–17

Sambrook K, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning- Laboratory manual*.

Sanford J (1990) Biolistic plant transformation. *Physiologica Plantarum* 79:206-209

Sarmiento C, Ross JH, Herman E, Murphy DJ (1997) Expression and subcellular targeting of a soybean oleosin in transgenic rapeseed. Implications for the mechanism of oil-body formation in seeds. *Plant J* 11:783-796

Scheneiter AA, Miller JR (1981) Description of sunflower growth stages. *Crop Science* 21:901-904

Schuppert G, Tang S, Slabaugh M, Knapp S (2006) The sunflower high-oleic mutant Ol carries variable tandem repeats of FAD2-1, a seed-specific oleoyl-phosphatidyl choline desaturase. *Mol Breed* 17:241-256

Seiler G (1997) Anatomy and morphology of sunflower. *Sunflower technology and production*. In: Schneiter A (ed). American Society of Agronomy, Madison, Wis. USA, pp 67-111

Shahmuradov IA, Solovyev VV, Gammerman AJ (2005) Plant promoter prediction with confidence estimation. *Nucleic Acids Res* 33:1069-1076

Stalberg K, Ellerstom M, Ezcurra I, Ablov S, Rask L (1996) Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. *Planta* 199:515-519

Stangeland B, Salehian Z (2002) An improved clearing method for GUS assay in *Arabidopsis* endosperm and seed. *Plant Mol Biol* 20:107-114

Stoger E, Sack M, Nicholson L, Fischer R, Christou P (2005) Recent progress in plantibody technology. *Curr Pharm Des* 11:2439-2457

Talia P, Greizerstein E, Quijano CD, Peluffo L, Fernandez L, Fernandez P, Hopp HE, Paniego N, Heinz RA, Poggio L (2010) Cytological characterization of sunflower by in situ hybridization using homologous rDNA sequences and a BAC clone containing highly represented repetitive retrotransposon-like sequences. *Genome* 53:172-179

Tzen J, Cao Y, Laurent P, Ratnayake C, Huang A (1993) Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species. *Plant Physiol* 101:267-276

Van Droogenbroeck B, Cao J, Stadlmann J, Altmann F, Colanesi S, Hillmer S, Robinson DG, Van Lerberge E, Terryn N, Van Montagu M, Liang M, Depicker A, De

Jaeger G (2007) Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic *Arabidopsis* seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1430-1435

Venter M, Botha FC (2004) Promoter analysis and transcription profiling: Integration of genetic data enhances understanding of gene expression. *Physiol Plant* 120:74-83

Vicente-Carbajosa J, Carbonero P (2005) Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *Int J Dev Biol* 49:645-651

Vos E, Cunnane S (2003) α -Linolenic acid, linoleic acid, coronary artery disease, overall mortality. *Am J Clin Nutr* 77:521-522

Washida H, Wu CY, Suzuki A, Yamanouchi U, Akihama T, Harada K, Takaiwa F (1999) Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene *GluB-1*. *Plant Mol Biol* 40:1-12

Wen-Jun S, Forde B (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 17:83-85

Wu C, Washida H, Onodera Y, Harada K, Takaiwa F (2000) Quantitative nature of the prolamina-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression. *The Plant Journal* 23:415-421

Yamada S, Bohnert HJ (2000) Expression of the PIP aquaporin promoter-MipA from the common ice plant in tobacco. *Plant Cell Physiol* 41:719-725

Yoshihara T, Washida H, Takaiwa F (1996) A 45-bp proximal region containing AACA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm-specific expression of the rice storage protein glutelin gene, *GluA-3*. *FEBS Lett* 383:213-218

Zou J, Abrams GD, Barton DL, Taylor DC, Pomeroy MK, Abrams SR (1995) Induction of Lipid and Oleosin Biosynthesis by (+)-Abscisic Acid and Its Metabolites in Microspore-Derived Embryos of *Brassica napus* L. cv Reston (Biological Responses in the Presence of 8[prime]-Hydroxyabscisic Acid). *Plant Physiol* 108:563-571