



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Efecto de la sobreexpresión de genes involucrados en la síntesis y transporte de
hexosas en *Arabidopsis thaliana*

TESIS

Que presenta

Jorge Luis Ruiz Salas

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGIA

Director de tesis: Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

Ciudad de México

Noviembre, 2016

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Un eterno agradecimiento a mi amada familia (Lydia, Jesús y Elis), ellos son lo más importante que tengo en mi vida, les doy GRACIAS por haberme apoyado y alentado a seguir adelante en este camino que no fue sencillo, sin embargo, ellos nunca dejaron de creer en mí. Y a mis familiares (tíos y primos).

Agradezco a la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares por abrirme las puertas su laboratorio y haberme permitido ser parte de su grupo de trabajo, en el cual aprendí grandes habilidades que posteriormente aplicaré en el futuro, al Dr. Roberto Ruiz Medrano por sus consejos e ideas para el desarrollo, revisión y escritura de este proyecto, a la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara, a la Dra. María de Carmen Montes Horcasitas y al Dr. Jesús Hinojosa Moya por haber contribuido a la escritura y revisión de esta tesis.

A mis amigos, quienes me han acompañado durante este largo proceso y los cuales me han hecho mi estancia más amena, así como sus aportes para la realización de este proyecto.

Agradezco el apoyo brindado por el CINVESTAV-IPN por haber facilitado las instalaciones para poder desarrollar este proyecto y a CONACyT por haber proporcionado la manutención económica de la beca (21955).

índice general

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción	3
1.1. Sistema vascular en plantas.....	3
1.2 Translocación de azúcares al floema.....	4
1.3. Transporte de azúcares en plantas.....	5
1.4. Transporte de monosacáridos mediado por AtSTP1.....	6
1.5. Señalización en plantas mediante azúcares.....	7
1.5.1. Trehalosa-6-fosfato como molécula de señal.....	8
1.5.2. Galactosa 1 fosfato como molécula señal.....	9
2. Justificación.....	11
3. Hipótesis	11
4. Objetivo	11
5. Materiales y métodos.....	12
5.1. Estrategia experimental.....	12
5.2. Análisis histoquímico del promotor vascular At1g59880 en <i>A. thaliana</i>	12
5.3. Síntesis de cDNA, amplificación y clonación de los genes <i>AtSTP1</i> , <i>AtTPS1</i> y <i>AtGALK1</i>	12
5.4. Amplificación y clonación del promotor KNAT1 (At4g08150).....	14
5.5. Técnica de PCR de ensamblaje.....	14
5.6. Unidades de expresión.....	16
5.6.1. Ensamblaje de la construcción TPS1.....	16
5.6.2. Ensamblaje de la construcción GALK1.....	16
5.6.3. Ensamblaje de la construcción STP1.....	17
5.7. Obtención de plásmidos recombinantes de las construcciones.....	18
5.8. Subclonación en vector de expresión en planta.....	18
5.9. Transformación por electroporación en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
5.10. Generación de plantas sobreexpresoras de <i>A. thaliana</i> por Inmersión Floral.....	20
5.11. Selección de plantas con glufosinato de amonio en sustrato.....	20
5.12. Extracción y cuantificación de mRNA mediante qPCR de la construcción TPS1.....	21
5.13. Determinación de sitio de inserción mediante ddPCR.....	21

5.14. Evaluación fisiológica y medición de tasa fotosintética	22
5.15. Extracción y evaluación en acumulación de trehalosa en la construcción de TPS1.	22
6. Resultados	24
6.1. AT5g59880 se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos vasculares de <i>A. thaliana</i>	24
6.2. La amplificación de los genes <i>AtTPS1</i> , <i>AtGALK1</i> y <i>AtSTP1</i> se obtuvo del tamaño con respecto al reportado en bases de datos.....	25
6.3. Los genes clonados mostraron una identidad de 99% para <i>AtTPS1</i> , 98% para <i>AtGALK1</i> y 99% para <i>AtSTP1</i> con referencia a los reportados en base de datos.....	25
6.4. pKNAT1 amplificado y clonado mostró un 98% de identidad con la secuencia reportada en la base de datos.....	26
6.5. Las unidades de expresión de TPS1, GALK1 y STP1 fueron obtenidas con el tamaño esperado mediante la técnica de PCR de ensamblaje.	27
6.6. Las construcciones fueron clonadas en el vector PCR8*GWTOPO y subclonadas en pBGWFS7,0 y analizadas por restricción.....	28
6.7. Se obtuvieron dos líneas independientes de TPS1.	29
6.8. Se obtuvieron dos líneas independientes de GALK1.....	30
6.9. Se obtuvieron seis líneas independientes de TPS1.....	30
6.10. La tasa fotosintética de TPS1 no vario, pero mostraron diferencias fenotípicas comparadas con las WT.....	31
6.11. Líneas transgénicas de la mutante <i>tps1</i> reflejaron mayor acumulación de mRNA comparada con la WT.....	32
6.12. Detección de la acumulación de mRNA de Flowering Locus T en líneas transgénicas de TPS1.....	33
6.13. Trehalosa se acumula en altos niveles en mutantes TPS1 de Arabidopsis en comparación a la WT.	33
7. Discusión.....	35
8. Conclusiones globales.....	38
9. Recomendaciones.....	39
10. Referencias bibliográficas.	40
11. Anexos.....	45

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Esquema del sistema vascular en plantas.....	3
Figura 2. Mecanismos de carga en el floema.	4
Figura 3. Representación esquemática del transporte de azúcares a larga distancia a través del floema y familia de transportadores de monosacáridos	6
Figura 4. Contexto funcional de la TPS1 en plantas.....	9
Figura 5. Función de GALK en plantas.	10
Figura 6. Vectores empleados para la clonación de las construcciones	14
Figura 7. Representación esquemática de la técnica de PCR de ensamblaje para la construcción de las unidades de expresión.	15
Figura 8. Diagrama de las construcciones	18
Figura 9. Vector Gateway pBGWFS7,0, utilizado como vector destino para la incorporación de la construcción en <i>A. thaliana</i>	19
Figura 10. Análisis histoquímico del promotor 59880 en tejidos de <i>A. thaliana</i>	24
Figura 11. Amplificación de los marcos de lectura abierto de los genes, AtSTP1, AtGALK1 y AtTPS1 utilizando cDNA de <i>A. thaliana</i> como templado.	25
Figura 12. Análisis de restricción de los fragmentos correspondientes de los tres genes clonados usando la enzima de restricción EcoRI.....	26
Figura 13. Amplificación y clonación del promotor KNAT1 en pDrive.....	27
Figura 14. Ensamble de los genes AtTPS1, AtGALK1 y AtSTP1.....	28
Figura 15. Análisis de restricción usando la enzima EcoRI para cada una de las construcciones en PCR8GWTOPO y en pBGWFS7,0.....	29
Figura 16. Confirmación de plantas transformadas y número de copias para TPS1.....	29
Figura 17. Confirmación de plantas transformadas y número de copias para GALK1	30
Figura 18. Confirmación de plantas transformadas y número de copias para STP1.....	31
Figura 19. Parámetros fisiológicos y fenotípicos de plantas	32
Figura 20. Expresión relativa del gen TPS1 en plantas transgénicas y de silvestres en raíces, tallos, hojas caulinares, hojas en roseta y silicuas.....	32
Figura 21. Expresión relativa del gen Flowering Locus T (FT) en hojas caulinares y de roseta de líneas que sobreexpresan el gen TPS1 comparadas con planta silvestres	33

Figura 22. Acumulación de trehalosa en plantas transgénicas y silvestres en hoja caulinar, hoja de roseta, raíz, tallo y silicua	34
--	----

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencias utilizadas para el desarrollo de este proyecto.....	45
Tabla 2. Reacción para PCR punto final.....	46
Tabla 3 Reacción para análisis de restricción.....	47

Resumen

El sistema vascular de plantas se divide en dos conductos especializados, denominados floema y xilema. El xilema transporta agua y sales minerales, mientras que en el floema se translocan azúcares, proteínas, RNA y ácidos grasos, entre otros. La síntesis y movilización de fotoasimilados desde los tejidos productores hacia los tejidos consumidores se considera una limitación en el crecimiento de las plantas. Los azúcares derivados del proceso de fotosíntesis pueden actuar como reguladores de presión osmótica, transductores de señales y principalmente como fuente de carbono. Los azúcares se movilizan mediante dos rutas; una de ellas es la vía simplástica, la cual ocurre a través de plasmodesmos y otra ruta está constituida por el movimiento apoplástico, que es mediado por transportadores membranales. El objetivo principal de esta investigación fue analizar el papel de la señalización de los azúcares y transportadores de monosacáridos en *Arabidopsis thaliana* y modificando de esta forma la movilización de fotoasimilados afectando la asignación de hidratos de carbono variando el desarrollo y crecimiento de *A. thaliana*. La estrategia a seguir se basó en el uso de un promotor el cual es específico de meristemo (KNAT1) el cual dirigió la expresión en *A. thaliana* de un transportador que presenta alta afinidad a hexosas (STP1), y el segundo promotor el cual es específico de floema (At5g59880) que dirigió la expresión de dos enzimas involucradas en síntesis de los azúcares galactocinasa y trehalosa fosfato sintasa1 (GALK y TPS1), el gen GALK codifica a una proteína la cual tiene como función fosforilar la galactosa para obtener galactosa-1-fosfato (G1P) y su proceso de señalización en plantas aún no se ha descrito, y el gen TPS1 que codifica a dicha proteína y cataliza la reacción de UDP-Glc y Glc-6-P para dar como resultado trehalosa 6 fosfato (T6P). Dicha proteína se ha encontrado involucrada en diferentes procesos de las plantas, principalmente asociada a estrés biótico y abiótico. Dos mutantes de TPS1 (L1 y L2) mostraron una floración y aparición de silicuas anticipadamente, los niveles de expresión del gen tps1 en la mutante fueron mayores en hoja caulinar y roseta y en menor proporción en silicua; sin embargo, la expresión fue similar a la silvestre en tallo y raíz, el gen que codifica a la proteína Flowering Locus T (FT) mostró también un ligero incremento en las mutantes. Asimismo, se midieron los niveles de producción de trehalosa, siendo mayor en hojas en hojas caulinares y hojas de roseta. La actividad fotosintética en la mutante L1 fue similar a la silvestre, el gen TPS1 unido a un promotor específico de floema podría haber inducido una floración y una aparición temprana de silicuas, no afectando el proceso de fotosíntesis y finalmente se obtuvieron dos mutantes para el gen GALK1 y seis para el gen STP1.

Abstract

The plant vascular system consists of two specialized channels called phloem and xylem. Xylem transports water and mineral nutrients, while phloem translocates sugars, proteins, RNA and fatty acids, among others. The synthesis and mobilization of photoassimilates from source to sink tissues has been considered a limitation on the growth of plants. Sugars derived from photosynthesis can act as osmotic pressure regulators, signal molecules and mainly as carbon source. Sugars are mobilized through two routes; one is the symplastic pathway, which occurs through plasmodesmata and another route is constituted by the apoplastic movement, which is mediated by membrane transporters. The main objective of this research was to analyze the role of signaling sugars and transporters proteins in *Arabidopsis thaliana* and modifying the movement of photoassimilates which can affect the allocation of carbohydrates regulating the development and growth of *A. thaliana*. The strategy was based on the use of a promoter which is specific to meristem (KNAT1, At1g23380) which drives the expression in *A. thaliana* of a transporter protein with high affinity for hexoses (STP1) and the second promoter which is specific to phloem (At5g59880) who directed the expression of two enzymes involved in synthesis of galactokinase and trehalose phosphate sintase 1 (GALK1 and TPS1). GALK1 gene encodes a protein which has the function of phosphorylate galactose to obtain galactose 1-phosphate (G1P) and its signaling process in plants has not been described, and the TPS1 gene encodes a protein which catalyzed the reaction of UDP-Glc and Glc-6-P to obtain trehalose-6-phosphate (T6P). This protein has been found in different processes in plants, mainly associated with biotic and abiotic stress. Two mutants TPS1 (L1 and L2) showed onset of flowering and early siliques, expression levels of the mutant in tps1 gene were higher in rosette and cauline leave and less in silique; however, expression was similar to wild type in stem and root, the gene encoding the protein FLOWERING LOCUS T (FT) also showed a slight increase in the mutants. Furthermore, production levels were measured trehalose. That was higher in rosette and cauline leaves. The photosynthetic activity in the L1 mutant was similar to the wild type, the TPS1 gene linked to a specific promoter phloem could have induced flowering and early onset of siliques, not affecting the process of photosynthesis and eventually it was possible to obtain two GALK1 mutants and six for the STP1 gene.

1. Introducción

1.1. Sistema vascular en plantas

El sistema vascular en plantas está dividido en dos conductos específicos llamados xilema y floema. El xilema tiene la función de conducir agua y sales de minerales desde la raíz hasta los tejidos que se encuentran aéreos, tales como, hojas, flores y frutos, el cual es derivado a partir de células del procambio, que se diferencian en elementos del xilema. El floema es un sistema de translocación, el cual transporta azúcares, aminoácidos, nutrientes minerales y hormonas desde los tejidos fotosintéticamente activos hasta los tejidos consumidores, y es también derivado células de procambio, las cuales se diferencian en tejido criboso y sus células asociadas, como son células acompañantes (figura. 1) (Lucas, 2010).

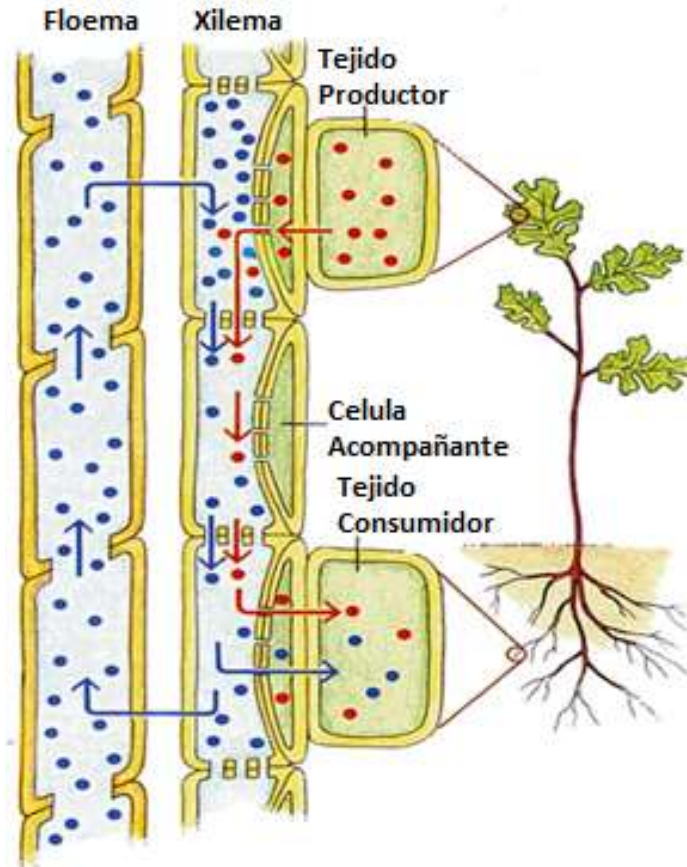


Figura 1. Esquema del sistema vascular en plantas. El xilema transporta agua y sales minerales, mientras en el floema se translocan azúcares, proteínas y ARNm. Tomada de <http://www.laboratorioclinico.110mb./transpote.html>.

1.2 Translocación de azúcares al floema.

La carga del floema es el inicio de la exportación de hidratos de carbono desde hojas que se encuentran fotosintéticamente activas descargándolos hacia los diferentes tejidos consumidores de las plantas. En recientes años se ha demostrado que el floema también tiene un papel importante en la movilización de moléculas, coordinando muchas etapas del desarrollo y crecimiento de las plantas (Turgeon y col., 2009). En las plantas existen dos tipos de cargas del floema (figura. 2). El primero es un mecanismo simplástico, en el cual las hojas, los niveles de azúcares son más altos en el mesófilo que en el floema. Los iones y moléculas se difunden a través de unos canales denominados plasmodesmos en cada célula, sin utilizar un gradiente de concentración (figura. 2a) (Turgeon y Medville, 1998; Reidel y col., 2009; Rennie y Turgeon, 2009). Un mecanismo alternativo, consiste en una carga denominada simplástica, en la cual la energía metabólica es usada para bombear los fotoasimilados dentro del floema, en contra del gradiente de concentración; en este proceso un protón proporciona la fuerza motriz necesaria para descargar la sacarosa dentro del floema, utilizando proteínas transportadoras intermembranales (figura 2b) (Lalonde y col., 2004; Sauer, 2007; Braun y Slewinski, 2009).

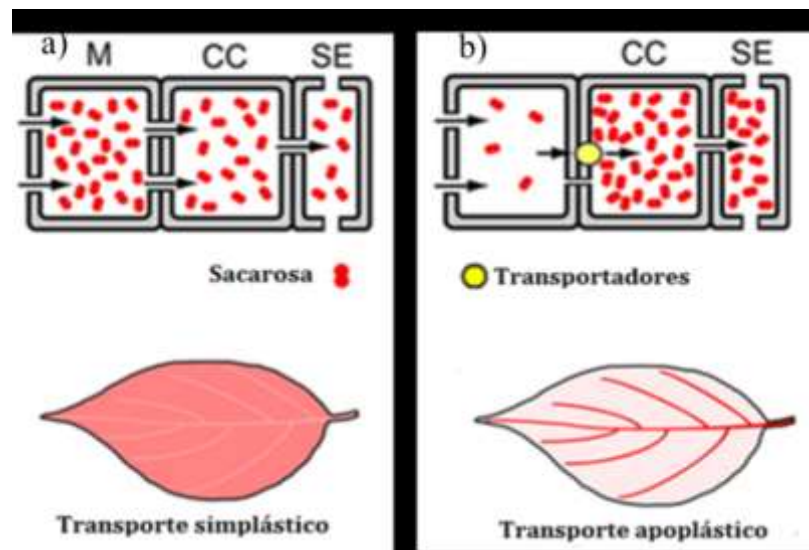


Figura 2. Mecanismos de carga en el floema. a) La sacarosa se difunde a través de plasmodesmos dentro de las células acompañantes (CC) en las venas menores y el tejido criboso (SE). b) la sacarosa es bombeada desde el apoplasto dentro de las células menores mediante proteínas transportadoras (círculos amarillos). Tomada de Turgeon., 2010.

1.3. Transporte de azúcares en plantas.

Los azúcares regulan diferentes procesos biológicos en las plantas. La eficiente repartición de carbohidratos es un requisito esencial en las plantas para funcionar como organismos multicelulares, con órganos y tejidos funcionalmente diferentes. En la mayoría de las plantas, la sacarosa representa la unidad de transporte principal de carbono fijado mediante la fotosíntesis, este azúcar se produce en las células fotosintéticamente activas y es distribuido a toda la planta a través del floema, con la finalidad de abastecer de carbono a los tejidos consumidores. En los lugares de consumo, la sacarosa puede entrar directamente a las células a través de conexiones simplástica (plasmodesmos) o a través de transportadores, los cuales presentan una captación activa de azúcares. Por otra parte, la sacarosa puede ser hidrolizada en el apoplasto mediante invertasas, las cuales son encontradas en la pared celular de la célula y los monosacáridos resultantes como lo son glucosa y fructosa son absorbidos en las células. La absorción de hexosas del espacio apoplástico a través de la membrana plasmática es mediada por STP (Sugar Transport Protein, por sus siglas en inglés), dichas proteínas están codificadas por 14 genes homólogos en *Arabidopsis* de un total de 53 genes de transportadores de la superfamilia de los monosacáridos (Büttner 2007). La captación de hexosas a través de la membrana plasmática es catalizada por un simportador de monosacáridos/protón, denominadas proteínas transportadoras de azúcares (figura. 3a). Estudios recientes demostraron la distribución de los diferentes transportadores en otras plantas, como es el caso de *Vitis vinifera*, en la cual se observó la localización de monosacáridos, así como la expresión de transportadores en diferentes fases del desarrollo (Afoufa y col., 2010). El genoma de *A. thaliana* contiene 14 genes putativos de STP dentro de una familia de por lo menos 50 genes estrechamente relacionados. Cuatro diferentes proteínas transportadoras han sido expresadas en sistemas heterólogos (levaduras y *Xenopus*). Los transportadores de azúcar en *A. thaliana* es uno de los grupos mejor caracterizados dentro de las familias de los transportadores de monosacáridos (MST) (figura. 3b). Hasta ahora, ocho transportadores (1, 2, 3, 4, 6, 9, 11 y 13) han sido estudiados a detalle y han mostrado importar protones y hexosas a través de la membrana plasmática hacia el citosol de la célula (Büttner 2007). Sin embargo, varios aspectos han sido pobremente investigados y todavía no se han tomado en cuenta de forma experimental, tales como modificaciones postraduccionales y otros factores que puedan afectar la actividad del transporte (Büttner y col., 2010). Todos

los transportadores conocidos son proteínas ancladas a membrana plasmática y catalizan la captación de hexosas desde el espacio apoplástico en la célula.

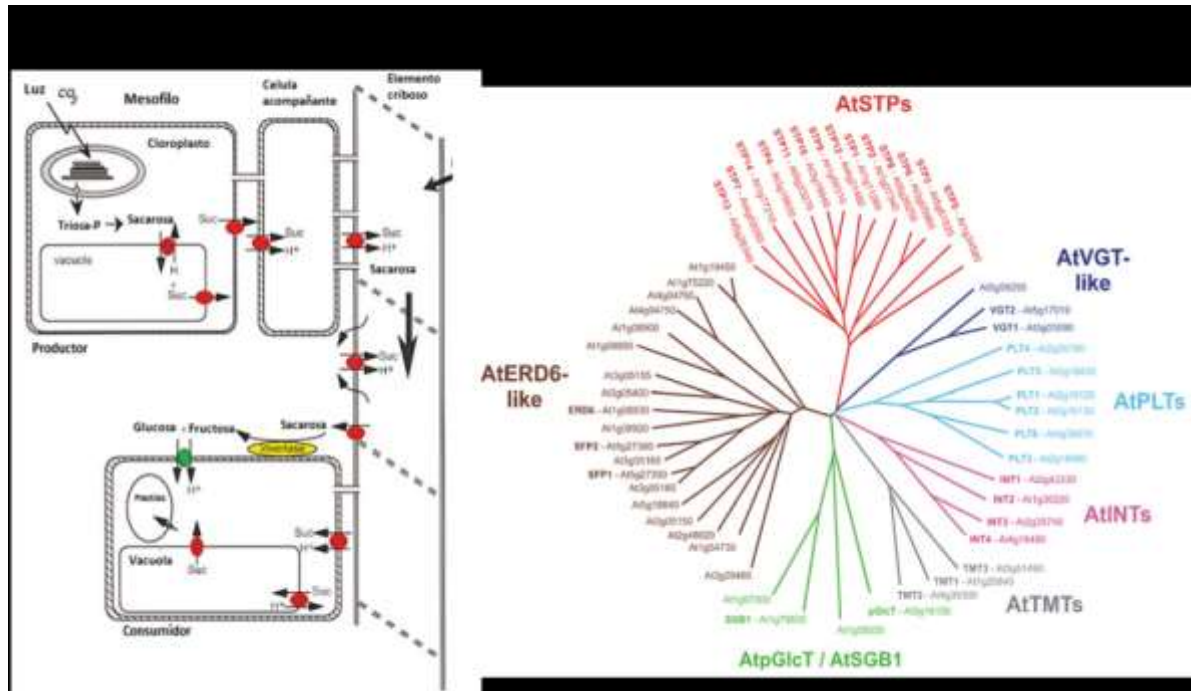


Figura 3. Representación esquemática del transporte de azúcares a larga distancia a través del floema y familia de transportadores de monosacáridos. La sacarosa es transportada desde el mesófilo. a) La descarga requiere un exportador de sacarosa en el tejido receptor. La importación de azúcar y otros solutos en el tejido receptor puede ocurrir a través de plasmodesmos o transportadores de sacarosa, después ocurre una hidrólisis por una invertasa, como hexosas para ser integrado al citosol. b) Árbol filogenético de transportadores de monosacáridos en Arabidopsis thaliana.

1.4. Transporte de monosacáridos mediado por AtSTP1.

AtSTP1 fue el primer transportador de hexosas reportado en plantas, el cual es un simportador de alta afinidad para varios monosacáridos, sin embargo, su afinidad para transportar fructosa es muy baja (Boorer y col., 1994). AtSTP1 fue aislado por primera vez usando una sonda de hibridación de una secuencia a partir de *Chlorella kessleri* (Sauer y Tanner W., 1989; Sauer y col., 1990). AtSTP1 es expresado en germinación de semillas y raíces de plántulas, y mucho más abundante en estomas de los cotiledones, roseta, hojas, sépalos, ovarios tallos y silicuas (Sherson y col., 2000; Stadler y col., 2003), sin embargo, el mRNA de este gen presenta más abundancia en hojas, pero es también encontrado en otros órganos incluyendo el tallo, flores y raíces (Sauer y col., 1990) y cuenta con

aproximadamente un 60% de captación de glucosa en semillas de *A. thaliana* (Stolz y col., 1994). AtSTP1 ha sido funcionalmente caracterizado en sistemas heterólogos tales como *S. pombe* y *X. oocytes*, mostrando tener alta afinidad para importar varios monosacáridos, pero no fructosa (Boorer y col., 1994). Una mutación en el gen *AtSTP1* resultó en una disminución en la captación de monosacáridos suplementados de forma exógena en plántulas de *A. thaliana* (Sherson y col., 2000). Los niveles de mRNA del transportador 1 disminuyen con la adición de glucosa y sacarosa, sin embargo, la expresión génica de este transportador depende, tanto de la presencia de azúcares fosforilados así como la expresión de una hexocinasa (AtHXK1) y la expresión de su región promotora en respuesta a glucosa (Cordoba y col., 2014). La expresión de este transportador fue detectada en células guarda en *A. thaliana*, observándose una alta acumulación durante la noche y de forma transitoria durante el mediodía (Stadler y col., 2003).

1.5. Señalización en plantas mediante azúcares.

Los azúcares además de funcionar como fuente de carbono en el metabolismo energético y biosíntesis de polímeros, también son importantes reguladores en procesos biosintéticos, participando como mensajeros químicos en transducción de señales. Los azúcares han sido descritos como moléculas de señalización en organismos de vida libre, tales como bacterias y levaduras (Stulke y Hillen, 1999; Rolland y col., 2001). Para tales organismos unicelulares, la disponibilidad de nutrientes es el principal factor extracelular que controla su crecimiento y metabolismo. El papel de los nutrientes como moléculas de regulación ha llegado a ser descrito recientemente solo en mamíferos, a pesar de extensas investigaciones sobre la homeostasis de la glucosa y la diabetes (Hanson, 2000; Rolland y col., 2001). En plantas, la obtención de azúcares a través de la fotosíntesis es un proceso vital. El estado de los carbohidratos también modula y coordina reguladores internos, así como señales ambientales que rigen el crecimiento y desarrollo de las plantas (Koch, 1996; Sheen y col., 1999; Smeekens, 2000). Aunque el efecto de la regulación en la actividad fotosintética y el metabolismo de la planta ha sido durante mucho tiempo estudiado, el concepto de azúcares como moléculas centrales de señalización es relativamente nuevo. Recientes investigaciones revelaron mecanismos moleculares fundamentales en la detección de azúcares y la señalización en plantas, incluyendo a las hexocinasas (HXK) como sensores de glucosa que modulan la expresión de genes y rutas de señalización de

hormonas en plantas, además la detección y rutas de señalización de sacarosa, trehalosa y otros azúcares no dependientes de HXK presenta mayor complejidad en su papel en las plantas (Goddijn y Smeekens, 1998; Lalonde y col., 1999; Smeekens, 2000; Granot y col., 2013).

1.5.1. Trehalosa-6-fosfato como molécula de señal.

La trehalosa (Tre) fue considerada por ser un azúcar raro debido que había sido aislada de las plantas en resurrección. La trehalosa es un disacárido no reducido en el cual dos moléculas de glucosas están unidas por un enlace glucosídico α -(1-1). En plantas la Tre es sintetizada en dos pasos mediante las enzimas; trehalosa fosfato sintasa (TPS) y trehalosa fosfato fosfatasa (TPP). El primer paso consta de una condensación, la cual es catalizada por la enzima TPS, el resultado de dicha reacción es la molécula trehalosa-6-fosfato (T6P), posteriormente, la T6P es desfosforilada por la enzima TPP para producir trehalosa, la cual posteriormente es hidrolizada por la enzima trehalasa para producir dos moléculas de glucosa (Matthew P. y col., 2008). La trehalosa juega un papel muy importante regulando el metabolismo en el desarrollo de las plantas. Tanto la glucosa como la trehalosa son azúcares importantes para la señalización de varios procesos de regulación y de integración de señales externas para adaptarse al estrés abiótico, crecimiento y desarrollo, sin embargo, estudios recientes han demostrado que la molécula de T6P está involucrada en procesos tales como: desarrollo del embrión y la formación de la pared celular, también es indispensable para el crecimiento y el uso de carbohidratos mediando el control de la glicolisis, es esencial para el crecimiento vegetativo normal y la transición a la floración en *A. thaliana* (Eastmond y col., 2002; Dijken V. y col., 2004; Gómez L. D. y col., 2006 ; Wahl y col., 2013). T6P regula positivamente la fotosíntesis mediado por la concentración de sacarosa, inhibiendo la expresión del gen SnRK1, así como la síntesis de almidón vía activación de ADP-glucosa pirofosforilasa (Lunn y col., 2006, Zhang y col., 2009; Nunes y col. 2013). T6P es mediador de varios procesos biológicos en plantas, mediante la regulación del crecimiento y desarrollo por activación y represión de varios genes (figura. 4).

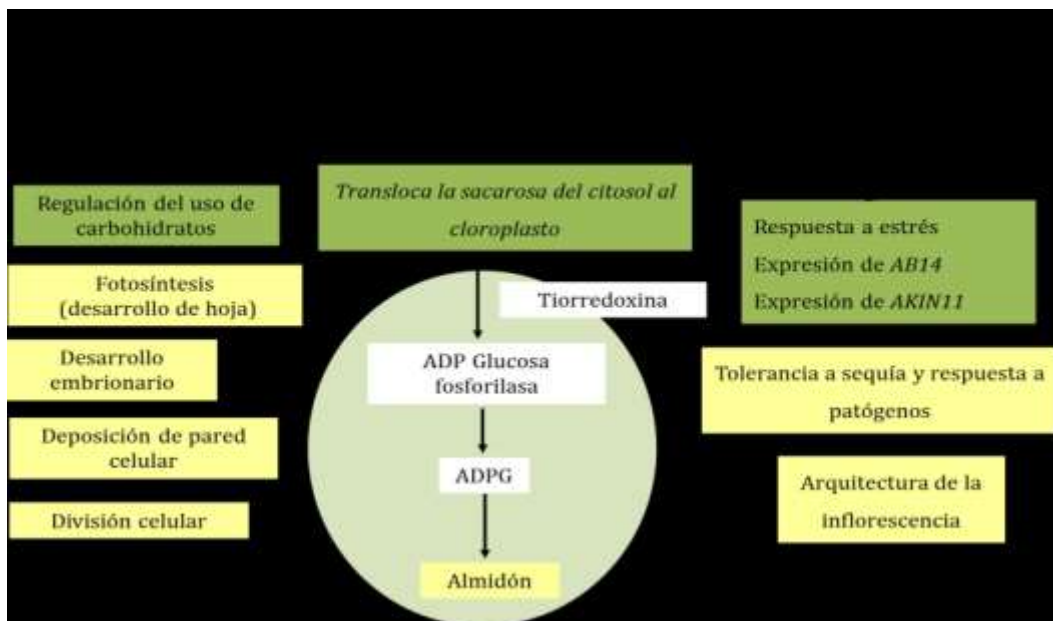


Figura 4. Contexto funcional de la TPS1 en plantas. Involucrada en varios procesos, tanto en estrés abiótico como biótico, en el uso de carbohidratos y la acumulación de almidón (Paul, 2007).

1.5.2. Galactosa 1 fosfato como molécula señal

Las hexocinasas juegan un papel importante como moléculas de señalización, debido a que los productos que fosforilan tienen repercusiones en transducción de señales regulando tanto en crecimiento como en desarrollo y han sido consideradas como enzimas de función dual, debido a su actividad catalítica y su regulación génica en plantas (Xiao y col., 2000). La sobreexpresión de una hexocinasa (AtHXK1) procedente de *Arabidopsis* en plantas de tomate mostró un fenotipo muy marcado inhibiendo el crecimiento y provocando una rápida senescencia y reduciendo la tasa fotosintética en las plantas transgénicas (Dai y col., 1999). La enzima galactocinasa (GALK) es una enzima clave en la ruta biosintética denominada Leroi del metabolismo de la D-galactosa en levadura, el gen que codifica a la enzima GALK fue aislado de varias especies de levadura y bacterias y dos genes de GALK han sido aislado de humanos. La principal función de la galactocinasa (GALK) consiste en la fosforilación de la galactosa (Gal) para obtener como producto galactosa-1-fosfato (G1P) (Kaplan y col., 1997). El producto de la síntesis es mediado por la enzima GALK y se ha descrito como una molécula potencial de señalización en la síntesis de azúcares. La enzima GALK de *Kluyveromyces lactis* es una proteína bifuncional, debido a que además de su actividad catalítica, en presencia de galactosa y ATP, puede migrar al núcleo y activar la represión transcripcional de los genes necesarios para el uso de la galactosa (Zenke y col.,

1996). En *S. cerevisiae*, una proteína (Gal3P) presenta alta homología a GALK lleva a cabo la misma función en lugar de la GALK enzimáticamente activa. En el contexto de las plantas la actividad de esta enzima ha sido demostrada y purificada en extractos de *Phaseolus aureus* y en *Vicia faba* (Pakrash y col., 1983; Neufeld y col., 1960). El gen GALK fue encontrado en el genoma de *A. thaliana* como uni-copia, por tal motivo fue denominado GALK1, y es expresado en los principales tejidos de la planta, las enzimas GALK de las plantas y hongos son altamente conservadas (Kaplan y col., 1997). Estas observaciones sugieren la posibilidad que GALK podría ser un sensor de azúcares y está claro que las hexosas juegan un importante papel en el control del crecimiento y desarrollo. Plantas mutantes con deficiente acumulación de mensajero del gen AtGALK1 mostraron nula actividad de esta enzima provocando la acumulación de galactosa en tejido vegetativo, lo cual no fue tóxico en las plántulas de *Arabidopsis* debido a que mostraron un crecimiento y un fenotipo normal (Egert y col., 2012). Por otro lado, AtGALK2 un gen perteneciente a la familia de las hexocinasas en *A. thaliana* se expresa altamente en flores y raíces, y de forma muy baja en tallos, peciolo y hojas y su expresión es regulada por NaCl y ABA provocando una alta germinación en comparación con la WT (Zhao Q. y col., 2013). Por lo que la hexocinasa (GALK) puede actuar a nivel transcripcional mediante la regulación génica como ya se ha descrito anteriormente (figura. 5). Sin embargo, muchas investigaciones son necesarias para comprender la participación de estas enzimas en la detección y señalización en plantas.

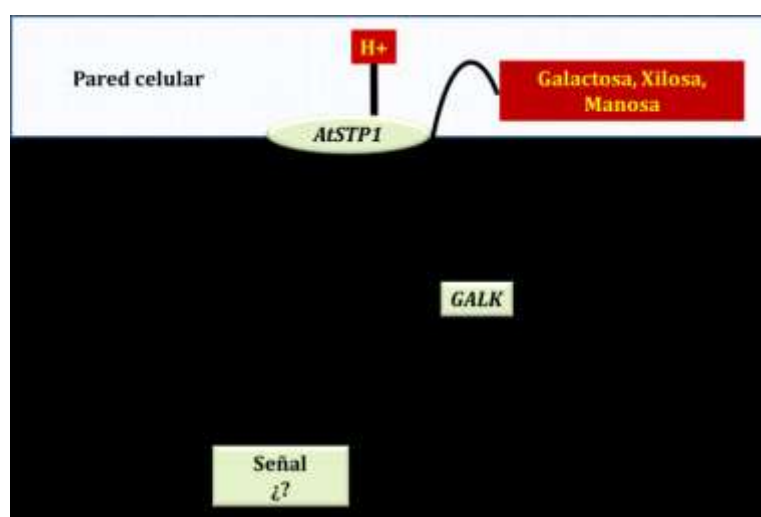


Figura 5. Función de GALK en plantas. GALK fosforila la galactosa para obtener como producto Gal-1-P (Sherson y col., 2002).

2. Justificación

La productividad en plantas se encuentra limitada por el transporte y la síntesis de azúcares, desde los tejidos fotosintéticamente activos hasta los tejidos consumidores. La productividad, la señalización que regula procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas son comúnmente asociados a la biosíntesis de monosacáridos y disacáridos, actualmente la manipulación génica es una alternativa viable para poder incrementar la y/o rendimientos, o bien en mejorar la producción de metabolitos secundarios,

3. Hipótesis

El empleo de genes asociados a síntesis y transporte de hexosas dirigidos por promotores tejido-podría mejorar la asignación de monosacáridos en tejidos consumidores en plantas, permitiendo observar cambios fenotípicos en *Arabidopsis thaliana*.

4. Objetivo

Determinar el efecto de la sobreexpresión de genes que se encuentran dirigidos por promotores tejido-específicos en *A. thaliana*.

5. Materiales y métodos

5.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental comprendió de seis etapas. La primera etapa consiste en la construcción de unidades de expresión, utilizando dos promotores de tejido específico, uno de ellos dirige la expresión en tejido meristemático (At1g23380) y el otro es específico de floema (At5g59880). Las unidades de expresión tendrán los promotores descritos anteriormente, el marco de lectura abierto de cada gen correspondiente y el terminador NOS, posteriormente serán clonadas dentro de un vector binario (pBGWFS7,0) usando tecnología Gateway. La segunda etapa consiste en obtener plantas transgénicas con las construcciones mencionadas anteriormente. Líneas independientes serán caracterizadas por parámetros moleculares y bioquímicos.

5.2. Análisis histoquímico del promotor vascular At1g59880 en *A. thaliana*.

El análisis histoquímico del promotor de tejido vascular se realizó usando plantas transformadas con la construcción previamente clonada por Ruiz-Medrano y col. en 2011, dicho análisis se llevó a cabo mediante una detección histoquímica de expresión del promotor At1g59880 en todos los tejidos de la planta, dicha técnica se describen a continuación; se tomaron hojas de roseta y caulinares, raíz, tallo, flor y silicuas, y se incubaron a 4°C al vacío en solución de GUS (0.5 mM) con X-gluc como sustrato (Research Organics). Se incubaron a 37°C por 72 horas, y se destiñeron con lavados sucesivos de 70% etanol. Finalmente, las muestras se montaron con glicerol al 50% y se visualizaron en un estereoscopio.

5.3. Síntesis de cDNA, amplificación y clonación de los genes *AtSTP1*, *AtTPS1* y *AtGALK1*.

El cDNA se sintetizó a partir de RNA total de *A. thaliana*, usando la siguiente mezcla de reacción; 1 µl RNA total [100 ng], 1 µl de primer dTGAGA [10 mM], 1 µl de primer SMART [10 mM] y 1 µl de dNTP's [2.5 mM] (Invitrogen), la mezcla se incubó a 72°C durante 10 min, después se centrifugó y se mantuvo en hielo, posteriormente se añadieron 4 µl de solución amortiguadora 5X (Invitrogen), 1 µl de DTT [0.1 mM], 1 µl de RNasin

(Invitrogen) y finalmente 1 µl de Superscript III RT (Invitrogen) y se incubó a 50°C durante 1 h. La mezcla de reacción para la amplificación de los genes de interés se llevó a cabo como se indica en la tabla 1. El gen *AtTPS1* (AT1g78580) se amplificó usando el siguiente

programa: 95°C por 3 min, 30 ciclos [94°C por 35 s, 61°C durante 35 s y 72°C por 3 min]; finalmente a 72°C durante 7 min, utilizando los iniciadores TPS1-F y TPS1-R que se muestran en la tabla 1. El gen *AtGALK1* (AT3g06580) se amplificó con el programa empleado es el siguiente: 94°C por 3 min, 30 ciclos [94°C por 35 s, 58°C durante 35 s y 72°C por 1 min 40 s]; finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 7 min, usando los iniciadores GALK1-F y GALK1-R descritos en la tabla 1. Y finalmente el gen *AtSTP1* (AT1g11260) se amplificó con los iniciadores STP1-F y STP1-R que se muestran en la tabla 1, utilizando el siguiente programa: 95°C por 3 min, 30 ciclos [94°C por 35 s, 60°C durante 35 s y 72°C por 1 min 40 s]; finalmente un ciclo de 72°C durante 7 min utilizando los. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8% en solución amortiguadora TBE conteniendo 1 µl de bromuro de etidio por cada 100 ml de agarosa, y fueron observados en un transluminador con luz UV (Logic 2000). Los productos amplificados se purificaron utilizando el kit comercial QIAquick PCR Purification kit DE QIAGEN, siguiendo las instrucciones descritas por el proveedor. Los productos de PCR purificados de los genes *STP1* y *GALK* se ligaron al vector PCR*8GWTOPO/TA (Invitrogen, Figura 6a) y el gen *TPS1* se ligó al vector pDrive (QIAGEN Figura 6b;), la mezcla de ligación se realizó como se describe en la tabla 2 y se incubó a 22°C durante aproximadamente 16 h. La ligación se transformó en células competentes DH5α a las cuales se les añadieron 3 µl de mezcla de ligación, las células son sometidas a un choque térmico a 42°C durante 53 s posteriormente se adicionaron 250 µl de medio LB-SOC y fueron crecidas a 37°C durante 1 h. Las células se esparcieron sobre medio LB sólido con espectinomicina (100 µg/ml), y se incubaron a 37°C durante 16 h. Se seleccionaron 10 colonias las cuales se incubaron en medio TB líquido con espectinomicina (100 µg/ml) a 37°C durante 16 h a 120 rpm, el plásmido se extrajo y purificó utilizando la técnica de lisis alcalina y posteriormente las muestras se trataron con RNasa A (100 mg/ml). El análisis de restricción se llevó a cabo con EcoRI (NEB). Se digirió aproximadamente 1 µg de plásmido extraído (Ver reacción tabla 3). La restricción se incubó a 37°C durante 12 h, los productos de la restricción fueron separados en un gel de agarosa al 0.8% con tinte con bromuro de etidio para finalmente ser observados en un transluminador UV.

5.4. Amplificación y clonación del promotor KNAT1 (At4g08150).

La secuencia del promotor KNAT1 se amplificó a partir de DNA genómico de *A. thaliana* utilizando los iniciadores pKNAT1-F y pKANT1-R descritos en la tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron; 94°C por 3 min, 30 ciclos [94°C por 35 s, 56°C durante 45 s y 72°C por 2 min 20 s], finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 7 min. El producto de PCR obtenido se purificó mediante el kit Qiagen (Qiagen PCR Purification) y se clonó en el vector pDrive (figura. 6b) mediante la mezcla de reacción que se refiere en la tabla 2 siguiendo las instrucciones del proveedor (Qiagen, cloning kit). La transformación se realizó usando células competentes DH5 α , la mezcla se incubó durante 53 s a 42°C, inmediatamente se agregó un volumen de 250 μ l de medio LB- SOC y se incubó a 37°C durante 1 h a 120 rpm. Las células crecidas se esparcieron sobre medio sólido LB que contiene ampicilina (50 μ g/mL) y se incubaron a 37°C durante 16 h. Se seleccionaron colonias y se incubaron en medio TB líquido con ampicilina (50 μ g/mL) a 37°C durante 16 h a 120 rpm. El plásmido se extrajo y purificó utilizando la técnica de lisis alcalina, estos plásmidos fueron tratados con RNasa A y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se realizó el análisis de restricción empleando la enzima EcoRI de la siguiente forma; Buffer EcoRI (10x), enzima EcoRI U/ μ l, NEB) y DNA plasmídico [1 μ g]. La restricción se incubó a 37°C durante 16 h y el resultado de la restricción se visualizó en un gel de agarosa 0.8%.

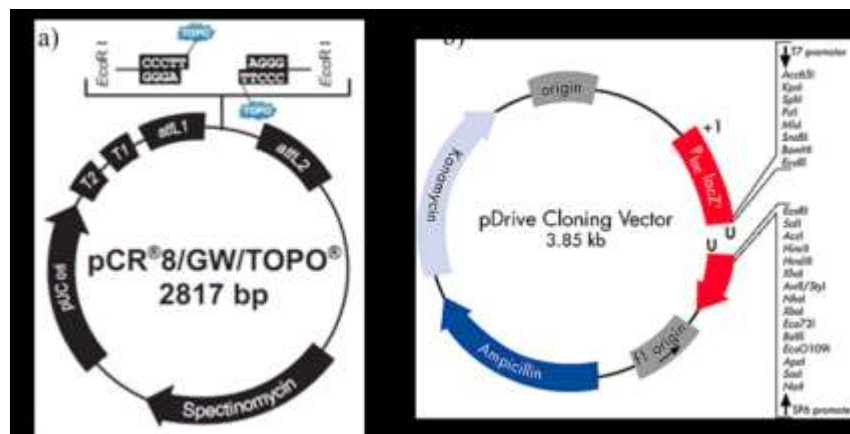


Figura 6. Vectores empleados para la clonación de las construcciones. a) Vector PCR*8/GW/TOPO y b) pDrive cloning vector.

5.5. Técnica de PCR de ensamblaje

El ensamble completo de las construcciones se realizó mediante la técnica de PCR de ensamblaje, para este propósito se diseñaron iniciadores, los cuales tienen 15 pb de un

fragmento y 15 pb de la secuencia del fragmento adyacente, mediante esta técnica obtuvieron las tres unidades de expresión utilizadas en este trabajo (figura 7). La reacción para la técnica de PCR de ensamble se describe a continuación, se tomaron 100 ng de cada fragmento que se desee ensamblar, se realizó una mezcla de reacción con Buffer Ex Taq (10x), posteriormente la mezcla se colocó en un termociclador (Biometra) con el siguiente programa; 94°C durante 5 min, después 49 ciclos a 94°C durante 1 min (un gradiente de decremento de 1°C/min), a dicha mezcla de reacción se añadieron dNTP's [2.5 mM], iniciador forward [10 µM] e iniciador reverso [10 µM] y Takara [U/µl], y finalmente llevar esta última mezcla de reacción a 72°C durante 10 min.

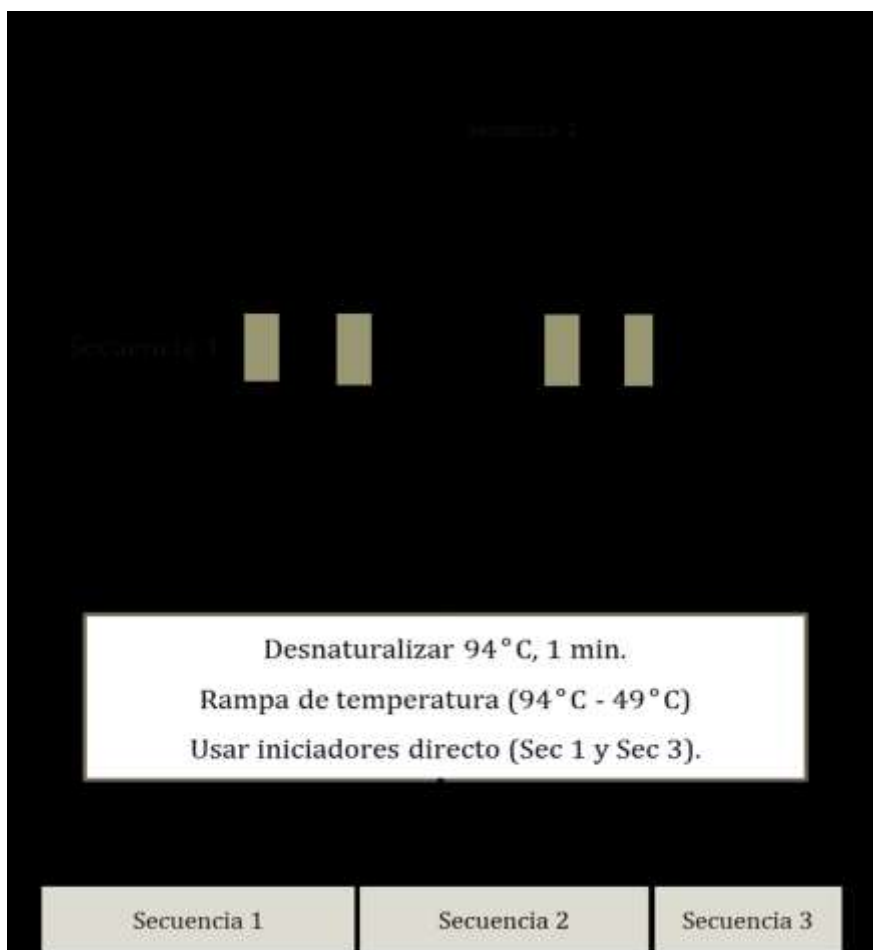


Figura 7. Representación esquemática de la técnica de PCR de ensamble para la construcción de las unidades de expresión.

5.6. Unidades de expresión.

5.6.1. Ensamblaje de la construcción TPS1.

El marco abierto de lectura del gen TPS1 está bajo la regulación del promotor 59880 y el terminador T-NOS (figura 8a). El promotor vascular (Ruiz-Medrano y col., 2011) se amplificó con los oligos p59880-F y TNOS-R descritos en la tabla 1. El programa empleado para la obtención del fragmento del promotor 59880 fue el siguiente; un ciclo de inicial de pre-desnaturalización a 98°C por 30s, 30 ciclos [98°C durante 10 s, 60°C durante 35 s y 72°C durante 2 min], finalmente un ciclo de final de extensión de 72°C durante 10 min. El ORF con los fragmentos para el ensamble del gen *AtTPS1* se amplificó usando los iniciadores 59880tps1connect-F y TNOSTPS1connect-R que se muestran en la tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes un ciclo de inicial de pre-desnaturalización a 98°C por 30s, 30 ciclos [98°C durante 10 s, 61°C durante 30 s y 72°C por 2 min], finalmente un ciclo de final de extensión de 72°C durante 10 min. El T-NOS para la unión se amplificó usando los iniciadores TNOSTps1connect-F y TNOS-R los cuales se encuentran detallados en la tabla 1. Un ciclo de inicial de pre-desnaturalización a 98°C por 30s, 30 ciclos [98°C durante 10 s, 68°C durante 30 s y 72°C durante 30 s], finalmente un ciclo de final de extensión de 72°C durante 10 min. La amplificación se realizó de la siguiente manera; Buffer 5x HF (NEB, Phusion), dNTP`s [2.5 mM], primer forward [10 µM] y reverse [10 µM], DNA templado [100 ng] y Phusion High fidelity DNA polymerase [1 U/50 µl de reacción] (NEB). Para la obtención de la unidad de expresión final de TPS1 se usaron los iniciadores p59880-F y TNOS-R que se detallan en la tabla 1. Los tres fragmentos se amplificaron de forma independiente y se ensamblaron como se indica en la sección 5.2.

5.6.2. Ensamblaje de la construcción GALK1.

La construcción GALK1, la cual está integrada por el promotor 59880 y el T-NOS (figura. 8b). El promotor vascular (Ruiz-Medrano y col., 2011) se amplificó usando los iniciadores p59880-F y 59880galk1connect-R descritos en la tabla 1. El programa empleado para la obtención del fragmento del promotor 59880 fue el siguiente un ciclo de inicial de pre-desnaturalización a 98°C por 30s, 30 ciclos [98°C durante 10 s, 60°C durante 35 s y 72°C durante 2 min], finalmente un ciclo de final de extensión de 72°C durante 10 min. El ORF del gen *galk1* se amplificó usando los iniciadores 59880galk1connect-F y

TNOSTps1connect-R los cuales se describen en la tabla 1, las condiciones de amplificación fueron las siguientes un ciclo de inicial de desnaturalización a 98°C por 30s, 30 ciclos [98°C durante 10 s, 60°C durante 30 s y 72°C por 2 min], finalmente un ciclo de final de extensión de 72°C durante 10 min. y finalmente el T-NOS se amplificó usando los iniciadores TNOSTps1connect-F y TNOS-R que se detallan en la tabla 1, y el programa utilizado fue el siguiente; un ciclo de inicial de desnaturalización a 98°C por 30s, 30 ciclos [98°C durante 10 s, 68°C durante 30 s y 72°C durante 30 s], finalmente un ciclo de final de extensión de 72°C durante 10 min. La mezcla de reacción fue: Buffer 5x HF (NEB, Phusion), dNTP`s [2.5 mM], primer forwar [10 µM] y reverse [10 µM], DNA templado [100 ng] y Phusion High fidelity DNA polymerase [1 U/50 µl de reacción] (NEB). Para la obtención de la unidad de expresión final de GALK1 se usaron los iniciadores p59880-F y TNOS-R detallados en la tabla 1. Los tres fragmentos fueron amplificados de forma independiente y ensamblados como se indica en el apartado 5.2.

5.6.3. Ensamblaje de la construcción STP1.

La unidad de expresión STP1 está integrada por el promotor KNAT1 y el terminador T-NOS (Figura 8c). El promotor KNAT1 se amplificó usando los iniciadores p-KNAT1-F y stp1knat1connect-R descritos en la tabla 1. El programa empleado para la obtención de este fragmento fue el siguiente; un ciclo de inicial de desnaturalización a 98°C por 30s, 30 ciclos [98°C durante 10 s, 58°C durante 30 s y 72°C durante 3 min] y un ciclo de final de extensión de 72°C durante 10 min. El ORF del gen *AtSTP1* se amplificó usando los iniciadores stp1knat1connect-F y TNOstp11-R que se describen en la tabla 1 y las condiciones de amplificación fueron las siguientes; un ciclo de inicial de desnaturalización a 98°C por 30s, 30 ciclos [98°C durante 10 s, 58°C durante 30s y 72°C por 1 min 30 s], y un ciclo de extensión final de 72°C durante 10 min. Y finalmente el T-NOS se amplificó usando los iniciadores TNOSstp1connect-F y TNOS-R. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente; un ciclo de inicial de desnaturalización a 98°C por 30s, 30 ciclos [98°C durante 10 s, 68°C durante 30s y 72°C durante 30 s], finalmente un ciclo de final de extensión de 72°C durante 10 min. La amplificación de los tres fragmentos se realizó como se describe a continuación; Buffer 5x HF (NEB, Phusion), dNTP`s [2.5 mM], primer forward [10 µM] y reverse [10 µM], DNA templado [100 ng] y Phusion High fidelity DNA polymerase [1 U/50 µl de reacción] (NEB) en un volumen final de 25 µl. Para la obtención de la unidad de

expresión final de *stp1* se usaron los iniciadores p59880-F y TNOS-R los cuales se describen en la tabla 1. Los tres fragmentos fueron amplificados de forma independiente y ensamblados como se indica en el apartado 5.2.

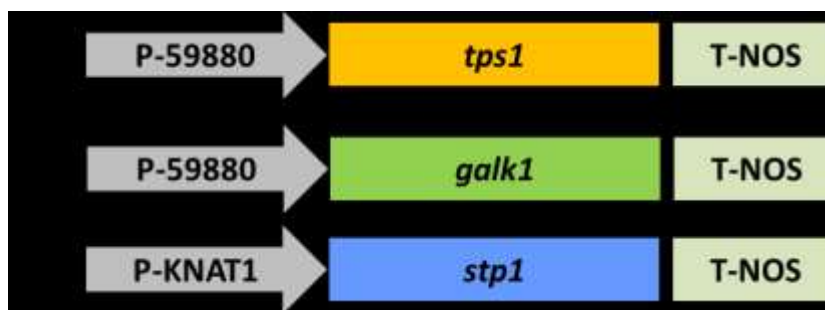


Figura 8. Diagrama de las construcciones utilizadas en durante el desarrollo de este proyecto. a) Unidad de expresión de TPS1; b) Unidad de expresión de GALK1 y c) Unidad de expresión *stp1*.

5.7. Obtención de plásmidos recombinantes de las construcciones.

Los productos de PCR de las tres construcciones ensambladas fueron purificados usando el kit comercial QIAquick PCR Purification (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los productos de PCR purificados se ligaron en el vector PCR*8/GW/TOPO (Figura 6a). Utilizando 1 μ l del producto de PCR purificado, 0.5 μ l de vector, 0.5 μ l de solución salina y el resto de agua bidestilada estéril hasta llegar a un volumen final de 3 μ l. La mezcla se incubó a 22°C. La mezcla se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α , se esparció en medio LB sólido con espectinomicina (100 mg/ml) y se incubó a 37°C durante aproximadamente 16 h, se seleccionaron colonias y se inocularon en medio TB con espectinomicina y se dejó incubar durante 16 h a 37°C a 120 rpm. La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo mediante la técnica de lisis alcalina. El DNA plasmídico se trató con RNasa A (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 1 h. El análisis de restricción se llevó a cabo usando la enzima EcoRI. La mezcla de reacción se describe a continuación; buffer EcoRI (10x), 1 μ g de plásmido y EcoRI (U/ μ l), se incubó a 37°C durante 1h. Los productos de restricción se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8% con TBE y 1 μ l de bromuro de etidio.

5.8. Subclonación en vector de expresión en planta.

Las construcciones clonadas en PCR8GWTOPO de las tres construcciones se linearizaron con la enzima restricción Xba (NEB), los linearizados se purificaron usando el kit comercial Qiagen PCR purification (QIAGEN). La subclonación se llevó a cabo en el vector pBGWFS7,0

(figura. 9), utilizando la LR clonasa (Invitrogen) con la siguiente mezcla de reacción; 150 ng de producto linearizado, 200 ng de vector binario pBGWFS7,0 y LR clonasa [U/ml], la mezcla se incubó a 22°C por 16 h. Células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α fueron transformadas y sembradas en LB agar con espectinomicina (100 μ g/ml). Se escogieron colonias, las cuales fueron inoculadas por separado en TB líquido con espectinomicina (100 μ g/ml) y finalmente se llevó a cabo la extracción y purificación de los plásmidos mediante lisis alcalina (Sambrock) y se incubadas a 37°C con RNAsa durante 1 h, en estos plásmidos se verificó la presencia del inserto usando la enzima de restricción EcoRI para cada una de las tres construcciones.

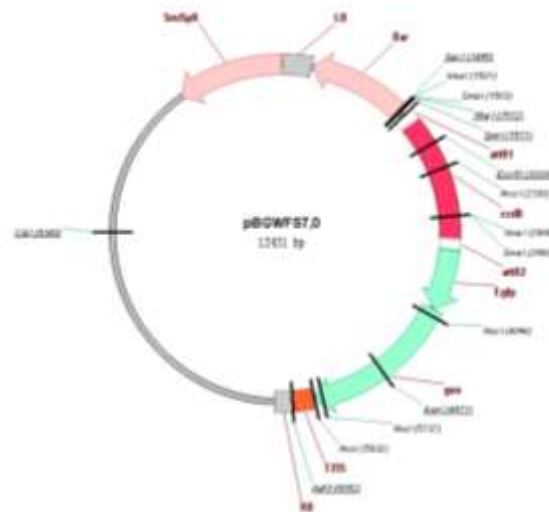


Figura 9. Vector Gateway pBGWFS7,0, utilizado como vector destino para la incorporación de la construcción en *A. thaliana*

5.9. Transformación por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens*.

Los plásmidos positivos en recombinantes clonados en el vector binario pBGWFS7,0 se purificaron y se transformaron células electrocompetentes de *A. tumefaciens* (C58C1). Se agregó 1 μ L de plásmido recombinante en pBGWFS7,0 a un vial de 50 μ L de células C58C1 y se añadió el volumen a una celda de electroporación de 1 mL, la cual se mantuvo en hielo durante 10 min antes de la transformación. Después se colocó la celda dentro del electroporador (Easyject, Optima) para dar un choque eléctrico (1800 mV). Inmediatamente se agregaron 250 μ L de medio LB-SOC, la mezcla se cambió a un tubo eppendorf estéril y se incubó a 28°C por 2 h a 120 rpm. Finalmente, se esparció en medio sólido LB con espectinomicina (100 μ g/ μ L), las cuales fueron incubadas a 28°C durante aproximadamente 48 h. Como último paso, se realizó la comprobación de la presencia de

cada uno de los insertos en las clonas candidatas mediante un análisis de restricción usando la enzima EcoRI.

5.10. Generación de plantas sobreexpresoras de *A. thaliana* por Inmersión Floral.

El método para transformar las plantas de *A. thaliana* es denominado "Floral Dip (FD, por sus siglas en inglés)" o "Inmersión Floral" (Clough & Bent., 1998). Se generaron céspedes de *A. tumefaciens* con cada una de las construcciones en cajas de medio sólido LB con espectinomicina crecidas a 28°C durante 48 h, el crecimiento masivo se resuspendió en 30 ml de buffer de Inmersión Floral (5% sacarosa, 0.02% Silwet L77, 10 mg/l de Benzilaminopurina). Se centrifugó a 6000 rpm a 4°C durante 10 min (Eppendorf, Centrifuge 5804R). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla nuevamente en 30 mL de buffer de inmersión floral. Finalmente, se resuspendió en 270 mL de buffer FD y se colocó en un recipiente. Cada planta se sumergió en la mezcla de *A. tumefaciens* con buffer FD durante 40 s (procurando empapar totalmente las flores jóvenes y no hojas de roseta) y después se colocaron de forma horizontal en una charola, cubriendo las plantas con papel húmedo. Estos se mantuvieron en reposo en una cámara de crecimiento a aproximadamente 20°C durante 2 días. Transcurrido este tiempo las plantas se trasladaron a invernadero, y se mantuvieron regadas con solución nutritiva fertilizante (Miracle-Grow®). Dichas plantas fueron crecidas en invernadero y cosechadas las semillas después de aproximadamente 2 meses.

5.11. Selección de plantas con glufosinato de amonio en sustrato.

Las semillas de las plantas transformadas se sembraron en tierra y se seleccionaron mediante glufosinato de amonio (1:300, Finale-Bayer) asperjándolas una vez por semana durante un mes. Las plantas que resistieron al herbicida se corroboraron por presencia de transgen. La detección de plantas con la construcción TPS1 se llevó a cabo con los iniciadores transgen59880 y tps1-transgen-R que se muestran en la tabla 1. El programa utilizado para su detección fue el siguiente: 94°C por 3 min, 30 ciclos [94°C por 35 s, 60°C durante 35 s y 72°C por 40 s]; finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 7 min. Las plantas transgénicas con la construcción GALK1 se verificaron con los iniciadores transgen59880 y galk1-transgen-R descritos en la tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes; 94°C por 3 min, 30 ciclos [94°C por 35 s, 62°C durante 35 s y 72°C por 40 s]; finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 7 min. Y finalmente

las plantas con la construcción STP1 se confirmaron con los iniciadores transgenkat1-F y stp1-transgen-R. La detección del transgen se llevó a cabo de la siguiente forma, 94°C por 3 min, 30 ciclos [94°C por 35 s, 60°C durante 35 s y 72°C por 40 s]; finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 7 min. La mezcla de reacción se realizó de la siguiente forma para las tres construcciones, buffer Ex Taq (10x, NEB), dNTP's [2.5 mM, NEB], iniciador forward [10 µM] e iniciador reverso [10 µM], DNA genómico [100 ng] y polimerasa Takara [U/µl]. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio.

5.12. Extracción y cuantificación de mRNA mediante qPCR de la construcción TPS1.

50 mg de cada uno de los tejidos (hojas de roseta y caulinar, tallo, raíz y silicuas) de dos líneas independientes fueron congelados con nitrógeno líquido y macerados con la ayuda de balines de acero inoxidable en un equipo Tissue Lyser LT (QIAGEN). La extracción de RNA total se realizó con el kit Direct-zol RNA miniprep (Zymo Research, Germany) siguiendo las instrucciones del proveedor. El mRNA fue llevado a una concentración de 25 ng/µl de cada una de las muestras. Los niveles de mRNA se cuantificaron usando un equipo StepOne Plus (Applied Biosystems). La cuantificación de mRNA se realizó en los cinco tejidos de la planta. Como gen normalizador se utilizó un fragmento de 120 pb del gen 18s, los iniciadores usados fueron; 18S-F y 18S-R y como gen blanco para la construcción TPS1 la cual los iniciadores son descritos en la tabla 1; TPS1-FqPCR y TPS1-RqPCR. La mezcla de reacción se realizó de la siguiente forma, KAPA SYBR FAST Master mix (2x), iniciador forward [10 µM], iniciador reverso [10 µM], KAPA RT mix (50x) y RNA [25 ng]. La síntesis cDNA fue hecha a 42°C durante 5 min, un paso de 94°C para inactivar la enzima RT por 5 min, un paso de desnaturalización 40x [95°C por 3 s y un paso de alineamiento/extensión a 60°C durante 20s]. La expresión relativa para la acumulación de mRNA se realizó de acuerdo al método de $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001).

5.13. Determinación de sitio de inserción mediante ddPCR.

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo con el kit (DNeasy kit, Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. La determinación de números de inserciones se llevó a cabo mediante un sistema droplet digital (ddPCR, Reader QX100, BioRad). Un fragmento de 107 pb de fue utilizado como secuencia blanco el gen BAR, las secuencia de la sonda y los iniciadores se muestran en la tabla 1, y como gen de referencia se utilizó una secuencia

de 120 pb del gen HMGB1 (AT3g51880), las secuencias tanto de la sonda como de los iniciadores usados para este ensayo se describen en la tabla 1. La mezcla de reacción fue preparada en una reacción dúplex en un volumen total de 20 μl , de la siguiente forma; 250 nm de sondas (FAM y HEX) y 900 nM de cada iniciador (ver tabla x) tanto de HMGB1 como de BAR, 2x de la mezcla de reacción (ddPCR supermix for probes, BioRad) y 5 ng de DNA genómico. Previamente el DNA genómico fue digerido con la enzima de restricción EcoRI (NEB) por 1 h a 37°C (Mazaika y Homsy, 2014). El programa utilizado es el siguiente; 94°C durante 10 min, después 40 ciclos de 94°C durante 30 s y 56°C por 1 min y finalmente un tiempo de extensión de 10 min a 98°C.

5.14. Evaluación fisiológica y medición de tasa fotosintética.

La evaluación fisiología de plantas homocigotas fueron evaluadas con los siguientes parámetros; talla, diámetro de roseta y tiempo de floración, por otro lado también se evaluó la tasa fotosintética, empleando un Sistema Portátil Licor con una cámara para Arabidopsis (LI-6400 XT, Lincoln, NE) provista de un cartucho de CO_2 [$400 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$], tanto de plantas mutantes como de plantas silvestres.

5.15. Extracción y evaluación en acumulación de trehalosa en la construcción de TPS1.

Las plantas fueron crecidas bajo condiciones de hidroponía (Conn y col., 2013). La extracción de disacáridos fosforilados se llevó a cabo mediante mezcla de tres plantas tanto de la construcción TPS1 L1 como TPS1 L2, y la preparación de la muestra se realizó de la siguiente manera; 50 mg de cada tejido fue congelado con N_2 líquido y macerado con balines de acero inoxidable en un equipo Tissue Lyser (Qiagen), las proteínas fueron precipitadas a partir del tejido pulverizado con 500 μl de una mezcla de cloroformo/acetonitrilo (3:7, v/v) (Invitrogen, grado HPLC) y la mezcla fue agitada constantemente a -20°C durante 2 h, los disacáridos fosforilados fueron extraídos dos veces con 400 μl de agua (Invitrogen, grado HPLC) a 4°C a partir de la fase orgánica agitando vigorosamente durante 5 min, seguido de una centrifugación a 13 000 rpm durante 4 min, la fase acuosa fue agrupada y posteriormente secada en una centrifuga de vacío (marca). La mezcla desecada fue reconstituida en 2 mL de agua (Invitrogen, grado HPLC) y posteriormente limpiada usando cartuchos SPE (Oasis Max cartridge, Waters), los cartuchos fueron preconditionados con 1 mL de metanol y 1 mL de agua, y entonces la

muestra fue cargada en los cartuchos y posteriormente lavada con 1 mL de agua y 1 mL metanol (Invitrogen, grado HPLC), para finalmente ser desorbidos con una mezcla fresca de 2% ácido fórmico en metanol (v/v) (Invitrogen, grado HPLC). El contenido de trehalosa fue estimado usando un ensayo fluorométrico (Carrillo y col., 2013), con mínimas modificaciones. La trehalasa se incubó con el extracto a 37°C durante 15 min y la cuantificación de la fluorescencia se realizó con el fluorómetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA). Las curvas estándar fueron generadas por triplicado con estándares conocidos de trehalosa (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) para inferir su concentración en los extractos de las plantas.

6. Resultados

6.1. AT5g59880 se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos vasculares de *A. thaliana*.

El promotor de Arabidopsis 1,5 kb AT5g59880, incluyendo el 5'UTR dirige la expresión del gen del factor de despolimerización de actina 3 (ADF-3), el cual se asocia al tejido vascular. Para este proyecto se utilizó una versión reducida, el cual incluye 1 kb de p59880 y el 5'UTR (1 151 pb) y fue capaz de dirigir la expresión cuando se fusionó al gen reportero GFP-GUS (Ruiz-Medrano y col., 2011, figura 10a). El análisis histológico GUS reveló la expresión de forma constitutiva en venas primarias, secundarias y terciarias tanto de roseta como en hoja caulinar, de igual forma se observó una expresión en también en raíz, en silicua se aprecia en venas que comprende la valva, también se observó una expresión en flores, y finalmente en tallo, el cual en su mayor parte es tejido criboso (figura 10b) Por lo que la versión mínima de p59880 fue seleccionada para dirigir la expresión tanto del gen TPS1 como del gen GALK1. En un corte transversal de tallo realizado se observó la expresión de p59880 en tejido vascular de *Arabidopsis thaliana*, verificando de esta manera que la expresión fue dirigida en ese tejido de la planta (figura 10c)

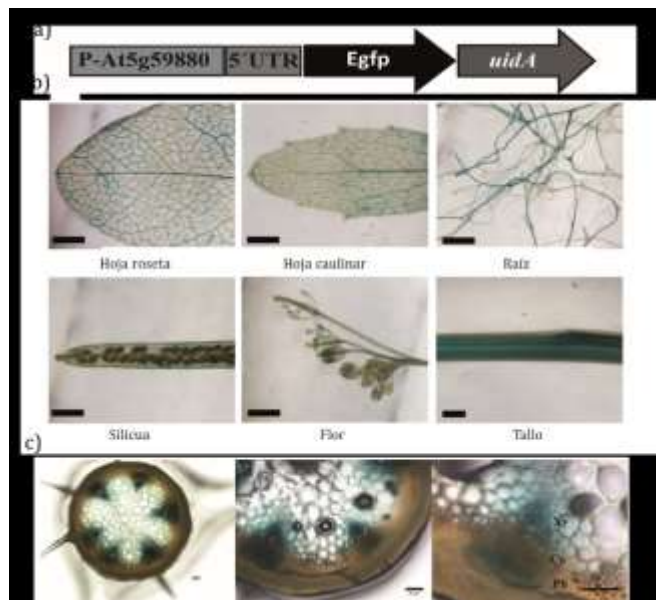


Figura 10. Análisis histoquímico del promotor 59880 en tejidos de *A. thaliana*. a) construcción del promotor vascular (At5g59880) con 5'UTR, dirigiendo la expresión de E-GFP-uidA. b) expresión de GUS en hojas de roseta, caulinar, raíz, silicua, flor y tallo en *A. thaliana* expresando la construcción del promotor vascular (barras = 2 mm) y c) corte transversal de tallo (barras = 5 mm). Xy, Xilema; Ca, Cambium y Ph =floema.

6.2. La amplificación de los genes *AtTPS1*, *AtGALK1* y *AtSTP1* se obtuvo del tamaño con respecto al reportado en bases de datos.

La figura 11 muestra la amplificación los ORF de los tres genes utilizados para los ensambles usando como templado cDNA de *Arabidopsis thaliana*. En la Figura 11a se amplificó un fragmento de 2829 pb correspondiente para el gen *AtTPS1*. En la Figura 11b se logró obtener un fragmento de 1491 pb el cual corresponde al tamaño del gen *AtGALK1* y finalmente en la Figura 11c se amplificó un fragmento de 1569 pb dicho fragmento amplificado corresponde al gen *AtSTP1*.

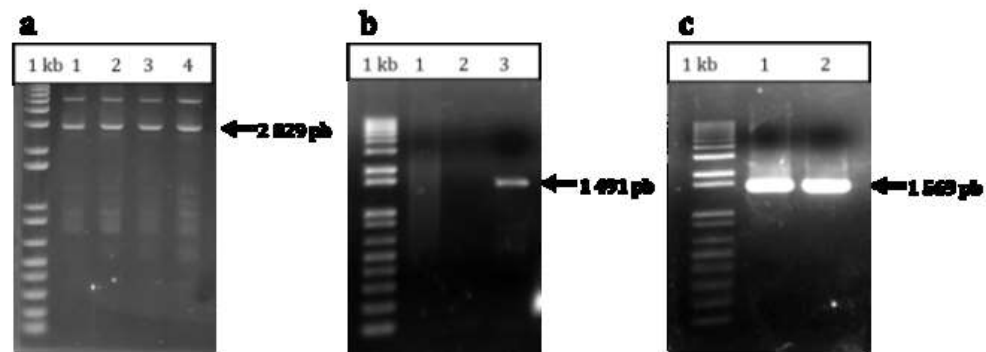


Figura 11. Amplificación de los marcos de lectura abierto de los genes, *AtSTP1*, *AtGALK1* y *AtTPS1* utilizando cDNA de *A. thaliana* como templado. a) Amplificación del gen *AtTPS1* con un tamaño de 2 829 pb; b) amplificación del gen *AtGALK1* con un amplicon de 1 491 pb y c) amplificación del gen *AtSTP1* de un tamaño de 1 569 pb. Usando como marcador de peso molecular 1kb plus (NEB).

6.3. Los genes clonados mostraron una identidad de 99% para *AtTPS1*, 98% para *AtGALK1* y 99% para *AtSTP1* con referencia a los reportados en base de datos.

Se llevó a cabo el análisis de restricción de los ORF clonados correspondientes a los genes *AtTPS1*, *AtGALK* y *AtSTP1*. La figura 12a muestra la liberación de dos fragmentos, uno de ellos de 2 253 pb y un segundo fragmento de 576 pb, este patrón de restricción corresponde al gen *AtTPS1* y se debe a que dicho gene contiene un sitio *EcoRI* en su secuencia. En la figura 12b se observa la liberación de un fragmento de un tamaño de 1 491 pb el cual es un fragmento esperado correspondiente al tamaño del gen *AtGALK1*. La figura 12c muestra el análisis de restricción para el gen *AtSTP1* en el cual se puede observar la liberación de un fragmento de 1 569 pb, esta banda corresponde al tamaño de este gen. Los tres clonas que contienen los genes *AtTPS1*, *AtGALK1* y *AtSTP1* se enviaron a secuenciar a, y el análisis BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) confirmo un 99%, 98% y 99% de identidad con las secuencias reportadas en la base de datos, respectivamente.

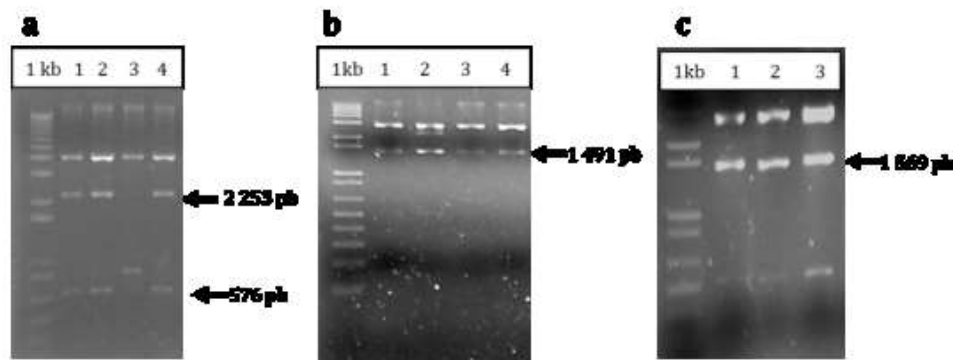


Figura 12. Análisis de restricción de los fragmentos correspondientes de los tres genes clonados usando la enzima de restricción EcoRI; 11a) Patrón de restricción del gen *AtTPS1* mostrando dos fragmentos el primero con un tamaño de 2 253 pb y el segundo de 576 pb, 11b) Análisis de restricción del gen *AtGALK1* con un tamaño 1 491 pb y 11c) Restricción del gen *AtSTP1* con un fragmento de un tamaño de 1 569 pb. Marcador de peso molecular 1kb plus ubicado en el carril 1 en los tres geles de electroforesis.

6.4. pKNAT1 amplificado y clonado mostró un 98% de identidad con la secuencia reportada en la base de datos.

La amplificación del promotor KNAT1 se realizó usando DNA genómico como templado *A. thaliana*. La Figura 13a muestra el producto de PCR obtenido del resultado de la amplificación fue de 2 356 pb, el cual corresponde al tamaño del promotor KNAT1 (figura 13a). El análisis de restricción fue realizado con la enzima EcoRI se observa en la figura 12b y el patrón de restricción mostro cuatro bandas de distintos tamaños 1 053 pb, 702 pb, 348 pb y 253 pb, este es debido a que la secuencia de pKNAT1 presenta tres sitios internos para la enzima EcoRI. La clona fue enviada a secuenciar a LANGEBIO en CINVESTAV-Irapuato, y mediante un análisis BLAST se encontró que dicha secuencia mostró una identidad del 98% con la reportada en la base de datos del NCBI.

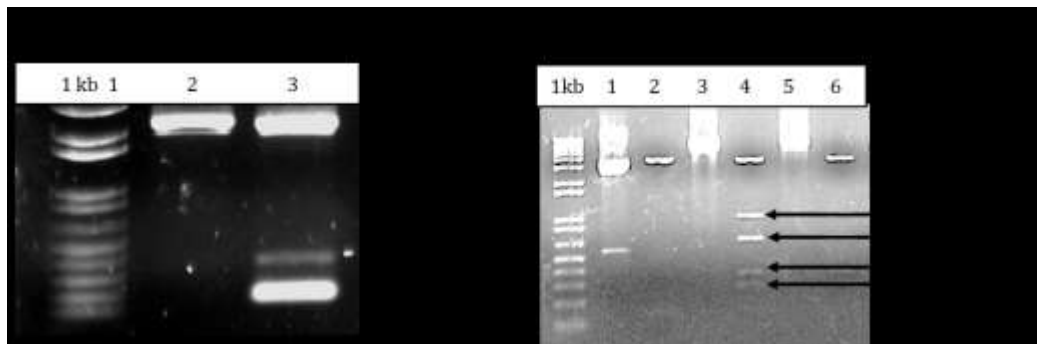


Figura 13. Amplificación y clonación del promotor KNAT1 en pDrive. a) amplificación del promotor KNAT1 de un tamaño de 2 356 pb. b) clonación de pKNAT1 con un patrón de restricción de diferentes tamaños (1053, 702, 348 y 253 pb). Marcador de peso molecular de 1 kb plus.

6.5. Las unidades de expresión de TPS1, GALK1 y STP1 fueron obtenidas con el tamaño esperado mediante la técnica de PCR de ensamblaje.

Con la finalidad de construir las unidades de expresión se utilizó la técnica de PCR de ensamblaje. La Figura 13a muestran la amplificación de los genes por separado y en la Figura 13b se observa la obtención de la construcción correspondiente al gen *AtTPS1* el cual está fusionado con el p59880 y el TNOS mostrando un tamaño total de 4 274 pb. El gen *AtGALK1* fue ensamblado con p59880 y TNOS, la Figura 13c muestra la amplificación de los fragmentos a ensamblar por separado y la Figura 13d muestra la amplificación de la construcción completa que consta de un tamaño total 2937 pb. El gen *AtSTP1* fue unido a pKNAT1 y TNOS, la Figura 13e muestra la amplificación de cada uno de los fragmentos que fueron ensamblados y la Figura 13f muestra la construcción completa para el gen *AtSTP1* con un tamaño total de 4219 pb. Las construcciones fueron enviadas a secuenciar.

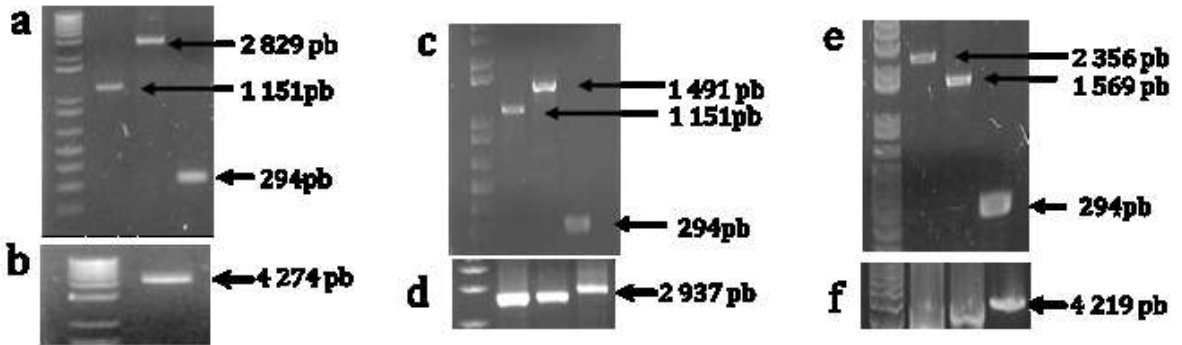


Figura 14. Ensamble de los genes AtTPS1, AtGALK1 y AtSTP1. Figura a Amplificación de los fragmentos p59880, AtTPS1 y TNOS usando como molde los vectores en los cuales fueron clonados. b) construcción completa correspondiente a TPS1, c) amplificación de los fragmentos p59880, STP1 y TNOS, Figura 1d) obtención de la construcción completa correspondiente a GALK1, E) amplificación de los fragmentos pKANT1, STP1 y TNOS, f) construcción completa de STP1. Marcador de peso molecular 1kb plus.

6.6. Las construcciones fueron clonadas en el vector PCR8*GWTOPO y subclonadas en pBGWFS7,0 y analizadas por restricción.

La restricción correspondiente a la construcción TPS1 se observa en la Figura 15a y 15b (PCR8GWTOPO y pBGWFS,0; respectivamente) en la cual se observan cuatro bandas del resultado de esta restricción las cuales son de; 2632 pb, 947 pb, 497 pb y 198 pb. Para la construcción GALK1 en la figura 15c y 15d (PCR8GWTOPO y pBGWFS,0; respectivamente) se observó un patrón de restricción de tres fragmentos de tamaños 2241 pb 497 pb y 198 pb en ambos plásmidos. En el análisis de restricción de la construcción STP1 se obtuvieron bandas de 2211 pb, 1053 pb, 757 pb y 253 pb tal como se muestra en la figura 15d y 15e (PCR8GWTOPO y pBGWFS,0; respectivamente) El patrón de bandeado que resulto de estos análisis de restricción se debió a que las tres construcciones presentan sitios EcoRI dentro de sus secuencias.

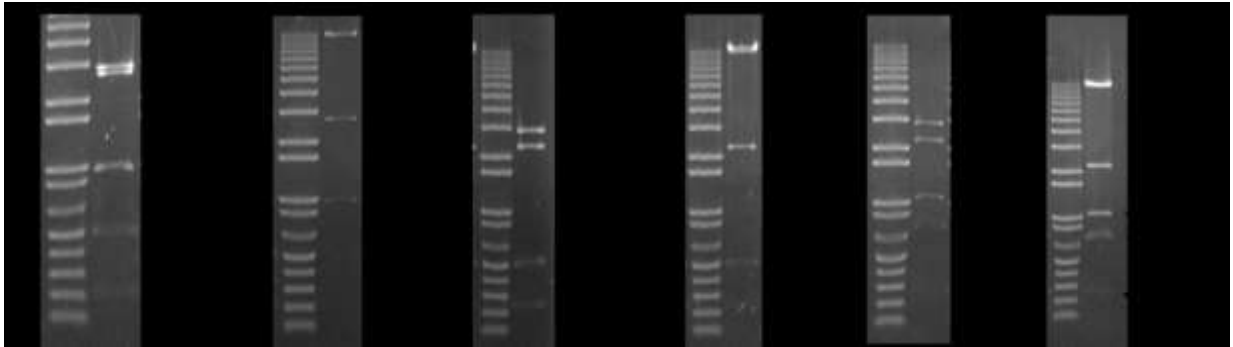


Figura 15. Análisis de restricción usando la enzima EcoRI para cada una de las construcciones en PCR8GWTOPO y en pBGWFS7,0. a y b) Análisis de restricción que presento la construcción AtTPS1; c y d) Patrón de restricción de las construcciones correspondientes a AtGALK1; e y f) Análisis de restricción de la construcción AtSTP1.

6.7. Se obtuvieron dos líneas independientes de TPS1.

En la figura 16 se muestran dos líneas independientes para la construcción TPS1, que mostraron resistencia al glufosinato de amonio, las cuales también fueron confirmadas por PCR punto final, lo cual se observa en la Figura 16a dando como resultado una banda positiva de 500 pb, la cual corresponde a un fragmento de p59880 y un fragmento que corresponde al ORF del gen *AtTPS1*. Dichas líneas fueron denominadas TPS1 L1 y TPS1 L2. En la figura 16b se muestra el número de copias en estas líneas independientes mostrando una sola inserción en el genoma de las mutantes.

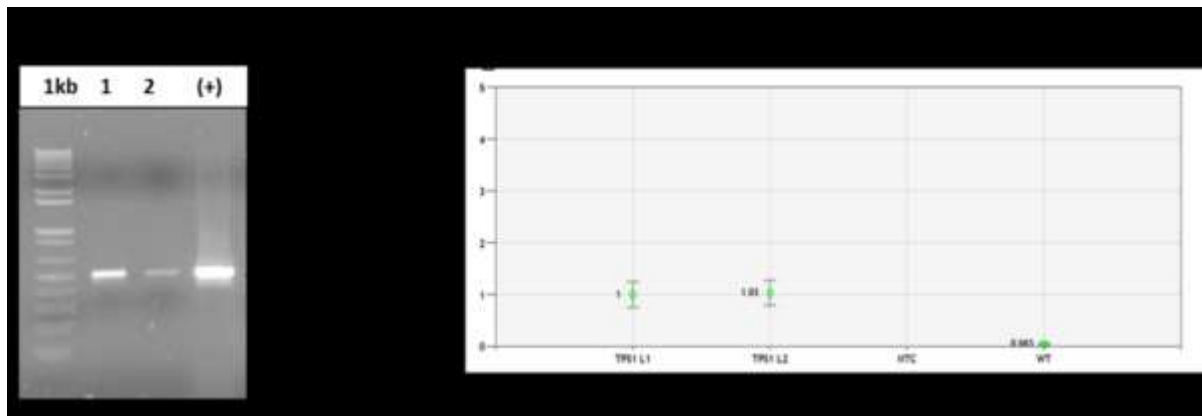


Figura 16. Confirmación de plantas transformadas y número de copias para TPS1. a) PCR punto final para plantas transformadas con resistencia a glufosinato de amonio que muestran un tamaño de un fragmento no endógeno de 500 pb. b) Análisis de número de copias realizado por ddPCR usando HMGB1 como gen de referencia para dos líneas de la construcción TPS1.

6.8. Se obtuvieron dos líneas independientes de GALK1.

La Figura 17 muestra la obtención de dos líneas independientes para la construcción GALK1 dichas líneas mostraron resistencia al glufosinato de amonio y posteriormente fueron confirmadas por PCR punto final tal como se muestra en la Figura 17a, dicho fragmento analizado corresponde a un fragmento de p59880 y a un segmento del ORF del gen *AtTPS1*. Estas líneas fueron analizadas para observar el número de eventos de inserción tal como se observa en la Figura 17b dando como resultado una copina en cada una de las líneas.

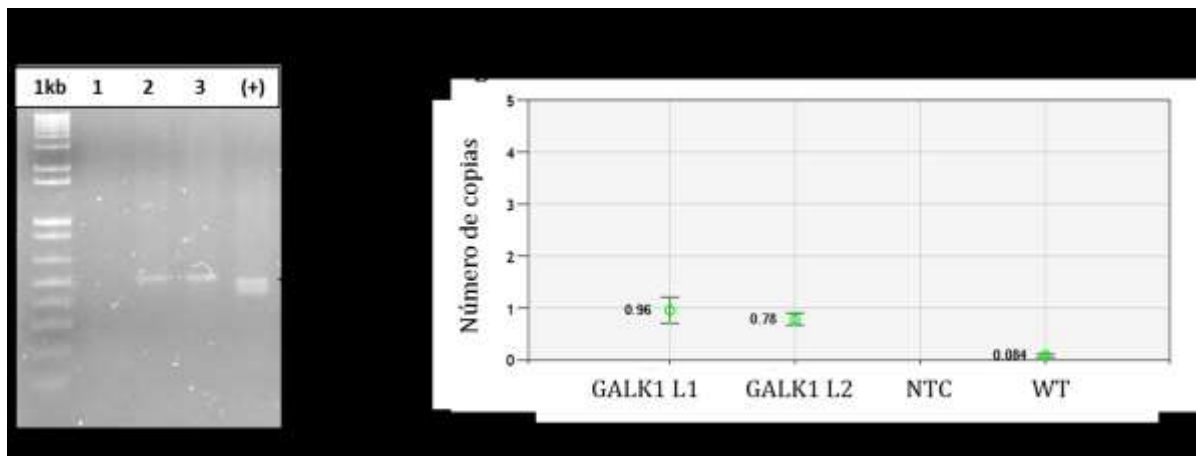


Figura 17. Confirmación de plantas transformadas y número de copias para GALK1. a) PCR punto final para plantas transformadas que muestran un tamaño de un fragmento no endógeno de 500 pb y b) Análisis de número de copias realizado por ddPCR usando HMGB1 como gen de referencia para dos líneas de la construcción TPS1.

6.9. Se obtuvieron seis líneas independientes de TPS1.

En la Figura 18 muestra la obtención de seis líneas independientes de la construcción STP1 y fueron confirmadas mediante PCR punto final, la amplificación de este fragmento consta de un segmento de pKANT1 y un fragmento del ORF de STP1. En la figura 18a dando como resultado una banda positiva de 500 pb, la cual corresponde a un fragmento de p59880 y un fragmento que corresponde al ORF del gen *AtTPS1*.

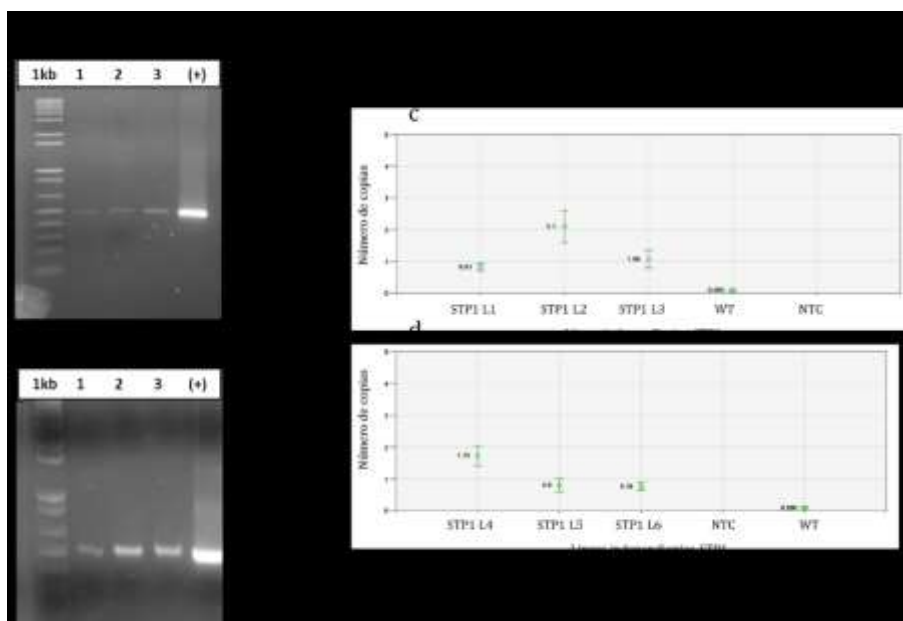


Figura 18. Confirmación de plantas transformadas y número de copias para STP1. a y b) PCR punto final para plantas transformadas con resistencia a glufosinato de amonio que muestran un tamaño de un fragmento no endógeno de 500 pb. c y d) Análisis de número de copias realizado por ddPCR usando HMGB1 como gen de referencia para dos líneas de la construcción TPS1.

6.10. La tasa fotosintética de TPS1 no varío, pero mostraron diferencias fenotípicas comparadas con las WT.

El desarrollo de tanto vegetativo y los tejidos reproductivos reveló características interesantes cuando se compara con plantas silvestres. El tallo de la inflorescencia en las plantas TPS1 surgió en un promedio de 8 días antes de las WT; También, los tallos fueron más largos. Las plantas que se muestra antes de la floración cuando crecen tanto en condiciones hidropónicas como en macetas (Figura. 19a y 19b). El brote floral se produjo a los 21 días después de la germinación en TPS1 líneas, mientras que se observó a los 29 días después de la germinación en plantas WT. No se observaron diferencias significativas en la morfología de la semilla y el número de semillas por planta, lo que indica que la floración precoz en TPS1 plantas no comprometió el desarrollo reproductivo de la planta. La capacidad fotosintética también se midió en las plantas que expresan TPS1, donde no se observaron diferencias significativas en la irradiación constante; las tasas medias obtenidas en TPS1 y WT fueron $8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $7,5 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (figura. 19c). Líneas TPS1 que expresan consistentemente muestran un color verde más oscuro en las hojas maduras, a pesar de la tasa de fotosíntesis similar en la radiación constante.

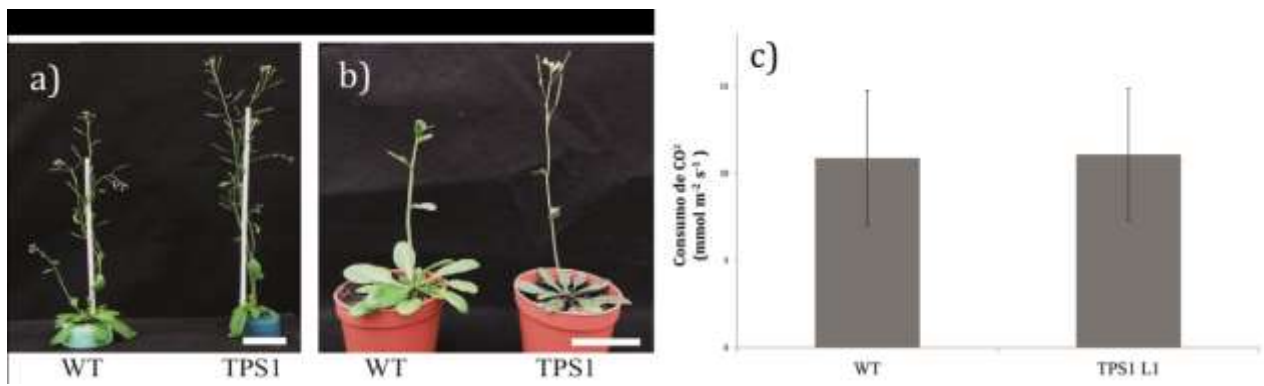


Figura 19. Parámetros fisiológicos y fenotípicos de plantas a las 6 semanas de edad. a) plantas cultivadas en condiciones de hidropónicas, b) cultivadas en macetas (barras = 5 cm) y c) tasa de fotosíntesis en TPS1 L1 y WT. Las plantas medidas a los 28 días de edad de cada genotipo se midieron ($\alpha = 0.05$).

6.11. Líneas transgénicas de la mutante *tps1* reflejaron mayor acumulación de mRNA comparada con la WT.

En la figura 20 se muestra que la acumulación del mRNA del gen *TPS1* fue similar en todos los tejidos analizados en plantas silvestre; sin embargo, hubo diferencias en la acumulación de mRNA en ambas líneas TPS1 comparadas con las plantas control. Los niveles más altos de acumulación de mRNA TPS1 se observaron en hojas de roseta en las dos líneas L1 y L2, dos y tres veces mayor que WT y en hojas caulinares las cuales mostraron 2 y 1,5 veces más TPS1 ARNm en las plantas en comparación con WT sobreexpresan; sin embargo, no hubo diferencias entre las plantas transgénicas y WT en tallos y raíces.

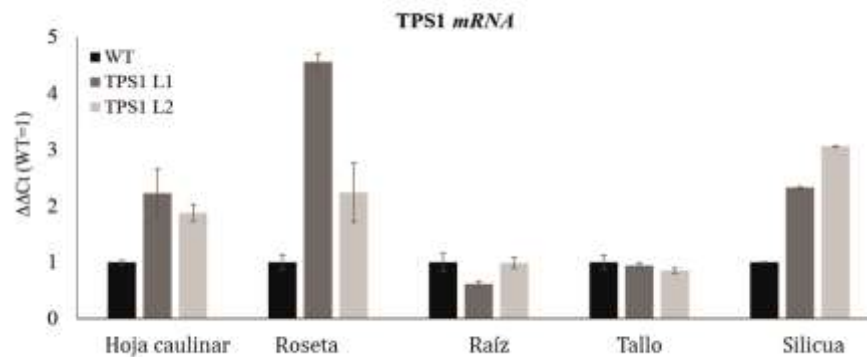


Figura 20. Expresión relativa del gen *TPS1* en plantas transgénicas y de silvestres en raíces, tallos, hojas caulinares, hojas en roseta y silicuas. El $\Delta\Delta C_t$ se calculó empleando 18S rRNA para normalizar la expresión.

6.12. Detección de la acumulación de mRNA de Flowering Locus T en líneas transgénicas de TPS1.

Como control interno para evaluar la reprogramación de floración temprana de las líneas de TPS1, Flowering Locus T (FT) mRNA se seleccionó y se cuantificó, ya que se ha reportado ampliamente que induce la floración en las plantas a través de la translocación de la proteína a partir de hojas maduras al ápice a través del floema (Kardailsky y col., 1999; Corbesier y col, 2007; Lin y col, 2007). Transcritos de FT fueron detectados por qRT-PCR en hojas caulinares y de roseta en las dos líneas que sobreexpresan TPS1 y WT plantas de la misma edad. mRNA de FT se acumuló en hojas caulinares de TPS1 L1 y L2 2 y 1.5 veces más que en WT, respectivamente, mientras que las hojas de roseta mostraron un aumento de 1.4 veces en relación con las plantas WT (figura 21).

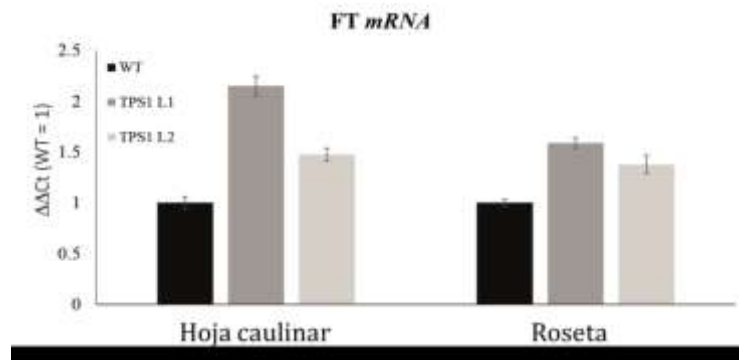


Figura 21. Expresión relativa del gen Flowering Locus T (FT) en hojas caulinares y de roseta de líneas que sobreexpresan el gen TPS1 comparadas con planta silvestres. El $\Delta\Delta C_t$ se calculó empleando 18S rRNA para normalizar la expresión.

6.13. Trehalosa se acumula en altos niveles en mutantes TPS1 de Arabidopsis en comparación a la WT.

La acumulación de trehalosa, como una prueba de los niveles de acumulación de T6P, se cuantificó en diferentes tejidos de plantas transgénicas empleando un sensible ensayo fluorométrico. Las líneas que sobreexpresan TPS1 con p59880 mostraron una importante acumulación de este disacárido en hojas caulinares y rosetas, 2.8 y 6.3 veces mayor que las plantas WT. De hecho, en hojas caulinares el contenido de trehalosa en plantas transgénicas fue de 117 nmol g⁻¹ (peso fresco (FW)), en comparación con 42 nmol g⁻¹ (FW) en las plantas de control. En hojas de roseta la acumulación de trehalosa fue de 133 nmol g⁻¹ en TPS1 expresando líneas, en comparación con 21 nmol g⁻¹ (FW) en las plantas de control. Una acumulación ligeramente más alta se midió en los tallos mientras que se observó la acumulación

de trehalosa similar en raíces y silicuas (Figura 21). Por lo tanto, la sobreexpresión de este gen en el tejido vascular conduce a un mayor contenido de trehalosa principalmente en hojas en roseta y caulinares (Figura 21)

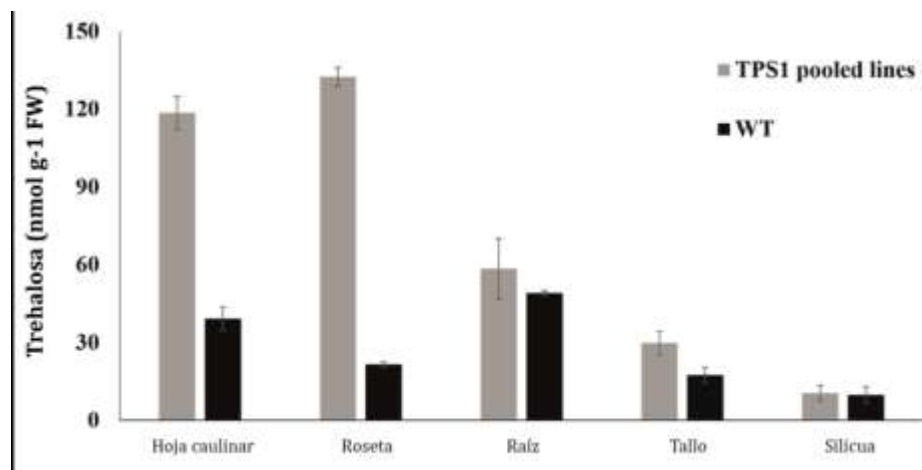


Figura 22. Acumulación de trehalosa en plantas transgénicas y silvestres en hoja caulinar, hoja de roseta, raíz, tallo y silicua.

7. Discusión

Algunas estrategias para el mejoramiento genético de los cultivos se han centrado en la manipulación de productividad de la planta mediante el aumento de la síntesis de azúcares y la movilización de la fuente al sumidero tejidos (Li y col, 2011; Singh y col., 2011). Un enfoque complementario consiste en aumentar los niveles de ciertos azúcares que actúan como moléculas de señalización que puede regular los procesos de desarrollo en plantas, tales como la aceleración del proceso de floración y la tolerancia tanto a estrés biótico y abiótico (Tsai y Gazzarrini, 2014). La transición del crecimiento vegetativo de la floración está muy regulada en las plantas, en función de las dos señales de desarrollo y ambientales (Corbesier y col, 2007; Lin y col., 2007). La trehalosa fosfato sintasa 1 (TPS1) y su producto, trehalosa-6-fosfato (T6P), se consideran un paso clave en la transición del crecimiento vegetativo de la floración; se ha descrito que T6P podría activar la transcripción del gen de FT en las hojas, que es un inductor esencial de la floración (Van Dijken y col, 2004; Golembeski y col, 2014., Wahl y col, 2013). Desde la síntesis de trehalosa y su acumulación en el citosol, es razonable suponer que su acumulación en el tejido vascular y, sobre todo, en el floema, conduciría a su distribución dentro de toda la planta, incluidos los tejidos que responden a esta molécula. Por lo tanto, en el presente trabajo se ha sobreexpresado TPS1 de Arabidopsis específicamente en el tejido vascular mediante el uso de un promotor específico vascular (Ruiz-Medrano y col., 2011), con el fin de entender su efecto en el desarrollo de la planta. El tejido vascular ha surgido recientemente como un conducto central para la distribución de señales que integran desarrollo de la planta y las respuestas a señales ambientales (Lucas y col., 2013). La sobreexpresión de TPS1 causó que la trehalosa al acumularse en hojas caulinares y de roseta, en equilibrio con la naturaleza autótrofa de estos tejidos. La trehalosa podría actuar como una molécula de señal que estimula la floración, antes de FT es en realidad inducida por el fotoperiodo en Arabidopsis; esto sugiere que la vía de trehalosa es probable que induzca a los conocidos de FT que se encuentran antes en la ruta metabólica. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos (Wahl y col, 2013; Dijken y col, 2004). En contraste con los reportes anteriores que muestran que la trehalosa y T6P juegan un papel importante en el aumento de la capacidad fotosintética de las diferentes especies de plantas, en esta investigación no detectaron diferencias en la capacidad fotosintética medidas en irradiación constante de plantas que sobreexpresan TPS1 en comparación con

plantas WT. Será de interés para probar diferentes niveles de irradiación para identificar posibles diferencias en este parámetro fisiológico importante. Hojas de roseta de color verde más oscuro se observaron en las líneas que sobreexpresan TPS1, ocurriendo lo mismo en *Nicotiana tabacum* que expresan TPS1 (Otsa) de *E. coli* y levadura; acumulando antocianinas, probablemente debido a estrés fisiológico (Schluepmann y col., 2003). A pesar de la importancia de la trehalosa y T6P en defensa de la planta y en floración, la expresión del gen de TPS que emplea un promotor fuerte, constitutivo dio lugar a fenotipos perjudiciales (Schluepmann y col, 2003; Gómez y col, 2010). Teniendo en cuenta que la expresión constitutiva podría enmascarar trehalosa normal y rendimiento T6P, el efecto de la expresión TPS1 en el tejido vascular se estudió en este trabajo; de hecho, los principales efectos perjudiciales no se observaron en el presente caso. Es importante considerar que *Arabidopsis* es principalmente un cargador apoplástico de fotoasimilados, tan fuertemente sugerido por los simportadores disacáridos identificados en su genoma. Sin embargo, su capacidad de síntesis de azúcares en la vasculatura (más precisamente, en la célula acompañante) podría inducir la translocación simplásmica de nutrientes, lo que proporciona direccionalidad a trehalosa de la fuente a hundirse tejidos. La transición del crecimiento vegetativo a floración está muy regulada en las plantas, en función de las dos señales de desarrollo y ambientales (Song y col., 2015). T6P puede activar la transcripción del gen de FT en hojas (Golembeski y col., 2014). Hemos observado que las plantas que contienen la construcción TPS1 aceleraron la transición del crecimiento vegetativo a la floración, en comparación con las plantas de tipo salvaje; por lo que es posible que la trehalosa pudiera estar actuando como un modulador de floración en este proceso. Este resultado está de acuerdo con otros trabajos que demuestran que TPS1 es esencial para la transición de la fase vegetativa a la floración y TPS1; de hecho, knock out de este gen provocó un retraso en la floración en *Arabidopsis* (Van Dijken y col, 2004; Wahl y col, 2013). Se observó una alta acumulación de trehalosa en hojas en roseta y caulinares, en contraste con las silicuas, en los que los niveles de trehalosa eran similares a WT. La síntesis de trehalosa puede ser también inducido por el estrés abiótico como se observa en el arroz; la expresión de TPS1 bajo el control del promotor de actina de arroz aumentó la acumulación de trehalosa (Garg y col, 2002; Li y col., 2011). Los resultados presentados aquí indican que la expresión vascular de TPS1 inducida floración temprana, sin comprometer desarrollo de la planta, en contraste con la expresión TPS1 impulsado por

el promotor constitutivo 35S de CaMV en *N. tabacum*, donde las plantas muestran un fenotipo atrofiado (Schluepmann y col., 2003; Gómez y col, 2010). Arabidopsis muestra una carga/descarga apoplástica de fotoasimilados, la expresión de TPS1 bajo la expresión de un promotor vascular no tuvo un efecto importante sobre la movilización de azúcar; Sin embargo, se observó diferencia de contenido de acumulación de mRNA del gen TPS1 y en el contenido de trehalosa lo que sugiere que pudo haber una movilización de trehalosa de forma simplásmica para llegar a los tejidos heterotróficos. El aumento en la acumulación de trehalosa y probablemente de T6P en la en el tejido vascular, fue debido a la expresión ectópica de TPS1, podría saturar la ruta de transporte apoplástico, mediada por simportadores y de esta forma limitando la translocación de fotoasimilados a los tejidos heterotróficos. Sin embargo, una segunda ruta de movilización, representado por el transporte simplástico pudo contribuir a evitar la limitación del transporte apoplástico, permitiendo a estos azúcares de señalización llegar a los tejidos consumidores a través del tejido vascular. Sin embargo, es necesaria más investigación en plantas con carga/descarga simplástica, para entender el papel de la trehalosa y T6P en la regulación en el desarrollo de la planta.

8. Conclusiones globales

El uso de promotores específicos de algún tejido determinado puede dar resultados muy satisfactorios usando genes importantes que modulen en este caso, síntesis o transporte de monosacáridos, o bien si se desea conferir alguna propiedad que permita a las plantas protegerse de diferentes tipos de estrés. Debido a los resultados obtenidos principalmente para la construcción correspondiente al gen *TPS1*, se puede concluir que las mutantes al presentar una sola inserción en su genoma fueron capaces de provocar cambios fenotípico y genotípico en dichas mutantes. A nivel transcripcional para el gen endógeno al mostrar un incremento, también condujo al incremento de FT, un gen involucrado en la floración, por lo tanto, la fusión de un promotor específico de floema a dicho gen causó una aceleración en el tiempo de floración en *A. thaliana*, así como la acumulación de un metabolito secundario, el cual es la molécula de trehalosa. Por lo que el hecho de que este gen puede actuar como un blanco para acelerar el tiempo de floración, siendo una opción viable para aplicarse a otras especies de plantas de interés agrícola. Por otro lado, las construcciones correspondientes a los genes *GALK1* y *STP1* que fueron fusionados a promotores específicos (59880 y *KNAT1*, respectivamente) al ser dirigidos hacia un tejido determinado, podrían causar algún fenotipo en plantas de *A. thaliana*.

9. Recomendaciones

Dentro de las recomendaciones, los tres genes trabajados durante este proyecto podrían ser fusionados a otro tipo de promotores para observar cambios fenotípicos y genotípicos en plantas y/o que confiera propiedades que pueda beneficiar a las plantas. También se pueden realizar experimentos de estrés biótico o abiótico a las dos mutantes encontradas de la construcción 59880::tps1::TNOS, para observar si al igual que otras referencias bibliográficas dicho gen pueda proveer resistencia a diferentes tipos de estrés. Para continuar con este trabajo se recomienda terminar de evaluar los parámetros de las 2 mutantes obtenidas con la construcción pertenecientes a la construcción de la unidad de expresión 59880::galk1::TNOS, considerando que este gen es importante en crecimiento y desarrollo en plantas, esto es según referencias bibliográficas publicadas recientemente, sin embargo, la información con la que se cuenta respecto a este gen es muy limitada por lo que se podría aportar más terminando los experimentos que quedaron inconclusos pudiendo ser un potencial regulador a nivel transcripcional, modulando la expresión de algunos genes importantes en regulación génica involucrados en desarrollo y crecimiento de plantas. Por otro lado, para la unidad de expresión KNAT1::spo1::TNOS debido a que se obtuvieron seis líneas independientes es necesario evaluar dichas líneas en cuanto a parámetros fisiológicos, moleculares y bioquímicos, para observar si dicho transportador es importante en *A. thaliana*.

10. Referencias bibliográficas.

1. Afoufa-bastien D., Medici A., Jeauffre J., Coutos-Thévenot P., Lemoine R., y Laloi M. (2010). The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling. *BMC Plant Biol.* 12;10:245.
2. Boorer K. J., Loo D. D., Wright E. M. (1994). Steady-state and presteady-state kinetics of the H⁺/hexose cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Xenopus oocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(32), 20417–20424
3. Büttner M. (2010). The *Arabidopsis* sugar transporter (AtSTP) family: an update. *Plant Biology*. 1438-8677.
4. Büttner M. (2007). The monosaccharide transporter (-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*. 581 2318–2324.
5. Braun D. M., Slewinski T. L. (2009). Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of Sucrose Transporters and Tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiol.* 149: 71–81.
6. Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C., Coupland G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316: 1030-1033.
7. Córdoba E., Aceves-Zamudio D. L., Hernández-Bernal A. F., Ramos-Vega M., León P. (2014). Sugar regulation of *SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1 (STP1)* expression in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 66; 147-59.
8. Conn S. J., Hocking B., Dayod M., Xu B., Athman A., Henderson S., Aukett L., Conn V., Shearer M. K., Fuentes S., Tyerman S. D., Gilliam M. (2013). Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants *Plant Methods*. 4(1): 5-9.
9. Clough S. J and Bent A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* 16 (6): 735-43.
10. Dai N., Schaffer A., Petreikov A., Shahak Y., Giller Y., Ratner K., Levine A., Granot D. (1999). Overexpression of *Arabidopsis* Hexokinase in Tomato Plants Inhibits Growth, Reduces Photosynthesis, and Induces Rapid Senescence. *Plant Cell*. 11(7): 1257-1260.
11. Eastmond P. J., Van Dijken A. J. H., Spielman M., Kerr A., Tissier A. F., Dickinson H. G., Jones J. D. G., Smeekens S. C., Graham I. A. (2002). Trehalose-6-phosphate synthase 1,

- which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *The Plant Journal* 29(2):225-235.
12. Egert A., Peters S., Guyot C., Stieger B., Keller F. (2012). An *Arabidopsis* T-DNA Insertion Mutant for Galactokinase (AtGALK, At3g06580) Hyperaccumulates Free Galactose and is Insensitive to Exogenous Galactose. *Plant Cell Physiology*. 53(5): 921-929.
 13. Golembeski G. S., Kinmonth-Schults H. A., Song Y. H., Imaizumi T. (2014). Photoperiodic flowering regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Adv Bot Res*. 72: 1-28.
 14. Goddijn O., Smeekens S. (1998). Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant Journal*. 14: 143–146.
 15. Granot D., Rakefet David-Schwartz R., Kelly G. (2013). Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *FrontiersPlant Science*. 4-44
 16. Gómez L. D., Gilday A. Feil R., Lunn J. E., Graham I. A. (2010). AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. *Plant Journal*. 64(1):1-13.
 17. Hanson, R.W. (2000). Nutrient control of gene transcription. *Journal Biology Chemistry*. 66(1): 147-59.
 18. Kaplan C. P., Tugal H. B., Baker A., (1997). Isolation of a cDNA encoding an *Arabidopsis* galactokinase by functional expression in yeast. *Plant Molecular Biology*. 34(3): 497-506.
 19. Koch K. E. (1996). Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:509–540.
 20. Kondrak M., Marincs F., Antal F., Juhász Z., Bánfalvi Z. (2011). Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. *BMC Plant Biol*. 30: 12-74.
 21. Lalonde S., Boles E., Hellmann H., Barker L., Patrick, J. W., Frommer, W. B., and Ward J. M. (1999). The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell*. 11: 707–726.
 22. Lalonde S. W. D., Frommer W. B. (2004). Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55: 341–372.
 23. Lucas W. J. (2010). Plant Vascular Biology and Agriculture. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52 (1): 4–7.

24. Li H. W., Zang B.S., Deng X.W., Wang X.P. (2011). Overexpression of the trehalose 6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta*. 234: 1007-1018.
25. Lin M. K., Belanger Lee Y. J., Varkonyi-Gasic E., Taoka K-I, Miura E, Xoconostle-Cázares B., Gendler K., Jorgensen R. A., Phinney B., Lough T. J., Lucas W. J. (2007). FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits plant *Cell*. 19: 1488-1506.
26. Livak J., Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} Method. *Methods*. 402-408.
27. Lyu J. I., Sung Ran Min S. R., Lee J. H., Lim Y. H., Kim J. K., Bae C. H., Liu J. R. (2013). Overexpression of a trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene enhances tolerance and photosynthesis during drought and salt stress without growth aberrations in tomato. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 112: 257–262.
28. Mazaika E., Homsy J. (2014). Digital Droplet PCR: CNV Analysis and Other Applications. *Current Protocols in Human Genetics*. 82 (7.24.1-7.24-13). DOI: 10.1002/0471142905.hg0724s82.
29. Neufeld E. F., Feingold D. S., Hassid W. Z. (1960). Phosphorylation of D-Galactose and L-Arabinose by Extracts from *Phaseolus aureus* Seedlings. *The Journal of Biological Chemistry*. J. Bio Chem. Vol. 235: 906-909.
30. Nunes C., O'Hara L. E., Primavesi L. F., Delatte T. L., Schlupepmann H., Somsen G. W., Silva A. B., Fevereiro P. S., Wingler A., Paul M. J. (2013). The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation. *Plant Physiol*. 162(3):1720-1732.
31. Pakrash M. D., Shurbi N., John B. P. (1982). The lectin nature of α -galactosidases from *Vicia faba* seeds. *FEBS Letters*. Vol. 150(1): 233-237.
32. Pellny T. K., Ghanoumm O., Conroy J. P., Schlupepmann H., Smeekens S., Andralojc J., Krause K. P., Goddjinn O., Paul M. J. (2004). Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnol J*. 2(1):71-82.
33. Rolland F., Winderickx, J., Thevelein J. M. (2001). Glucose sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci*. 26: 310–317.
34. Rennie E. A., Turgeon R. (2009). A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 14162–14167.

35. Reidel E. J., Rennie E. A., Amiard V., Cheng L., Turgeon R. (2009). Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiol.* 149: 1601–1608.
36. Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B., Kook Ham B., LI G., Lucas W. J. (2011). Vascular expression in *Arabidopsis* is predicted by the frequency of CT/GA-rich repeats in gene promoters. *Plant J.* 67(1): 130-44.
37. Sauer N., (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letter* 581: 2309–2317.
38. Sauer N., Friedländer K., Gräml-Wicke U. (1990). Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal.* 9(10): 3045–3050.
39. Sauer N., Tanner W. (1989). The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eucaryotic H⁺-cotransporter. *FEBS Letter.* 259(1): 43-56.
40. Schluepmann H., Pellny T., Dijken A., Smeekens S., Matthew P. (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS.* 100 (11): 6849-6854.
41. Sheen, J. (1999). C4 gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 187–217
42. Sheen, J. (1996). Ca²⁺ dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274: 1900–1902.
43. Sherson S. M., Hemmann G., Wallace G., Forbes S., Germain V., Stadler R., Bechtold N., Sauer N., Smith S. M. (2000). Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of *Arabidopsis* seeds and seedlings to sugars. *The Plant Journal.* 24(6): 849–857.
44. Singh V., Louis J., Ayre B. G., Reese J.C., Shah J. (2011). TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE 11-dependent trehalose metabolism promotes *Arabidopsis thaliana* defense against the phloem-feeding insect *Myzus persicae*. *Plant J.* 67: 94-104.
45. Smeekens S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 49–81.
46. Stadler R., Buttner M., Ache P., Hedrich R., Ivashikina N., Melzer M., Shearson S. M., Smith S. M., Sauer N. (2003). Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 133(2): 528–537.

47. Stolz J., Stadler, R., Opekarova M., Sauer N. (1994). Functional reconstitution of the solubilised *Arabidopsis thaliana* STP1 monosaccharide-H⁺ symporter in lipid vesicles and purification of the histidine tagged protein from transgenic *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Journal*. 6: 225-233.
48. Stulke J., Hillen W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 195–201.
49. Turgeon R. (2010). The role of phloem loading reconsidered. *Plant Physiology*. 152: 1817–1823.
50. Turgeon R., Wol F. S. (2009). Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol.* 60: 207–22.
51. Turgeon R., Medville R. (1998). The absence of phloem loading in willow leaves. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 12055–12060.
52. Tsai A. Y. T., Gazarrinni S. (2014). Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Front Plant Sci.* 5: 119.
53. Van Dijken A. J. H., Schlupepmann H., Smeekens S. C. M. (2004). *Arabidopsis* Trehalose-6-Phosphate Synthase 1 Is Essential for Normal Vegetative Growth and Transition to Flowering. *Plant Physiology*. 135: 969–977.
54. Yadav U. P., Ivakov A., Regina Feil R., Guang You Duan Y. G., Walther, D., Giavalisco P., Piques, M., Carillo, P., Hubberten H. M. H., Stitt M., Lunn J. E. (2014). The sucrose-trehalose 6 phosphate (Tre-6P) nexus: specificity and mechanism of sucrose signaling by Tre6P. *Journal of Experimental Botany*. 65 1051–1068.
55. Zenke F. T., Engles R., Vollenbroich V., Meyer J., Hollenberg C. P., Breunig K. D. (1996). Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science* 272, 1662-1665.
56. Zhao Q., Dashi Y., Hongping C., Xihong G., Congying Y., Shuai H., Cheng Z., Ping W., Yu W. (2013). Regulation and function of *Arabidopsis* AtGALK2 gene in abscisic acid response signaling. *Mol Bio Rep.* 40: 6605-6612.
57. Zhang Y., Primvesi L. F., Jhurrea D., Andralojc P. J., Rowan A. C. M., Stephen J. P., Schlupepmann H., Delatte T., Wingler A., Matthew J. P. (2009). Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic P

11. Anexos.

Tabla 1. Secuencias utilizadas para el desarrollo de este proyecto.

Nombre	Secuencia 5'-3'
TPS1-F	ATGCCTGGAAATAAGTACAACACTGCAG
TPS1-R	TAAGGTGAGGAAGTGGTGTTCAGCGA
GALK-F	ATGGCGAAACCGGAAGAAGTATCAGT
GALK-R	TTAGAGGTTGAAGATGGCAGCACCCAC
STP1-F	ATGCCTGCCGGTGGATTCGTTCGTCGG
STP1-R	TCAAACATGCTTCGTTCCAGCTTGGT
pKNAT1-F	TTCTTAACATTTGACCATTGATTGAAA
pKNAT1-R	ACCCAGATGAGTAAAGATTTGAGAGAG
p59880-F	TTCTCCTAATCATACGTTATTGGAAACATT
p-KNAT1-F	TTCTTAACATTTGACCATTGATTGAAA
knat1stp1connect-R	TCCACCGGCAGGCATACCCAGATGAGTAAA
knat1stp1connect-F	TTTACTCATCTGGGTATGCCTGCCGGTGGGA
TNOSstp1connect-R	TGACTCTAGGGGTCATCAAACATGCTTCGT
TNOSstp1connect-F	ACGAAGCATGTTTGATGACCCCTAGAGTCA
59880tps1connect-F	AGCTTTGATTCAACCATGCCTGGAAATAAG
59880tps1connect-R	CTTATTTCCAGGCATGGTTGAATCAAAGCT
59880galk1conecct-F	TTCCGGTTTCGCCATGGTTGAATCAAAGCT
59880galk1conecct-R	AGCTTTGATTCAACCATGGCGAAACCGGAA
TNOSTps1connect-F	TGACTCTAGGGGTCATTAGAGGTTGAAGAT
TNOSTps1connect-R	ATCTTCAACCTCTAATGACCCCTAGAGTCA
BAR-F	GTGCTTGTCTCGATGTAG
BAR-R	GAGGGGATCTACCATGAG
BAR-sonda	FAM-ACATCCGCCGTGCCACCGAG-BHQ1

HMGB1-F	GAGGTAACAATTCCACTAA
HMGB1-R	CTTCCTCTTCTTCTTCTTC
HMGB1-sonda	HEX-ATCACCTGCCGCTTCCTTCT-BHQ1
18S-F	GTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTGG
18S-R	TGGACTTCTCGCGACGTCGCGGGCGGCG
TPS1-FqPCR	ACGTCTTGTGCATTGGTCAT
TPS1-RqPCR	GCTCCACTGTCAGATGATGG
TNOS-R	TCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCT
transgen59880	ATGTTTACTTATTCGGACTAGAGAGCTTCC
tps1-transgen-R	TCTCAAGAGACCATGAATCTTCACCTCTTC
galk1-transgen-R	AGTCAATTTCTGGTCAGGATCGGCAGGAT
transgenknat1-F	CCTTGACGAATTCTATATACCTAGTTCGTT
stp1-transgen-R	CGTCACACCACCGGAGATTCCGATATCGTA
FT-FqPCR	TCCGTTTAATAGATCAATCAC
FT-RqPCR	CCACCATAACCAAAGTATAG

Tabla 2. Reacción para PCR punto final

Reactivo	Cantidad
Buffer 10X	1.25 μ l
dNTPs [2.5 mM]	1 μ l
Oligo Forward [10 mM]	0.25 μ l
Oligo Reverso [10 mM]	0.25 μ l
DNA molde	100 ng/ μ l
Agua	7.5 μ l
Taq polimerasa	0.05 μ l
Volumen total	25 μ l

Tabla 3 Reacción para análisis de restricción.

Reactivo	Cantidad
Buffer 10X	1 μ l
Agua	7.5 μ l
DNA plasmídico	1 μ g/ μ l
Enzima de restricción	0.05 μ l
Volumen total	10 μ l