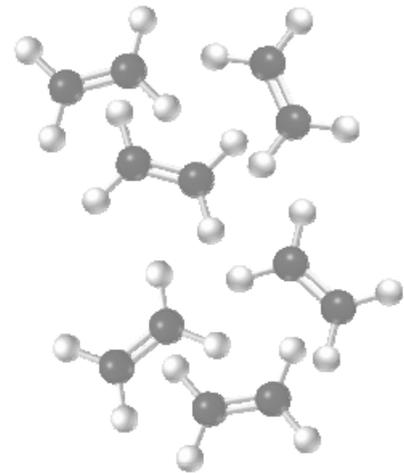


### **III - MATERIALES Y MÉTODOS**



**Si buscas resultados distintos,  
no hagas siempre lo mismo  
Albert Einstein**

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

### III.1 – Plásmidos

#### III.1.1 - Vectores de clonado

Los plásmidos pUC119 (New England Biolabs) y pBluescript II SK<sup>-</sup> (Stratagene Cloning Systems) se usaron para el clonado de distintos fragmentos de restricción previo al subclonado en el vector de interés.

El plásmido pCR 2.1-TOPO (Invitrogen), se utilizó para el clonado de productos provenientes de reacciones de amplificación con la enzima *Taq* ADN polimerasa. Esta enzima incorpora un nucleótido de adenina en los extremos 3' de los fragmentos sintetizados (actividad de transferasa terminal). El vector se provee digerido, con el agregado de un nucleótido de timina en los extremos 5', para permitir la ligación, y la enzima Topoisomerasa I, del *Vaccinia* virus, covalentemente unida al vector.

El plásmido pHANNIBAL (Wesley y col., 2001) permite el ensamble de construcciones destinadas a generar micro ARN. Este vector permite clonar la misma secuencia en orientaciones invertidas y separadas por un intrón el cual, al ser transcrito, genera un bucle entre las secuencias repetidas que maximiza los efectos de la interferencia. Flanqueando los sitios de clonado, el plásmido contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) y la señal de poliadenilación de la octopina sintetasa (OCS). Dichas regiones a su vez son flanqueadas por sendos sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *NotI*, lo cual permite el posterior subclonado de todo el bloque de interferencia en un vector binario.

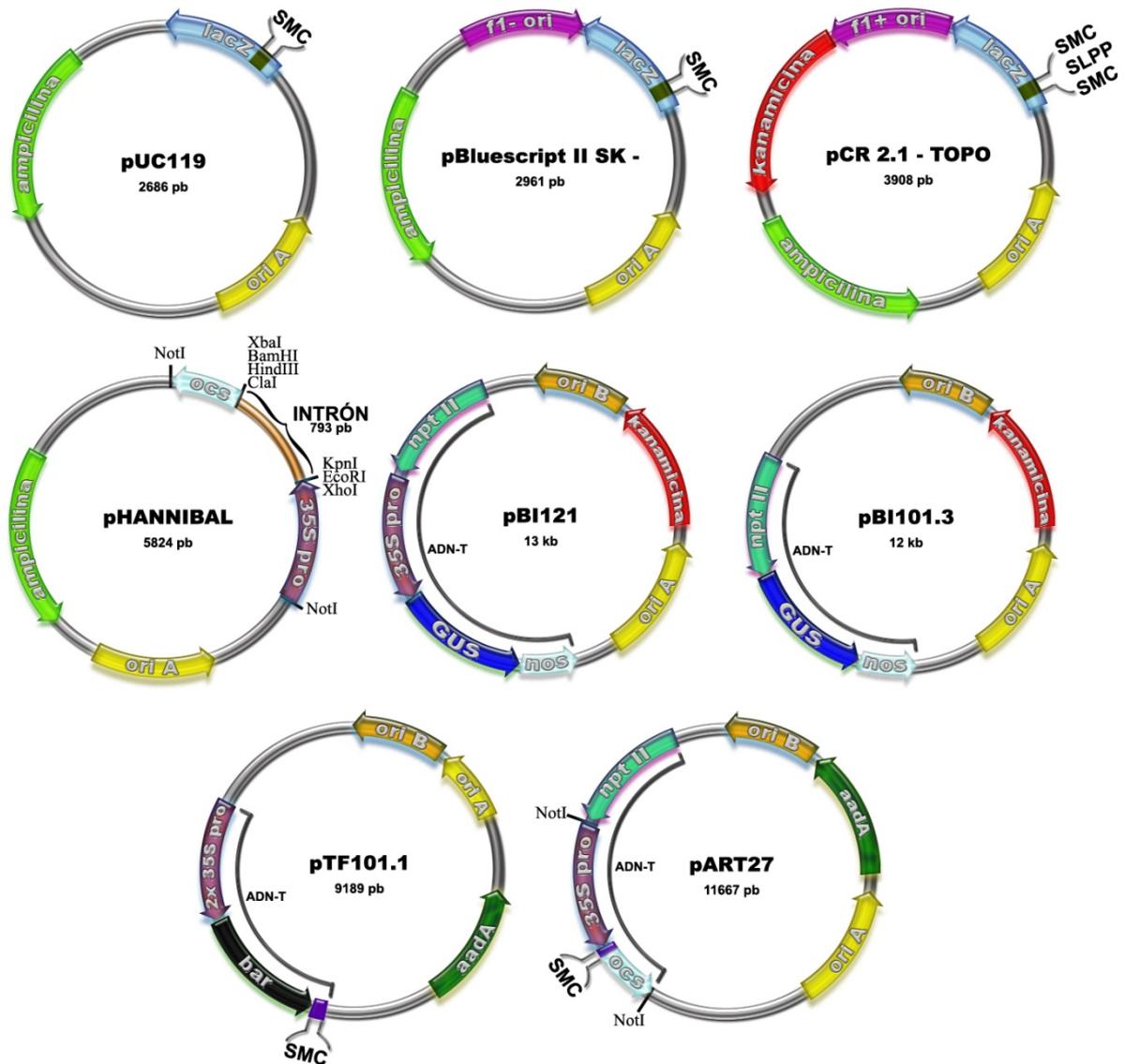
#### III.1.2 - Vectores binarios

El plásmido pBI121 (Jefferson y col., 1987) es un derivado del vector binario pBIN19. Este plásmido contiene el gen que codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli* (*GUS*) con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (*NOS*), clonados corriente abajo de un fragmento de 800 pb que contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Dentro de la región de movilización de ADN, necesaria para la transformación de plantas, contiene además el gen *NPTII* (*neomycin phosphotransferase II*) que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Otras

secuencias relevantes dentro del vector incluyen el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *RK2*. Este plásmido se ha utilizado para la expresión del ADNc del gen *HAHB4* de girasol en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas de forma estable y en discos de hojas de girasol transformados en forma transitoria. El plásmido pBI101.3 es un plásmido semejante al anterior, siendo la ausencia del promotor 35S la diferencia más importante. Este plásmido se utilizó para los estudios funcionales de la región promotora completa y parcial del gen *HAHB4*. Los distintos fragmentos se insertaron corriente arriba del gen reportero *GUS*.

El plásmido pTF101 es un derivado del vector binario pPZP202 (Hajdukiewicz y col., 1994) y ha sido demostrado su buen funcionamiento en la transformación de plantas de maíz (Frame y col., 2002). Este plásmido contiene las siguientes particularidades: posee dos orígenes de replicación que le permiten replicarse en alto número de copias tanto en *Escherichia coli* como en *Agrobacterium tumefaciens*; posee una copia del gen *aadA* que le confiere a las bacterias transformadas resistencia a spectinomycina (100 mg/l) o streptomycina (100 mg/l); dentro de la región de movilización de ADN, necesaria para la transformación de plantas, contiene además el gen *bar* que confiere resistencia a Basta® (glufosinato de amonio, Bayer CropScience) en plantas. pTF101 fue utilizado para la transformación y expresión del gen *HAHB4* en plantas de maíz.

El plásmido pART27 (Gleave y col., 1992) es un derivado del vector binario pART7. Este plásmido contiene un fragmento del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) junto a un sitio múltiple de clonado y la señal de terminación transcripcional de la octopina sintetasa (*OCS*). Todo el conjunto previamente mencionado puede ser removido con la enzima de restricción *NotI*. Dentro de la región de movilización de ADN, necesaria para la transformación de plantas, contiene además el gen *NPTII* (*neomycin phosphotransferase II*) que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Las otras secuencias relevantes dentro del vector incluyen el gen de resistencia a espectinomicina/estreptomycina en bacterias, un origen de replicación bacteriano *RK2*. Este plásmido se ha utilizado para el silenciamiento del gen *HAHB4* de girasol mediante micro ARNs.



**Figura III.1:** Representación esquemática (no a escala) de los vectores utilizados. Abreviaturas: ori A: origen de replicación en *Escherichia coli*; ori B: origen de replicación en *Agrobacterium tumefaciens*; lacZ: gen lacZ que proporciona  $\alpha$ -complementación necesaria para la selección por colonias blancas y azules. SMC: sitio múltiple de clonado; SLPP: sitio ligación de productos de PCR; f1 +/-: origen de replicación en fagos; ocs; señal de poliadenilación de la octopina sintetasa; nos: señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa; *NPTII*: gen que codifica para la neomicina fosfotransferase II (resistencia Kanamicina en plantas); 35S pro: promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor; *aadA*: gen que codifica para la aminoglycoside-3'-adeniltransferasa (resistencia a espectinomicina y estreptostomicina); *bar*: Gen que codifica para la fosphinothricin N-acetyltransferasa (resistencia al herbicida Basta); *GUS*: gen que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa.

### III.2 - Cepas de bacterias

En las tablas 1 y 2 se detallan las cepas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas.

**Tabla 1.** Cepas de *Escherichia coli*.

Cepa	Genotipo relevante	Referencias
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	<i>endA1 horasdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (NaI<sup>r</sup>) RelA1 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15)</i>	Hanahan, 1983
<b>JM109</b>	<i>F' [traD36 proAB lacI<sup>q</sup> lacZ<math>\Delta</math>M15] recA1 endA1 gyrA96 (NaI<sup>r</sup>) thi horasdR17 supE44 relA1 <math>\Delta</math>(lac-proAB) mcrA</i>	Yanisch-Perron y col., 1985

**Tabla 2.** Cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<b>LBA4404</b>	Posee el plásmido Ti desarmado pAL4404, con resistencia a estreptomycin, que se obtiene al reemplazar la región del ADN-T del plásmido pTiAch5 de la cepa salvaje Ach5 por el plásmido pBR322. Presenta resistencia cromosomal a rifampicina.	Ooms y col., 1982
<b>GV2260</b>	Posee el plásmido Ti desarmado pGV2260, con resistencia a carbenicilina, que se obtiene de reemplazar la región del ADN-T del plásmido pTiB6S3 de la cepa salvaje C58 por el plásmido pBR322. Presenta resistencia cromosomal a rifampicina.	Deblaere y col., 1985

### III.3 - Obtención y análisis de los clones

#### *III.3.1 - Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Se utilizó la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregaron los siguientes reactivos: MgCl<sub>2</sub> 2 mM; dNTP 0,2 mM c/u y 0,1  $\mu$ M de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporó una dilución apropiada del ADN molde y luego se le agregó 0,3 U de enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen) o la misma cantidad de Pfu ADN polimerasa

(Fermentas) por cada 10 µl de volumen de reacción. En los casos en los cuales se utilizó *Pfu*, el MgCl<sub>2</sub> fue reemplazado por MgSO<sub>4</sub> a la misma concentración. Los volúmenes de reacción fueron de 25 o 50 µl. Finalmente se añadió una gota de aceite mineral y se procedió con la reacción de amplificación según los objetivos del experimento.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.) y en general se utilizó el siguiente programa, en donde la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados, aplicando la siguiente relación para su cálculo:  $T_m = 2x(A+T) + 4x(G+C) - 5^\circ C$ .

Programa: (1 minutos a 94°C, 1,5 minutos a T<sub>m</sub>, 1-2 minutos a 72°C\*) 30 ciclos + 10 minutos a 72°C.

\* El tiempo de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. En el caso de Taq ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 minuto por cada 1000 pb a amplificar. Cuando la polimerasa utilizada fue *Pfu* (la cual posee prueba de error) el tiempo es de 2 minutos por cada 1000 pb.

### ***III.3.2 - Electroforesis de ADN en geles de agarosa***

Para el análisis de fragmentos ADN en geles de agarosa se empleó el sistema de tipo submarino (Ausubel y col., 1988). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2 % (p/v), según el tamaño de los fragmentos que se deseaban separar. Los geles fueron preparados en solución TAE 1 x con una concentración de 0,3 µg/ml de bromuro de etidio. A cada muestra se le agregó 1/10 vol. de solución de siembra. La separación electroforética se llevó a cabo en solución TAE 1x, empleando voltaje constante entre 1 y 5 V por cm de gel. Para la visualización del ADN en el gel se empleó un transiluminador de luz UV *UV/White Dark Room (UVP laboratory products)*. El registro de las imágenes de los geles se llevó a cabo empleando el sistema de captura de imágenes *UVP Lab. Prod.*

En todos los casos en los que fue necesario estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados se empleó como marcador de tamaño molecular una muestra de ADN del bacteriófago λ digerido previamente con la enzima *HindIII*. Esta digestión genera fragmentos de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.

### ***III.3.3 - Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa***

Cuando el objetivo de la electroforesis fue el de purificar un fragmento la corrida se llevó a cabo en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Promega), empleándose solución TAE 1 x tanto para la preparación del gel como para la solución de corrida. Una vez identificadas mediante visualización sobre transiluminador UV, las bandas correspondientes a los fragmentos esperados se escindieron utilizando un bisturí estéril y se incubaron con 2 volúmenes de agua bidestilada en un baño de agua a 65°C hasta observar la completa disolución de la agarosa. Posteriormente se llevaron a cabo 2 extracciones sucesivas con 1 volumen de fenol y a continuación una extracción con cloroformo, todas seguidas de una centrifugación de 10 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente a fin de separar las fases. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1/10 vol. de NaAc 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Para facilitar la precipitación de fragmentos de muy bajo peso molecular o que se encontraban en baja cantidad, se adicionaron 2,5 µg de ARNt (Sigma) a la solución etanólica. Tras la precipitación el fragmento purificado fue solubilizado en 13 µl de H<sub>2</sub>O estéril.

En los casos donde fue necesario obtener ADN de alta calidad a partir de geles de agarosa, se empleó el equipo comercial *GF X™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

La purificación de los vectores binarios y de clonado, posterior al corte con enzimas de restricción, fue realizada directamente por precipitación alcohólica para evitar el daño mecánico.

### ***III.3.4 - Digestión del ADN con endonucleasas de restricción***

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los respectivos proveedores. En todos los casos se utilizaron de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

### ***III.3.5 - Ligación de moléculas de ADN***

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega), en un volumen de reacción de 10 µl empleando el solución amortiguadora de reacción provista por el proveedor de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 5 a 1. La

incubación se realizó durante 16 horas a 4°C. En los casos en que se utilizó como vector de clonado el plásmido pCR 2.1-TOPO (Invitrogen), se siguió el protocolo descrito por el fabricante.

### ***III.3.6 - Transformación de bacterias***

#### ***III.3.6.1 - Electrotransformación de *E. coli*.***

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo *Gene Pulser™* (Bio-Rad). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y la mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C. Después de centrifugar a 4000 g durante 5 minutos, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri que contenían medio LB suplementado con los antibióticos adecuados.

#### ***III.5.6.2 - Transformación de *Agrobacterium tumefaciens****

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (*Gene Pulser™*, Bio-Rad). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,25 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y la mezcla se incubó durante 2 horas a 28 °C. Después de centrifugar a 4000 g durante 5 minutos, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri que contenían medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas fueron incubadas a 28 °C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 48 horas).

### ***III.3.7 - Minipreparación de ADN plasmídico***

La preparación de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* y *A. tumefaciens* transformadas se realizó según el método de la lisis alcalina, descrito por Birnboim y Doly (1979). Las células transformadas se cultivaron hasta saturación en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Para cada preparación se centrifugaron 1,5 ml del cultivo saturado a 5000 g durante 5 minutos y el sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de solución I de minipreparación. Luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 200 µl de solución II de

minipreparación, los tubos se agitaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 150 µl de acetato de potasio 3 M (pH 5,2) y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 minutos antes de ser centrifugada a 13000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se le realizó una extracción con fenol:cloroformo (1:1). El ADN plasmídico presente en la fase acuosa, fue precipitado mediante el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se incubó a -20 °C durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado fue lavado con 500 µl de etanol 70% (v/v), luego se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente fue resuspendido en 30 µl de agua bidestilada estéril.

Las preparaciones de ADN plasmídico utilizado en las reacciones de determinación de secuencia y en la purificación de vectores de clonado y binarios, se realizaron empleando el equipo comercial *Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor.

### ***III.3.8 - Determinación de la secuencia de moléculas de ADN***

Para determinar la secuencia de ADN de los distintos fragmentos clonados se utilizó el servicio provisto por MacroGen Sequencing System en Seúl, Corea. Para usar este servicio se enviaron 10µl de plásmido 100ng/µl junto con 10 µl de un oligonucleótido específico (5 µM). Las muestras son procesadas por un secuenciador automático ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas nos fueron enviados en forma electrónica.

### ***III.3.9 - Análisis de las secuencias***

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, se analizaron con el grupo de programas DNASTar y vectorNTI. Para las búsquedas de homología se consultaron las bases de datos del EMBL, Gene bank y SWISS PROT utilizando el programa BLAST (Altschul y col., 1997) a través del servidor *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para la identificación de secuencias reguladoras dentro de las regiones promotoras se utilizaron las bases de datos PLACE (Higo y col., 1999) y PlantCARE (Rombauts y col., 1999).

### **III.4 – Construcciones utilizadas para transformar plantas.**

#### ***III.4.1 – Construcciones de expresión del gen HAHB4***

El ADNc del gen *HAHB4* clonado en los vectores pBI121 y en pBI101.3, aguas abajo del promotor 35S o de su propio promotor, ya se encontraba disponible en el laboratorio (Dezar y col., 2005a, Dezar y col., 2005b). Utilizando las enzimas *EcoRI/HindIII* el bloque 35S:*HAHB4:NOS* fue removido del vector pBluescript II SK<sup>-</sup> y clonado en el vector binario pTF101 para ser usado en la transformación de plantas de maíz.

#### ***III.4.2 - Fragmentos del promotor del gen HAHB4 fusionados al gen reportero GUS***

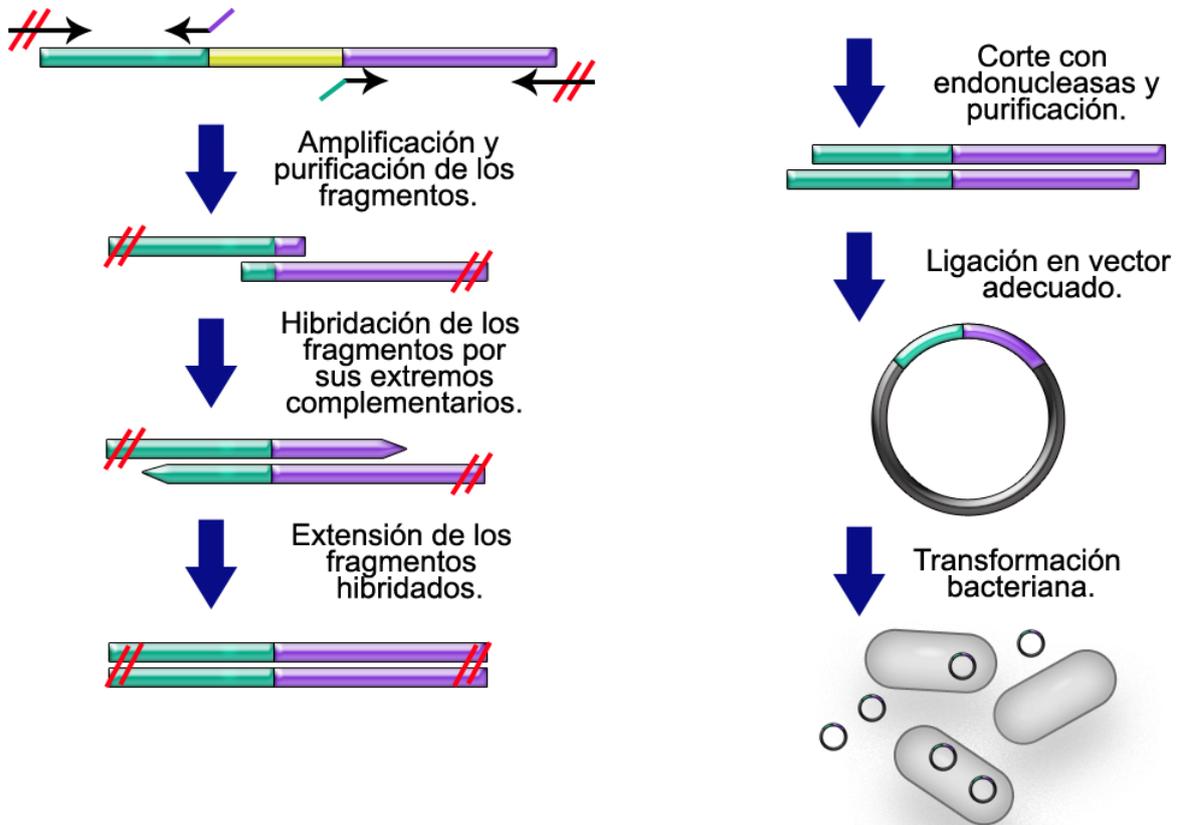
Los segmentos de ADN correspondientes a fragmentos parciales de la región promotora del gen *HAHB4* (PEL) se obtuvieron por amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos listados en el apartado **III.15** combinados con el oligonucleótido PROT26 (el cual se une en sentido reverso desde el sitio de inicio de transcripción e incluye el sitio de restricción de la endonucleasa *Bam*HI).

Estos fragmentos fueron digeridos con la enzima correspondiente a cada oligonucleótido junto con la enzima *Bam*HI y clonados en los mismos sitios del vector pBI101.3 según se describe en **III.3**.

#### ***III.4.3 - Quimeras del promotor de HAHB4 fusionadas al gen reportero GUS***

Con el fin de obtener construcciones quiméricas que incluyan distintas regiones del promotor se utilizó como molde el clon del promotor entero y se procedió de la siguiente manera: se amplificaron por PCR las dos regiones que se quieren fusionar usando cuatro oligonucleótidos, los dos de los extremos poseen sitios de restricción que permiten el clonado de la construcción mientras que los centrales (específicos de la zona de fusión) poseen 18 pb específicos para el fragmento a amplificar más 9 pb complementarias al fragmento a fusionar, quedando ambos oligonucleotidos solapados por 18 pb. Luego de una primera amplificación se procedió a la purificación de los fragmentos como se describió en **III.3.3**. Luego se llevó a cabo una PCR corta para unir y extender los extremos de la quimera. Con este objetivo se preparó una mezcla con 7,5 µl de cada fragmento purificado más 1 µl dNTP (20 mM), 1 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,5 µl solución amortiguadora, 0,2 µl *Taq* polimerasa y agua hasta 25 µl y se la colocó en un termociclador siguiendo el siguiente protocolo: (94 °C, 30 seg; 62 °C, 1,5 min; 72 °C,

2 min) por 10 ciclos más 15 min adicionales a 72 °C. Luego se realizó una PCR normal usando 5 µl del producto obtenido anteriormente y los oligonucleótidos que se unen a los extremos de la construcción. El producto se purificó y digirió con las enzimas correspondientes a cada oligonucleótido y finalmente se clonó en los mismos sitios de pBI101.3 según describe en III.3.



**Figura III.2:** Representación grafica de la técnica usada para realizar las construcciones quiméricas y mutantes del promotor del gen *HAHB4*. Las flechas negras representan los oligonucleótidos usados. Las dobles barras rojas (//) indican sitios reconocidos por endonucleasas.

#### III.4.4 - Mutaciones del promotor de *HAHB4* fusionadas al gen reportero *GUS*

Las mutaciones en la región promotora del gen *HAHB4* se realizaron usando como molde la secuencia entera del promotor o alguno de los clones que contenían los fragmentos/quimeras antes mencionados según el caso. El procedimiento para obtener las mutantes fue el mismo que fue descrito en la sección III.4.3 en el que la mutante se genera por la eliminación total de los sitios de interés. Para obtener dobles mutantes se repitió la técnica usando las mutantes simples como molde. Finalmente los productos

mutados fueron clonados en el vector pBI101.3 como se describe en la sección **III.3**. Los oligonucleótidos usados para obtener estas construcciones están listados en el apartado **III.15**.

### **III.5 – Material vegetal y condiciones de cultivo**

#### ***III.5.1 - Especies y variedades utilizadas***

Para los estudios en girasol, se emplearon semillas de *Helianthus annuus* del cultivar Contiflor 15, Zeneca.

Para los estudios en *Arabidopsis thaliana* se utilizaron semillas de los ecotipos Columbia-0 (Col-0) y Landsberg erecta (Ler-0) adquiridas en Lehle Seeds y reproducidas posteriormente en cámara de cultivo según se indica más abajo.

Los ensayos realizados en plantas de maíz fueron llevados a cabo usando semillas de *Zea mays* del genotipo híbrido Hi II.

#### ***III.5.2 – Desinfección y cultivo in vitro de semillas de Arabidopsis thaliana, girasol y maíz.***

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron desinfectadas mediante lavados con etanol 70 % (v/v) (5 minutos), lavandina 5 % + SDS 1 % (15 minutos) y agua destilada estéril (3 veces). En el caso de tratarse de semillas pertenecientes a una F1 para selección de transformantes, se utilizó un volumen de aproximadamente 100 µl de semillas mientras que para filiales posteriores se usaron entre 20-30 semillas. Las semillas fueron resuspendidas en 8 ml de agar 0,1 % y sembradas en placas de Petri de 150 mm de diámetro que contenían medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), con el agregado de vitaminas de Gamborg (Gamborg y col., 1968) y 50 µg/ml de kanamicina.

Las placas fueron mantenidas en la heladera durante dos días a fin de romper la dormancia de las semillas para luego ser pasadas a una cámara de cultivo con luz y temperatura controladas (16 horas de luz a 24 °C y 8 horas de oscuridad a 22 °C).

Para los cultivos de semillas de girasol y maíz, las semillas se colocaron directamente en placas de Petri de 150 mm de diámetro sobre papel de filtro saturado en agua sin desinfección previa (las semillas ya se encontraban cubiertas de un producto antifúngico aplicado por el proveedor) y se incubaron durante 3 días a 25 °C en oscuridad para facilitar su germinación. Una vez finalizado este período, las plántulas

emergidas fueron pasadas a una cámara de cultivo con luz y temperatura controladas (16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 22 °C).

Todo el proceso fue realizado en condiciones de esterilidad utilizando una cabina de flujo de aire horizontal (Forma Scientific, Inc.). Las pinzas y los bisturíes fueron esterilizados mediante calor por fuego directo mientras que el agua, el agar 0.1% y el medio de cultivo MS fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

### ***III.5.3 – Cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana*, girasol y maíz.***

En los casos en los cuales se utilizaron plantas en estadios de desarrollo avanzados, estas se cultivaron directamente en macetas con tierra previamente fertilizada procediendo de alguna de las siguientes maneras:

a- Las semillas se hicieron germinar directamente en tierra usando macetas de 8 x 7 cm (diámetro por altura) para AT o de 36 x 31 cm para maíz y girasol. Las plantas de AT se sembraron en superficie (7 semillas/maceta) raleándose con posterioridad para dejar solo las 4 de mejor aspecto. Las semillas de girasol y maíz (3 por maceta) fueron sembradas a 1 cm de profundidad y tras la germinación se raleo dejando solo una plántula por maceta. En todos los casos las macetas fueron cubiertas con film auto-adherente hasta la germinación para evitar una excesiva deshidratación.

b- Cuando fue necesario seleccionar las plántulas por su resistencia a un antibiótico, las semillas se hicieron germinar como se describe en **III.5.2** y luego fueron trasplantadas a y crecidas en tierra.

En ambos casos las plantas se cultivaron en un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 24-22 °C (AT) 25-28 °C (girasol y maíz).

### ***III.5.4 - Transformación de plantas.***

#### ***III.5.4.1 - Transformación de *Arabidopsis thaliana*.***

El método utilizado para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* fue el de inmersión (*floral dip*) descrito por Clough y Bent, 1998. Para ello se prepararon 8 macetas de 8 x 7 con tierra y se sembraron 10 semillas en cada una de ellas. Las macetas se colocaron en una bandeja con agua y se cubrieron con film auto adherente transparente. Las plantas se cultivaron hasta la floración (aproximadamente 4 semanas) en un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 24-22 °C. Cuando los pedúnculos florales se separaron de su yema axilar próxima, se cortaron las

inflorescencias sin dañar las hojas caulinares y yemas axilares cercanas. Entre los 2 y 3 días posteriores al corte surgieron nuevas inflorescencias de las yemas axilares, las cuales se cortaron nuevamente teniendo los cuidados antes mencionados. Se repitió el procedimiento anterior hasta el momento en que todas las inflorescencias presentaron al menos 4 flores no abiertas (pétalos blancos ausentes). En este estadio las plantas fueron utilizadas en los ensayos de transformación.

Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron durante 16 horas a 28 °C con agitación células de *A. tumefaciens* en frascos que contenían 10 ml de medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de rifampicina, y 100 µg/ml de estreptomicina (cuando usamos la cepa LBA4404) o 50 µg/ml de carbenicilina (en el caso de GV2260). Estos cultivos se utilizaron para inocular un Erlenmeyer que contenía 500 ml del mismo medio suplementado con antibióticos. Las células se cultivaron hasta alcanzar la fase estacionaria (16 horas, a 28 °C, con agitación). Luego se cosecharon por centrifugación a 4500 g durante 15 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en 1 litro de una solución de sacarosa 5% que contenía 300 µl del detergente Silwet L-77 (OSI Specialties, Inc.) y esta suspensión se colocó en un vaso de precipitados sobre un agitador magnético. Las plantas se sumergieron entre 30 y 60 segundos, tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra. Luego, las macetas fueron ubicadas en posición horizontal en una bandeja, se taparon con papel de nylon y se llevaron a la cámara de cultivo. Al día siguiente, se colocaron en posición vertical y se cultivaron las plantas hasta el momento de la cosecha (aproximadamente a 6-8 semanas de la siembra).

Cuando las vainas se secaron y se tornaron de un color marrón claro, se colectaron las semillas y fueron guardadas en la heladera para su posterior análisis.

#### III.5.4.2 - Transformación de *Zea mays*.

La obtención de plantas transgénicas de maíz fue realizada a través de agroinfiltración de embriones en el servicio de transformación de plantas de la Universidad de Iowa (*Iowa State University plant transformation facility*) siguiendo el protocolo descrito por Frame y col. (2002).

#### III.5.4.3 - Transformación transitoria de *Helianthus annuus*.

La suspensión de transformación se preparó cultivando células de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 durante 16 horas a 28°C con agitación en un tubo que contenía 2 ml de

medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de rifampicina, y además 100 µg/ml de estreptomicina. Estos cultivos se utilizaron para inocular un frasco que contenía 50 ml del mismo medio suplementado con los mismos antibióticos y 5 µM de acetosiringona. Las células se cultivaron hasta alcanzar la fase estacionaria (16 horas, a 28 °C, con agitación). Luego se cosecharon por centrifugación a 4500 g durante 15 minutos. Los sedimentos se resuspendieron e incubaron durante 4 horas en 100 ml de una solución de 10 mM MgCl<sub>2</sub> suplementada con 100 µM acetosiringona y 15 µl/l del detergente Silwet L-77 tratando de alcanzar una densidad óptica de 0.5 DO y no mayor.

Luego de la incubación, 20-30 discos de hojas de girasol de 11 mm de diámetro fueron sumergidos completamente en la suspensión antes mencionada y se les aplicó vacío durante 1 hora en intervalos de 15 minutos. Luego de dejar reposar los discos en la suspensión por 15 adicionales se los lavó 6 veces con PBS 1 x para eliminar el exceso de estas agrobacterias. Se seleccionaron visualmente los discos que mejor infiltración sufrieron y fueron traspasados a placas de Petri de 150 mm de diámetro conteniendo 20 ml de medio de MS para ser cultivados en cámara de cultivo durante 24 horas. Después de este período, el medio de cultivo fue suplementado con 250 µg/ml del antibiótico cefotaxime (antibiótico específico para *Agrobacterium* que no afecta los tejidos vegetales) a fin de eliminar los remanentes de agrobacterias. Se incubó en cámara de cultivo dos días más a fin de dejar que los tejidos transformados se estabilicen y luego se recolectaron los discos lavándolos 3 veces con PBS previamente a su congelamiento en nitrógeno líquido.

Para cada ensayo se analizaron al menos 9 discos provenientes de 3 plantas distintas. Para analizar la eficiencia de infiltración y transformación en cada ensayo se cuantificó en forma adicional el nivel de expresión del gen de resistencia a kanamicina que se inserta simultáneamente con la construcción de interés.

#### III.5.4.4 - Selección de transformantes

Las semillas cosechadas del experimento de transformación fueron desinfectadas y sembradas en placas de Petri que contenían el medio MS suplementado con vitaminas de Gamborg y kanamicina (50 µg/ml), según se detalla en el punto **III.5.2**.

Durante las primeras horas en la cámara de cultivo la mayor parte de las semillas germinaron. Aproximadamente a los 7 días, los cotiledones de las plantas sensibles se fueron tornando amarillos. Las placas se mantuvieron en la cámara durante 3-5 días adicionales. En ese período sólo las plantas transformadas generaron hojas verdaderas,

mientras que las no transformadas se tornaron cada vez más pálidas, hasta que finalmente murieron. Sólo las plantas resistentes que mostraron tener una raíz de tamaño considerable, generalmente del tamaño de la planta, fueron pasadas a macetas con tierra o usadas en ensayos preliminares.

### **III.6 – Ensayos realizados en plantas de girasol, maíz y Arabidopsis.**

#### ***III.6.1 – Tratamientos químicos.***

Plantas de 21 días (AT) o de 12 días (girasol) fueron trasplantadas a placas de Petri con medio de cultivo MS suplementados, según el ensayo, con 30 $\mu$ M ACC, 200  $\mu$ M MetJA, 100  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>, 2 mM AIB, 100  $\mu$ M ABA, 1 mM SA, 1 mM ASA e incubadas en cámara de cultivo durante los tiempos requeridos en cada experimento antes de su recolección y congelamiento en nitrógeno líquido para posteriores análisis. Las plantas utilizadas como controles fueron tratadas de la misma manera en medio MS sin suplementar con químico alguno.

Para los tratamientos realizados en hojas de girasol transitoriamente transformadas, los discos obtenidos se sumergieron en la solución que contenía el agente químico de interés y se les aplicó vacío por 15 minutos para facilitar el contacto.

Para los ensayos de triple respuesta, las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron desinfectadas y sembradas en placas de Petri como se describe en el apartado **III.5.2** en medio de cultivo MS-Agar suplementado con 5  $\mu$ M ACC y mantenidas en completa oscuridad durante 2-3 días. Finalizado este periodo, se las destapó y se las fotografió.

Los tratamientos con Ethephon (Sigma) fueron realizados en plantas de 30 días (AT) o 45 días (girasol) sembradas en tierra rociando las hojas con una solución que contenía 100 o 300  $\mu$ M de este compuesto.

#### ***III.6.2 – Tratamientos y generación de estrés abiótico.***

##### ***III.6.2.1 – Generación de estrés hídrico.***

Para generar estrés hídrico en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 21 días, cultivadas en MS-agar, se las colocó sobre papel de filtro y se las dejó deshidratar hasta que se observó claramente una pérdida de turgencia en las hojas.

Los ensayos de estrés hídrico en tierra se realizaron con 16 macetas de 8 x 7 cm que contenían la misma cantidad de tierra (100-120 g) y 4 plantas por maceta. Éstas se regaron una única vez hasta saturación antes de ser puestas en cámara de cultivo para ser cultivadas en las condiciones descritas previamente. Se procuró una deshidratación

paulatina y pareja de la tierra girando periódicamente las macetas. Se esperó hasta observar el efecto del estrés hídrico (aproximadamente cuatro semanas) como una pérdida notoria de turgencia en las hojas y, en ese momento, las plantas fueron regadas nuevamente. Se esperó el tiempo necesario para la recuperación de las plantas (48 horas) y se cuantificó la cantidad de plantas sobrevivientes de cada genotipo. Con esos datos se calculó el porcentaje de supervivencia. Cada ensayo se repitió entre 3 y 5 veces.

#### III.6.2.2 – Tratamientos de oscuridad.

Para estos ensayos plántulas de *Arabidopsis* de entre 15-21 días crecidas en medio MS-Agar se incubaron en completa oscuridad durante distintos períodos de tiempo de acuerdo al ensayo realizado (indicados en las figuras correspondientes). Después de estas incubaciones las muestras fueron inmediatamente cosechadas y congeladas en nitrógeno líquido permaneciendo todo el tiempo en completa oscuridad.

Cuando se estudiaron los efectos de la oscuridad sobre la expresión de distintos genes en plantas de girasol, se aplicó el mismo protocolo.

#### III.6.2.3 – Generación de heridas mecánicas.

Para analizar los efectos locales y sistémicos de las heridas mecánicas en plantas de girasol, la mitad de las hojas de una planta de 45 días fue dañada usando pinzas o tijeras (aproximadamente el 50% de la superficie de la hoja). Las muestras fueron tomadas en la hoja dañada para estudiar el efecto localizado y en las hojas no dañadas de la misma planta para ver el efecto sistémico. Los períodos de tiempo en los cuales se tomaron las muestras dependieron de cada ensayo y se indican en las leyendas de las figuras correspondientes.

En las plantas de girasol o *Arabidopsis* transformadas con la construcción que contiene el promotor del gen *HAHB4* dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS*, las heridas fueron realizadas mediante cortes con tijeras y el material vegetal fue dejado reposar durante 1 hora antes de iniciar el ensayo histoquímico. Éstos se realizaron durante períodos cortos de incubación y manteniendo las muestras en luz para evitar los efectos de la inducción por oscuridad que presenta este promotor.

### **III.6.3 – Generación de estrés biótico.**

El daño producido por el ataque de insectos depredadores en plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción que contiene el promotor del gen *HAHB4* dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS* fue realizado confrontando las plantas a 10 larvas del díptero *Bradysia impatiens*, permitiéndoles que se alimenten durante una hora antes de realizar el análisis histoquímico.

Para analizar los efectos del ataque de insectos depredadores en plantas de girasol se expusieron plantas adultas al ataque de 1 oruga de *Spilosoma virginica* durante tiempos variables para cada ensayo tal como se indica en las figuras correspondientes. Se tomaron muestras de hoja de la zona en la cual la oruga se alimentó a fin de estudiar el efecto local y muestras de las hojas no dañadas de la misma planta para ver los efectos sistémicos del ataque. Los efectos del ataque de insectos sobre la actividad del promotor de *HAHB4* en discos de girasol se analizaron en general, de la misma forma que en *Arabidopsis* pero usando una oruga de *Spilosoma virginica* en lugar de *Bradysia impatiens*.

### **III.6.4 – Bioensayos con insectos.**

La ganancia de peso y la tasa de alimentación de insectos alimentados con plantas que sobre-expresan el gen *HAHB4* o con plantas sin transformar fueron determinadas de la siguiente manera. Diez larvas de *Bradysia impatiens* y una oruga de *Diatraea saccharalis* o *Spodoptera frugiperda* fueron alimentadas con hojas pertenecientes a los distintos genotipos de *Arabidopsis* o maíz respectivamente. Las hojas fueron renovadas diariamente para minimizar los efectos acumulados por la activación de los mecanismos de defensa. Las hojas removidas fueron escaneadas y se calculó el área comida por los insectos en cada genotipo usando el programa Adobe Photoshop CS3 en su versión extendida. Al mismo tiempo las larvas fueron pesadas diariamente para evaluar la evolución de su peso. Dicho monitoreo del peso fue realizado hasta que las larvas entraron en estado de pupa.

A fin de determinar la tasa de supervivencia y desarrollo de las larvas y orugas, éstas fueron alimentadas como se describe en el párrafo anterior. Durante todo el período de alimentación los insectos fueron observados tratando de no su viabilidad. Se registraron los períodos de tiempo transcurrido entre sus cambios de estados de desarrollo (larva, pupa, adulto). En el momento en el que la población adulta se

estabilizó se hizo un recuento de los insectos totales para determinar la tasa de supervivencia.

Los ensayos de elección fueron realizados como describieron Kappers y col. (2005) usando tubos de elección o placas de cultivo donde se colocaron alternadamente plantas salvajes y transgénicas permitiendo a los insectos, colocados en el centro, elegir su alimento.

Todos los ensayos mencionados en esta sección fueron repetidos al menos 10 veces usando tres líneas independientes de plantas transgénicas y plantas transformadas con el vector vacío utilizadas como controles. Alternativamente los mismos parámetros fueron medidos en plantas sembradas en tierra para descartar efectos de la escisión de las hojas en la alimentación de los insectos.

### **III.7 – Extracción, purificación y cuantificación de ácidos nucleicos.**

#### ***III.7.1 – Extracción y purificación de ADN genómico de girasol y maíz.***

Para la extracción de ADN total de plantas se ha seguido el método descrito por Doyle y Doyle (1987). Se pulverizó el material con N<sub>2</sub> líquido en un mortero estéril, se transfirió el polvo fino a un tubo y se agregó solución de extracción previamente calentada a 65 °C (5 ml por cada g de tejido procesado). La mezcla se incubó a 60 °C durante 30 minutos, agitando ocasionalmente. Luego se retiró el tubo del baño, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente para luego agregar un volumen de la mezcla cloroformo:isoamílico (24:1). Se mezcló durante 5 minutos y luego se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se la sometió a 2 extracciones más con cloroformo:isoamílico (24:1). Se agregó ARNasa (a la fase acuosa) hasta una concentración final de 100 µg/ml y se incubó durante 30 minutos a 37 °C, luego de lo cual el ADN fue precipitado por el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos a 4 °C, el precipitado se lavó con etanol 70% (v/v), se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 1 ml de TE. La preparación de ADN fue mantenida 30 minutos en hielo y luego se agregaron 500 µl de acetato de amonio 7,5 M, con el fin de precipitar los polisacáridos insolubles. Se mezcló y se incubó en hielo durante 15 minutos. Después de centrifugar a 10000 g durante 15 minutos a 4 °C, el ADN genómico presente en el sobrenadante se precipitó mediante el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -20 °C al menos 1 hora. Se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos a 4 °C, el precipitado se lavó con etanol 80% (v/v), se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

### ***III.7.2 – Extracción y purificación de ADN genómico de Arabidopsis thaliana.***

Para analizar mediante la técnica de PCR la población de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas, se realizaron preparaciones de ADN total empleando un método rápido descrito por Li y Chory (1998). Se colocó una hoja joven en un tubo y se maceró durante 15 segundos. Después de agregar 700 µl de solución de extracción, se agitó vigorosamente durante 10 segundos y se centrifugó a 18000 g durante 1 minuto. Se tomaron 600 µl del sobrenadante y se agregó 1 volumen de isopropanol. Luego de mezclar, se centrifugó a 18000 g durante 5 minutos. El precipitado obtenido se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril.

### ***III.7.3 – Extracción y purificación ARN total.***

Las extracciones de ARN fueron realizadas usando el reactivo Trizol® (Invitrogen™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los ensayos de rutina fueron realizados con una versión casera del reactivo previamente mencionado. Para dichas extracciones entre 50-100 µg de tejido vegetal se pulverizaron con N<sub>2</sub> líquido en un mortero estéril y luego se transfirió el polvo fino a un tubo de tipo Eppendorf en el cual se agregó 1 ml del reactivo Trizol casero. Tras mezclar por inversión varias veces, se incubó a temperatura ambiente por 10 min antes de agregar 200 µl de cloroformo y centrifugar por 15 min a 12.000 g a 4 °C. La fase acuosa fue posteriormente precipitada con 1 volumen de isopropanol por 30 min a -20 °C. Tras un lavado con etanol 70% v/v y secado del precipitado, se lo disolvió en 30 µl de agua bidestilada estéril.

En el caso de tejidos complejos, las preparaciones de ARN total se realizaron según lo descrito por Hall y col., 1978, con modificaciones. Se pulverizó el material con N<sub>2</sub> líquido en un mortero estéril. Una vez convertido en un polvo fino se pasó a un tubo y se le agregó la solución amortiguadora de extracción (3 ml por g de material procesado) mantenido a 100 °C. A esta suspensión se le agregó proteinasa K hasta una concentración final de 0,1 mg/ml. La mezcla se incubó 1 hora a 37 °C con agitación suave. Se agregó KCl hasta una concentración final de 50 mM, se agitó suavemente y se incubó 15 minutos en hielo. Luego de centrifugar durante 15 minutos a 13000 g y a 4 °C, al sobrenadante se le agregó LiCl hasta una concentración final de 2 M y se incubó a 4 °C al menos 2 horas para precipitar el ARN en forma selectiva. Luego de centrifugar 20 minutos a 13000 g y a 4 °C, el precipitado se lavó con LiCl 2 M y posteriormente se

resuspendió en acetato de potasio 0,2 M. Se centrifugó 10 minutos a 10000 g para extraer los polisacáridos insolubles, y al sobrenadante se le realizó una extracción con un volumen de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se recuperó la fase acuosa y se precipitó añadiendo 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Luego de centrifugar durante 15 minutos a 13000 g y a 4 °C, el precipitado fue resuspendido en agua y el ARN se guardó a -80 °C hasta el momento de ser usado.

En el caso de requerir muestras con mayor calidad, se usaron *kits* de purificación de ARN de plantas "Rneasy® Plant Mini Kit" (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### ***III.7.4 - Cuantificación de ácidos nucleicos***

Las concentraciones de ADN y el ARN en solución, se calcularon a partir de la absorbancia a 260 nm, considerando que una D.O. (260 nm) = 1, equivale a 50 µg/ml de ADN o a 40 µg/ml de ARN. También se midió la absorbancia a 280 nm, pico máximo de absorción de las proteínas, ya que está determinado que una relación de Abs.260/Abs.280 cercana a 2 corresponde a una preparación prácticamente libre de proteínas.

Las concentraciones de ADN/ARN cuantificadas por espectrometría se confirmaron con la visualización directa de los productos purificados en geles de agarosa corridos en condiciones nativas y desnaturalizantes respectivamente.

En las preparaciones de vectores e insertos para los clonados moleculares, la cantidad a utilizar se estimó en forma visual, comparando las bandas observadas en los geles con patrones de concentraciones conocidas.

### **III.8 – Análisis de expresión génica.**

#### ***III.8.1 – Cuantificación de transcriptos por transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real.***

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo usando la siguiente reacción de dos pasos: 1. En un volumen final de 10 µl se colocaron 1 µg de ARN junto con 0,1 µM de oligonucleótidos poli-dTV (consiste en 1 nucleótido variable, ubicado en el extremo 5', seguido de 24 nucleótidos timina) esta mezcla se incubó durante 5 min a 70 °C para luego ser colocada inmediatamente en hielo (este tratamiento permite desarmar las estructuras secundarias del ARN). Terminado este proceso se le adiciona a la mezcla 6 µl de solución amortiguadora de la enzima, 2 µl de dNTP (20 mM), 200 U

de transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y se completa el volumen hasta 30  $\mu$ l con agua bidestilada estéril. Dicha mezcla se incubó 1,5 horas a 42 °C y luego se inactiva la enzima 5 min a 80 °C más 30 segundos a 94 °C.

La PCR cuantitativa en tiempo real fue llevada a cabo usando un termociclador PTC-200™ (MJ Research, Inc.), el cual tiene acoplado un detector de fluorescencia Cromos 4 (MJ Research, Inc.). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ l, los cuales contienen: 5  $\mu$ l SyBr green (1 x); 0,1  $\mu$ l dNTP (20 mM); 0,4  $\mu$ l de cada oligonucleótido específico (20 pmoles/ $\mu$ l); 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 10  $\mu$ l de una dilución 1/50 del producto de la transcripción reversa previamente descrita y 0,05  $\mu$ l Taq Platinum (Invitrogen Inc.). La fluorescencia fue registrada continuamente durante 40 ciclos. Los oligonucleótidos específicos para cada gen fueron diseñados usando las bases de datos disponibles en [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) y <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html> y sus secuencias se encuentran detalladas en la sección **III.15**.

Los niveles de expresión de los genes *ACTINA2* y *ACTINA8*, los cuales ya habían sido evaluados como genes normalizadores (Charrier y col., 2002), fueron usados para normalizar los niveles de expresión de los genes de interés.

Todas las cuantificaciones fueron realizadas con triplicado biológicos y repetidas al menos 3 veces, los valores de cuantificación de expresan en forma relativa a un control al cual le es asignado arbitrariamente el valor de 1.

### ***III.8.2 – Análisis de expresión por northern blot.***

#### ***III.8.2.1 - Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes***

La separación de moléculas de ARN por electroforesis se realizó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. La concentración de agarosa utilizada fue de 1% (p/v) y los geles fueron preparados en solución HEPES 1 x, formaldehído 6%. Antes de la corrida electroforética, a cada muestra (entre 5 y 10  $\mu$ g de ARN total) se le agregaron 3 volúmenes de solución de desnaturalización y la mezcla se incubó 5 minutos a 65 °C. Después del calentamiento se agregaron 1/10 vol. de solución de siembra y 0,5  $\mu$ l de bromuro de etidio 10 mg/ml. La separación electroforética se llevó a cabo en solución HEPES 1 x empleando un voltaje constante de 3 V por cm de gel. La visualización del ARN en el gel se realizó en un transiluminador de luz UV.

### III.8.2.2 - Transferencia del ARN a membranas de nylon

Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel fue sumergido en agua desionizada (4 lavados de 15 minutos c/u) para eliminar el formaldehído. El ARN fue transferido por capilaridad en una solución de SSC 6 x a membranas de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) durante 16 horas a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron secadas y el ARN se fijó por exposición a luz UV (310 nm) entre 3 y 5 minutos.

### III.8.2.3 – Marcación y purificación de sondas

La marcación de ADN doble hebra se realizó según el método de cebado al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983). Para ello, el fragmento de ADN se purificó a partir de geles de agarosa como se detalla en el punto **III.3.3**. Se incubaron 50-100 ng de ADN en un volumen de 35  $\mu$ l durante 3 minutos a 100 °C y el tubo se transfirió inmediatamente a un baño de hielo. Posteriormente se agregaron 10  $\mu$ l de solución OLB, 2  $\mu$ l de albúmina sérica bovina 10 mg/ml, 2  $\mu$ l de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP (3000 Ci/mmol, 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) y 2-3 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Promega). La reacción transcurrió entre 4 y 12 horas a temperatura ambiente. Luego se agregaron 100  $\mu$ l de agua destilada estéril y el exceso de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP no incorporado se eliminó en columnas de Sephadex G-50 siguiendo la técnica de Penefsky (Ausubel y col., 1988).

Antes de ser utilizada, la sonda fue desnaturalizada por incubación a 100 °C durante 3 minutos e inmediatamente pasada a un baño de hielo. Luego fue diluida en la cantidad adecuada de solución de prehibridización.

La sonda que se utilizó para detectar el ARNm correspondiente a *HAHB4* en una mezcla total de ARN de girasol fue un fragmento del ADNc correspondiente a la región 3' no codificante (+424 a +674) sumada a los últimos 177 nucleótidos de la región codificante, que no incluyen el dominio HD-Zip.

Para la detección del ARNm correspondiente al gen *GUS* se utilizó una sonda que comprende el ADNc completo de este gen, obtenida por restricción con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I desde el vector pBI101.3.

Para verificar la cantidad de ARN sembrado y transferido en cada calle, las membranas fueron rehibridadas con una sonda de ADNr 25S de *Vicia faba*, en las mismas condiciones descriptas.

#### III.8.2.4 - Hibridación de membranas de nylon

Las membranas a las cuales estaban fijados los ácidos nucleicos fueron prehibridadas entre 2 y 4 horas a 65 °C en solución de prehibridación. La hibridación se realizó durante toda la noche en las mismas condiciones que la prehibridación, pero con el agregado de la sonda correspondiente, previamente desnaturalizada.

Posteriormente, las membranas fueron lavadas con SSC 2 x a 65 °C (4 lavados de 15 minutos c/u). Una vez que las membranas estuvieron secas, fueron expuestas durante tiempos variables a películas T-mat (Kodak) o Bioma x MS (Kodak), según la intensidad de la señal esperada. Esta intensidad se estimó previamente utilizando un contador Geiger.

#### **III.8.3 – Análisis de transcriptoma por microarreglo.**

El análisis de las diferencias en el transcriptoma de plantas transgénicas que sobre-expresan el gen *HAHB4* comparado con el de plantas salvajes, ambas en condiciones de crecimiento normal o sometidas a estrés hídrico, fue realizado usando un micro arreglo de CATMA el cual contiene representados 24576 genes de *Arabidopsis thaliana* (Crowe y col., 2003; Hilson y col., 2004). La versión de micro arreglo de CATMA usado consiste en tres meta-bloques cada uno compuesto por 64 bloques de 144 puntos de impresión cada uno. Cada bloque corresponde a un grupo de puntos impresos con la misma punta de impresión. En el presente estudio se usaron 4 replicados biológicos para realizar la hibridación. Las muestras se marcaron con diferentes colorantes y se compararon de la siguiente manera: genotipo Col-0 en condiciones normales versus el mismo genotipo sometido a estrés, transgénicas *35S:HAHB4* en condiciones normales versus sometidas a estrés y Col-0 versus transgénicas *35S:HAHB4*, ambas en condiciones normales. La integridad del ARN fue analizada con un bioanalizador de Agilent (Waldbroon, Germany). Los ARNc fueron producidos usando 2 µg de ARN total usando el *kit* “Message Amp aRNA” (Ambion, Austin, TX). Para hibridar cada arreglo se retro transcribieron 5 µg de ARNc en presencia de 200 U de SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA), Cy3-dUTP y Cy5-dUTP (NEN, Boston, MA) de acuerdo a Puskas y col. (2002). Los arreglos fueron prehibridados por 1 h y la hibridación se realizó durante 16 horas a 42 °C en 25% formamida. Los arreglos fueron lavados en 2 x SSC + 0.1 % SDS (4 min), 1 x SSC (4 min), 0.2 x SSC (4 min), 0.05 X SSC (1 min) y secados por centrifugación. Los arreglos fueron escaneados en un escáner GenePi x 4000A (Axon Instruments, Foster City,

USA) y las imágenes analizadas con el programa GenePi x Pro 3.0 (Axon Instruments, Foster City, USA).

El análisis estadístico fue realizado como se describe en Lurin y col. (2004). Cada arreglo contiene 24576 GST (*gene specific tags*) y 384 controles. Los controles fueron usados para establecer la calidad de la hibridación pero no fueron incluidos en el análisis estadístico.

Para establecer cuáles genes se encontraban expresados diferencialmente se realizaron test T apareados usando los valores del  $\log_2$  de la diferencia entre la fluorescencia de la muestra A versus la de la muestra B. El p-valor fue ajustado usando el método de Bonferroni.

### **III.9 – Determinaciones de actividad enzimática.**

#### ***III.9.1 – Ensayo histoquímico para determinar actividad glucuronidasa (GUS)***

Los ensayos de actividad de GUS *in situ* fueron realizados siguiendo la metodología descrita por Jefferson y col. (1987). Las plantas enteras o fragmentos de ellas fueron sumergidas en solución 1 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -ácido glucurónico (*x-gluc*) en 100 mM de fosfato de sodio a pH 7.0 y Triton X-100 al 0.1% y luego de 5 min de infiltración por vacío se incubaron toda la noche a 37 °C. Para una mejor visualización los tejidos se clarificaron con etanol 70%.

En el caso de los ensayos de daño mecánico y producido por insectos realizados en hojas de girasol y Arabidopsis transformadas con el promotor del gen *HAHB4* fusionado al gen reportero *GUS*, donde se pretendía determinar la inducción local de *GUS* en la zona de la lesión, los ensayos histoquímicos se realizaron de la forma descrita pero se los incubó durante 1 y 24 horas en luz continua. Estos cambios se debieron a que nuestros resultados indicaron que el promotor es fuertemente inducido por oscuridad, con lo cual esta inducción podría esconder cualquier efecto producido por el daño.

Las muestras que ya han sido decoloradas son fotografiadas usando una cámara digital Coolpi x 995 (Nikon) montada sobre un microscopio Eclipse E200 (Nikon) o sobre una lupa binocular SMZ800 (Nikon), y posteriormente procesadas con el programa Adobe Photoshop CS3.

### ***III.9.2 – Determinaciones de actividad de inhibidores de tripsina.***

La actividad de los inhibidores de tripsina en un extracto de proteínas de plantas se determinó usando una solución de 250  $\mu$ M N $\alpha$ -benzoyl-L-arginina etil éster (BAEE, Sigma-Aldrich) como sustrato para la tripsina. En un tubo de reacción se pre-incubaron durante 3 minutos 1000 U de tripsina (Sigma-Aldrich) con cantidades crecientes de extractos de proteínas provenientes de plantas salvajes o transgénicas. Esta pre-incubación permite a los inhibidores actuar sobre la tripsina. Una vez finalizada la pre-incubación se agregó la solución de BAEE y se registró el aumento de la absorbancia a 253 nm (proveniente de la conversión del BAEE por la tripsina) durante 5 minutos. La ecuación de la recta proveniente de la cinética de degradación del BAEE permite calcular la concentración de inhibidores siendo más alta la concentración de éstos cuando menor es la pendiente de la curva.

### ***III.9.3 – Determinaciones de actividad de lipoxigenasas e hidroperóxido liasa.***

La actividad de lipoxigenasas (LOX) e hidroperóxido liasa (HPL) fue determinada según describe Pérez y col., (1999).

Para la medición de la actividad de lipoxigenasa se extrajeron proteínas totales de 500  $\mu$ g de tejido vegetal usando 800  $\mu$ l de solución de extracción de LOX. Luego de la extracción se cuantificó la concentración de proteínas totales. Para cada reacción fueron diluidos entre 100 a 300  $\mu$ g de proteínas en 3 ml de solución amortiguadora de fosfato 100 mM pH 6 al cual se le adicionaron 60  $\mu$ l de ácido linolénico (LNA 10 mM) y se registró durante 5 minutos el aumento de absorbancia a 234 nm. Este aumento corresponde a la formación de ácido 13-hidroperoxi-octadecatrienoico (también conocido como ácido 13-hidroperóxido linolénico, 13-HPOT). Se realizaron curvas de calibración usando lipoxigenasa comercial (Fluka) para determinar la concentración de la enzima en los extractos de proteínas.

Para la medición de la actividad de HPL se extrajeron proteínas totales de 500  $\mu$ g de tejido vegetal usando 800  $\mu$ l de solución de extracción HPL. Para cada reacción se diluyeron entre 100 a 300  $\mu$ g de proteínas en 2,8 ml de solución amortiguadora de fosfato 200 mM pH 6; 50  $\mu$ M de 13-HPOT y se registro durante 2 minutos la disminución de absorbancia a 234 nm. La concentración de HPL se expresó en forma de actividad relativa con respecto a la muestra utilizadas como control.

### III.10 – Microscopia confocal y análisis de imágenes.

Las imágenes confocales de hojas o protoplastos fueron obtenidas usando un microscopio confocal “Carl Zeiss LSM5 Pascal laser scanning confocal microscope” (Zeiss, Jena, Germany) equipado con un láser de argón/helio/neón, con un objetivo de inmersión 40 x C-Apochromat (1,2 apertura numérica) y un filtro de paso largo de 560 nm para capturar la auto-fluorescencia de la clorofila. El “*pinhole*” del microscopio fue ajustado para obtener capas ópticas de 5  $\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron obtenidas y procesadas usando del programa de imágenes “Zeiss LSM image”. El numero de cloroplastos y su tamaño se calculó usando la aplicación de análisis de imágenes científicas incluido en el programa Adobe Photoshop CS3 versión extendida.

### III.11 – Medición del contenido de clorofila y de otros pigmentos.

Para la cuantificación de pigmentos, se colectaron y congelaron en  $\text{N}_2$  líquido 200 mg de hojas provenientes de plantas transgénicas y/o salvajes de 21 días.

Las concentraciones de clorofila y de carotenoides se determinaron siguiendo la metodología descrita por Whatley y col. (1963). Para ello 200 mg de hojas se molieron en  $\text{N}_2$  líquido y luego se le adiciona 10 ml de etanol absoluto y se lo incubó 16 horas a 4 °C protegiendo las muestras de la luz. Luego se tomó 1 ml de la solución, se la centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 480, 649 y 665 nm. A partir de las lecturas obtenidas, se calcularon las concentraciones de pigmentos de la siguiente forma:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/ml}): 12,19 A_{665} - 3,45 A_{649}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/ml}): 21,99 A_{649} - 5,32 A_{665}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/ml}): (1000 A_{480} - 2,14 (12,19 A_{665} - 3,45 A_{649}) - 70,16 (21,99 A_{649} - 5,32 A_{665}))/220$$

### III.12 – Ensayos de unión proteína-ADN.

#### III.12.1 – Preparación de los extractos de proteínas nucleares.

Los extractos de proteínas nucleares de girasol fueron realizados usando la técnica descrita por Maliga y col. (1995). Para ello se colocaron 5 ml de solución de homogeneización por gramo de tejido fresco y la mezcla se licuó en una licuadora casera. El homogeneizado se filtró por una tela de pañal y una de tipo *nylon mesh* (una capa de cada una). Luego se procedió de la siguiente manera: se centrifugó 20 minutos a 4 °C a 5000 rpm; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado

cuidadosamente en solución de homogeneización. Se centrifugó 10 minutos a 1912 g y se resuspendió en solución de homogeneización. Se repitió este último paso 10 minutos a 1464g y luego 8 min a 1464g, y por último 6 minutos a 1464g. Se descartó el máximo volumen de solución de homogeneización para luego resuspender en el mínimo volumen de solución de congelamiento (500 ul). Se congeló la solución en N<sub>2</sub> y se guardó a -80 °C cuando el uso de las muestras no fue inmediato.

Se agregó NaCl hasta una concentración final de 0.47 M (aprox. 182 ul de solución de lisis por cada ml de suspensión de núcleos). Se agitó durante 30 minutos a 4 °C. Se centrifugó 20 minutos a 12.000 g (10000rpm) a 4 °C para bajar la cromatina. Cuidadosamente se tomó el sobrenadante para que no se contamine con el precipitado y se dializó 3-4 horas en la heladera cambiando la solución de diálisis al menos 4 veces. Las proteínas se concentraron en columnas Amicon-Centricon 10, llevándolas a una concentración final de 1-3 mg/ml.

La calidad de las muestras de proteínas fue analizada por SDS-PAGE y la concentración de éstas fue determinada por la técnica de Bradford (Bradford., 1976).

### ***III.12.2 – Obtención y marcación de oligonucleótidos doble hebra.***

Las hebras de cada uno de los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizadas químicamente en forma separada (Alpha DNA). La hibridación de las hebras complementarias se llevó a cabo mezclando 400 ng de cada una de ellas en un volumen final de 20 µl de agua. La solución se mantuvo durante 5 minutos a una temperatura de 85 °C, dejando luego que ésta baje gradualmente hasta alcanzar los 25 °C. Dos µl de la solución de oligonucleótido doble hebra fueron incubados en un volumen final de 50 µl, en presencia de 10 µCi [<sup>32</sup>P]-αdATP (3000 Ci/mmol), dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM c/u, 1,5 U de Klenow (Promega) y solución amortiguadora 1 x suministrada por el proveedor de la enzima. La reacción de marcación se llevó a cabo durante 16 horas a temperatura ambiente y el [<sup>32</sup>P]-αdATP no incorporado se eliminó por filtración molecular en columnas de Sephadex G-50 (Amersham) siguiendo la técnica de Penefsky (Ausubel y col., 1988).

Los casos en los que se utilizó ADN producto de un corte con enzimas de restricción, este ADN debió ser purificado como se describe en **III.3.3** antes de la marcación radioactiva.

### III.12.3 – Ensayos de retardo en geles.

Los ensayos de retardo en geles fueron realizados según el protocolo descrito por Sessa y col. (1993). Se incubaron entre 8-10 µg de extractos de proteínas nucleares purificados en presencia de 0.3-0.6 ng de ADN doble hebra (10000 c.p.m) marcado radiactivamente con [<sup>32</sup>P]-αdATP, en un volumen final de 30 µl. Las reacciones se realizaron en solución de unión. Después de incubadas durante 20 minutos a 4 °C, se les adicionó ficoll hasta 2,5% (P/V), y se sembraron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante previamente pre-corrído a 100 V constantes durante 90 minutos. Las soluciones de corrida utilizadas fueron TBE 0,5 x o TGE 1x. Después de sembrar las muestras con la corriente encendida a la misma diferencia de potencial que durante la pre-corrída, ésta se modificó a 120 V constantes, y la electroforesis se dejó transcurrir aproximadamente 1 hora y 30 minutos. Posteriormente el gel se secó y se expuso a una placa radiográfica con pantalla intensificadora a -80 °C, durante 16 horas.

### III.13 – Análisis de intercambio gaseoso.

Las mediciones de intercambio de CO<sub>2</sub> fueron realizadas en hojas cortadas usando un sistema abierto de intercambio gaseoso acoplado a un analizador infrarrojo de gases (IRGA, Qubit Systems Inc., Kingston, On., Canadá). Un mínimo de tres hojas fueron selladas en la cámara de intercambio gaseoso iluminada con luz artificial a una intensidad de 250 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. La temperatura durante la medición fue mantenida entre 25-27 °C. Se usó aire ambiental para generar un flujo interno. Este aire contenía una concentración promedio de CO<sub>2</sub> de 380 a 400 µl/l. Las mediciones de intercambio gaseoso fueron repetidas al menos 5 veces para cada línea independiente de plantas transgénicas o salvajes usando 4 individuos diferentes de cada planta. Todo el proceso fue repetido 3 veces. Una vez finalizadas las mediciones el área de las hojas se calculó usando un escáner y los valores obtenidos se expresaron como µmol CO<sub>2</sub><sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>.

### III.14 – Secuencias de oligonucleótidos utilizados.

Usados para cuantificar expresión de genes en Arabidopsis			
Nombre	Id	Descripción	Secuencia
WRKY	At2g46400	Factor de transcripción WRKY	F: 5'-TCTATTGATGATGGTCACTGCTG-3' R: 5'-TGGTTTCCGAGATACTTCACT-3'
DRP	At1g66090	Proteína de resistencia	F: 5'-TGGAATTACGATGTTTGATCA-3' R: 5'-ATTTACGCCGTAGAAGATTGTCA-3'

		a enfermedades resistance protein	
ADC2	At4g34710	Arginina decarboxilasa	F: 5'-GGCGTTGAATACTGTGATTGTGC-3' R: 5'-TTACCCTTTTCACCAGAAGTTGA-3'
GRP	At2g05520	Proteína rica en Glicinas	F: 5'-CACAGTGAATTCAGAGAGTAAG-3' R: 5'-ATCTTCCTCCTCCTCCTTGGTA-3'
AR2	At4g30210	NADPH cyt-reductasa	F: 5'-CTGTGCCTTACGAGAAGAGTGAA-3' R: 5'-CAACACCAGATTCTACCAACGCT -3'
ZnFP	At1g51700	Factor de transcripción de tipo "zinc finger" Dof	F: 5'-GTGATGACACGTGGACTGACTTA-3' R: 5'-GGTGGAAAATGACGAAAAACAAA-3'
AuxRF	At5g62000	Factor de respuesta a auxinas	F: 5'-GCCAGATCAAATATAGCACCTT -3' R: 5'-ACTCTCAGTATGTTTCGTCCTCA-3'
FOR	At5g67290	Oxidoreductasa dependiente de FAD.	F: 5'-GGTACAACTCAAACAACAGCACA-3' R: 5'-AGAACCACCACGTCAGTGTCTAT-3'
GibRP	At2g14900	Proteína regulada por gibrelinas	F: 5'-AATAGTCTCCATCTTAGTGTTAG-3' R: 5'-TCCATCTTTGCTCTGCGGTGC-3'
COR413	At3g50830	Factor de aclimatación a frío	F: 5'-TGGATAGGCACTGTAATCAGC-3' R: 5'-ACAACCTGTCGATGAAAGAGGAA-3'
ACO	At1g62380	ACC oxidasa	F: 5'-CTGCACCGTGTGGTGACTCA-3' R: 5'-TGGCTCCTTGGGCTGAAACTT-3'
ALDH	At1g74920	Betaina aldehido dehidrogenasa	F: 5'-CCTACTCGCCAGCTATTCATC-3' R: 5'-GCGTTGACAGCAACATCCAC-3'
FNR	At1g20020	Ferredoxina-NADP <sup>+</sup> reductasa	F: 5'-GACCTGGCACATGGTTTTTCAG-3' R: 5'-GCGCTGCTTGCAATGGAGTAA-3'
UVR8	At5g63860	Proteína de resistencia a UVB	F: 5'-CGCTCTTCTCTCTGGTGACATT-3' R: 5'-CCATCCCCAACTGTAGACTTCC-3'
OEC23	At1g06680	Photosistema II Oxígeno dependiente complejo X23	F: 5'-TCGGTGAGACTGCCTCTGAG-3' R: 5'-TCCCTCCATTCACGGTTGCT-3'
SMT3	At1g76090	S-adenosil-metionina- esterol-C- metiltransferasa	F: 5'-GCTGGTTGCGGCGTGGGTGG-3' R: 5'-TGTGAAGCTTGGCTCGTTGC-3'
MDHR	At3g52880	Monodehidroascorbato o reductasa	F: 5'-AGTACATCATCCTCGGCGGC-3' R: 5'-TGCTAAGTGCAGGGCGTTCA-3'
EIN3	At3g20770	<i>Ethylene insensitive 3</i>	F: 5'-AGCTGAGCCTGATTCCATTGT-3' R: 5'-TTGAGACGTTTAAGCCGCATTTTG-3'
EIL 1	At2g27050	Proteína 1 semejante a <i>Ethylene-insensitive 3</i>	F: 5'-GACCTATCGGGCGTTGGAGTT-3' R: 5'-AGGCGTTTGGTTGCTTTGGACA-3'
SAM	At2g36880	S-Adenosilmetionina sintetasa	F: 5'-GCTGGCAATTGCAAGAACTGAG-3' R: 5'-CGCGAAAACAAATGTGAATGGT-3'
ERF-2	At5g47220	Factor de respuesta a etileno 2	F: 5'-GTTTGAGACGGCGGAAGATG-3' R: 5'-CGACGACGACGACGAAGAAGAT-3'
ERF-7	At3g20310	Factor de respuesta a etileno 7	F: 5'-GACCCGCCCTTCCAGTAACC-3' R: 5'-ACCGAGCCAGACACGAGATTTT-3'
ERF-5	At5g47230	Factor de respuesta a etileno 5	F: 5'-CAATTCGCAGCTGAAAACACC-3' R: 5'-CGCTGTATCAAACGTCCCAAG-3'
ERF-B3	At5g61600	Factor de respuesta a etileno B-3	F: 5'-GCGGCTAGGGTTAAAGTGGAG-3' R: 5'-GTCGGAGATAACGGAGGAATAC-3'
AP2	At5g51190	Factor de respuesta a	F: 5'-TTTGCCTCCACCATCCACCACT-3' R: 5'-GACGCCTCTGTAATGCCTTTGA-3'

		etileno con dominio AP2	
CSD1	At1g08830	Cu/Zn superóxido dismutasa	F: 5'-TTTCACCCAGGAAGGCGATG-3' R: 5'-GGGCACCGTGTGTTTTACCA-3'
PSB-X	At2g06520	Subunidad PSB-X del fotosistema II	F: 5'-CTCCGCGGCTGCTCTTACTG-3' R: 5'-CGACGACGACACCAATGATGAC-3'
LHCA3.1	At1g61520	Proteína de unión a clorofila A-B / LHCI tipo III	F: 5'-CCACCAGCAGGGACATACACTT-3' R: 5'-AACCGGCCAAACCCTTCTCTA-3'
PSI-L	At4g12800	Subunidad XI/V del fotosistema I	F: 5'-CGGCTGGGCTAGTAGTCATCCTC-3' R: 5'-TTCCGCCAGTCAAAGTCAAAC-3'
PRK	At1g32060	Fosforibuloquinasa	F: 5'-TTAGGCGGAGAAGAAGAGGAGAC-3' R: 5'-GGTTGACGACGGTAGAGGAAGACT-3'
RuBisCO Act	At2g39730	Activasa de la ribulosa bisfosfato carboxilasa /oxigenasa	F: 5'-CCGACCCGTGAAGACCGTATC-3' R: 5'-GCCCTCAAAGCACCGAAGAAAT-3'
PhG-P	At5g36790	Fosfoglicolato fosfatasa	F: 5'-GGTGGCTCTATGGTTGGTGCTCT-3' R: 5'-TGCCCGAATAAAATGTCAGTGTCC-3'
LOX2	At3g45140	Lipoxigenasa 2	F: 5'-GAACAGGTGCTGGGATGCCTC-3' R: 5'-GCTGTTGGGAATACCACGGCC-3'
HPL1	At4g15440	Hidroperoxido liasa	F: 5'-GGACATTGTCACTCTCACGGC-3' R: 5'-CAACAGCTTTAATTGAACCGGAG-3'
AOS	At3g15500	Allene oxidasa sintetasa	F: 5'-TTGGCGACGAGAGATCCGAAG-3' R: 5'-CGTCTCCGGTCCATTCGACC-3'
GUS	AAB30197	Beta-Glucuronidasa	F: 5'-TGCGGACTTACGTGGCAAAGGAT-3' R: 5'-AAGCCGACAGCAGCAGTTTCATC-3'
ACTIN	ACTIN 2 (U41998) ACTIN 8 (U42007)	Genes Actina 2 y 8 usados como normalizadores en PCR cuantitativas	F: 5'-GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG-3' R: 5'-AACGACCTTAATCTTCATGCTGC-3'
Kana	AAV51261	Neomicina fosfo-transferasa II.	F: 5'-TGCCCATTCGACCACCAAGCG-3' R: 5'-CCTTGAGCCTGGCGAACAGTT-3'

<b>Usados para cuantificar expresión de genes en girasol y maíz.</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Id</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
HA-ACOb	AAC49833	Ácido aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa	F: 5'-AACTACCCACCATGCCCAACA-3' R: 5'-TCGATCCATTCGCCGTCCTTA-3'
HA-CSD1	CAH06454	Cu/Zn superóxido dismutasa 1	F: 5'-ATGCCCTGATGACGAGATTC-3' R: 5'-TAGCTCATGCCCTCCCTTCC-3'
HA-EIN3	BU026128	Similar a AT <i>ethylene-insensitive 3</i>	F: 5'-ATGTTTCCGGATATGGCTAAGA-3' R: 5'-CGGTGGACATAATCAGGGTAA-3'
HA-EIL1	TC10466	Similar a AT EIL1	F: 5'-AATCATAATCCGCCTCGTAGTTCC-3' R: 5'-TTGAGATTTCCGTTGGTCTTTTGA-3'
HA-ERF5	CD857752	Similar a AT ERF5	F: 5'-TTCGATTCACTACTTCTTCTT-3' R: 5'-ACGCCGCGGTGGTTGTTGTT-3'
HA-SAM	TC12465	Similar a AT S-adenosilmetionina sintetasa	F: 5'-TCAAGAGGGGTGGCAACAAAAG-3' R: 5'-CATGCCGAGTGAAAGCGTGATT-3'
HA-ACOb	TC11241	Similar a Ácido aminociclopropano-1-	F: 5'-GCTCCTAACCCACCCGAACCAC-3' R: 5'-AACAGCAAGCCCGTCAGCACAT-3'

		carboxílico oxidasa	
HA-ALDH	TC9922	Similar a AT betaína aldehído dehidrogenasa	F: 5'-TTCGGCCCTGTTCAAAGCATC-3' R: 5'-CCAAACAGTTCAGCCCTCAAT-3'
HA_PSB-X	TC9887	Subunidad PSB-X del fotosistema II	F: 5'-CCACAATCACAACCTCCTTCTTCA-3' R: 5'-CTGTCACGGCGTTCTCCTTCA-3'
HA_LHC A3.1	TC9218	Proteína de unión a clorofila A-B / LHCI tipo III	F: 5'-GAAGCTAAAAGAAATCAAGAATG-3' R: 5'-GTAAGGCCCAACCCCAGTCA-3'
HA_PSI-L	TC12352	Subunidad XI/V del fotosistema I	F: 5'-GCGGGTGGGCTAGTCGTAAT-3' R: 5'-TTCCTCCCGGTCAAAGTCAAC-3'
HA_PRK	TC14557	Fosforibuloquinasa	F: 5'-TGCTCAATCTCATCACCCACAA-3' R: 5'-TCACCACTTTTAAACCTCCCACTT-3'
HA_RuBisCO Act	TC9900	Activasa de la ribulosa bisfosfato carboxilasa /oxigenasa	F: 5'-GTCCCCATCATCGTCACAGG-3' R: 5'-CCCCAATCCGGTCTTCTCTA-3'
HA_PhGP	CD845871	Fosfoglicolato fosfatasa	F: 5'-TCGGAGATCTTGCTTGTGTAAAAA-3' R: 5'-AAATGGTGGATGCAAAACTCTTCT-3'
HA_FNR	TC9179	Ferredoxina-NADP <sup>+</sup> reductasa	F: 5'-GTGCGGGCTTAAGGGTATGGAG-3' R: 5'-TGCCCTTCTTTCTTCAACTGCT-3'
HA-TI1	QHA14B10	Similar a inhibidor de tripsina 1 de AT	F: 5'-GTTTTTGTCTTAGCGTATCTCC-3' R: 5'-CCTCTAATCTCATTACCACTCCC-3'
HA-TI2	QHI15B16	Similar a inhibidor de tripsina 2 de AT	F: 5'-TTGAGACTGTGAGACCGAGGAT-3' R: 5'-ACCATTAACAAGAACAAACGATTG-3'
HA-HPL1	TC16739	Hidroperóxido liasa	F: 5'-AAGACGCGACTCATAATCTCC-3' R: 5'-CTTTTCTTGAATCCCGGTTTTGTC-3'
HA-DEF-L	TC20687	Similar a <i>defensin-like</i> (DEFL)	F: 5'-AGGAGAAGATTGAACCCGAAAAG-3' R: 5'-GAAAATGCTGAATATGCCAAGTAG-3'
HA-LOX2	TC19595	Lipoxigenasa 2	F: 5'-CTCATTTTCGTTACACAATGGAG-3' R: 5'-GTAGACCGTAGGCGACTGAAC-3'
HA-LOX3	TC18116	Lipoxigenasa 3	F: 5'-CACCGTCATTTGGTTGGCGTC-3' R: 5'-GGTATGTAGCCGCTGTATGGG-3'
HA-OPR2	TC22318	12-oxofitodienoato reductasa	F: 5'-CTGGGAACAAAGCTGAAACTCC-3' R: 5'-CCACCGGCTACCACCTTGTCT-3'
HA-AOS	BQ910768	Allene oxidasa sintetasa	F: 5'-CGTGACTIONGGTCTAACGGACC-3' R: 5'-TCGAACGAATCGTATCGCCGG-3'
HA-NAC3	TC22370	Factor de transcripción tipo NAC 3	F: 5'-CACATGTTGAAGACGGTGAGCG-3' R: 5'-TTGCCCTTCAACTTGTGTCCC-3'
HA-SPI1	CD852242	Inhibidor de proteasas de serina 1	F: 5'-TTCGTTATTAGCCCGTGTGAGC-3' R: 5'-CCCACATAAAGATAACGAGTCC-3'
HA-VSP	TC15796	Proteína de almacenamiento vegetativo	F: 5'-GGCTGGATACAGGATTAGAGGG-3' R: 5'-TCGAGTCAATTAGCCGATGTAG-3'
ZM-LOX2	TC368683	Lipoxigenasa 2	F: 5'-GGCATCCCCAACAGCATCTCC-3' R: 5'-CAATACAATAGTACAGACGAGACC-3'
ZM-HPL1	TC315981	Hidroperóxido liasa	F: 5'-GCCCCACGCAGAAGATCGGCC-3' R: 5'-CGGTACAGCACGTAGTAGCCC-3'
ZM-AOS	TC355248	Allene oxidasa sintetasa	F: 5'-GACAACAAGCAGTGCCCCGG-3' R: 5'-GTGCCGAGCAGCTCCTTGCC-3'

ZM-ACT	TC316054	Actina 2 y 8 de maíz.	F: 5'-GGCAACATTGTGCTCAGTGGAGG-3' R: 5'-GACGACCTTGATCTTCATGCTGC-3'
HA-Actina	TC26446	Actina 2 y 8 de girasol	F: 5'-GGTAACATCGTGCTCAGTGGTGG-3' R: 5'-AACCACCTTGATCTTCATGCTGC-3'
HAHB4	AAA63768	<i>Helianthus annuus</i> - homeobox-leuzine zipper 4	F: 5'-GGGCTTCATCCTGGTCAAGTGGC-3' R: 5'-ACGCAAGCGTCTCGTAGTTATG-3'

#### Usados para generar fragmentos del promotor de *HAHB4*

Construcción	Oligo usado	Secuencia
-200	IPRC8 H4-200	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-GGCAAGCTTATCTCAACCGAAAGTGAC-3'
-300	IPRC8 IPCR6	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-CCCAAGCTTAACCTAAGTCCGCCTTTG-3'
-500	IPRC8 -500	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-GCGAAGCTTCCTAATCTCCCATCATCA-3'
-600	IPRC8 -600	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-GGCAAGCTTATTCACCACATCGGGATA-3'
-800	IPRC8 -800	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-GCGAAGCTTACTTGTACTTTTGTTC-3'
PEC	IPRC8 Prott26	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-GCGGTCGACACCTGGCACATCGTATCTT-3'
PEL	IPRC8 Prott26	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-GCGGTCGACACCTGGCACATCGTATCTT-3'

#### Usados para generar quimeras del promotor de *HAHB4*

$\Delta 1:1$	IPRC8 PelminF PelminR 900	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-TTTGTGGCCAACGCGTACACCTGTGC-3' 5'-TACGCGTTGGCAAACAAAAGTACAAGT-3' 5'-CCCAAGCTTCACCAATTTCAATTC-3'
$\Delta 2:1$	IPRC8 PelminF PelminR Prott26	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-TTTGTGGCCAACGCGTACACCTGTGC-3' 5'-TACGCGTTGGCAAACAAAAGTACAAGT-3' 5'-GCGGTCGACACCTGGCACATCGTATCTT-3'
$\Delta 1:4$	IPRC8 400/5'/pelF 400/5'/pelR 900	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-TTTGTGGCGATGCGAACGAGTGGTTT-3' 5'-GTTCGCATCGCAAACAAAAGTACAAGT-3' 5'-CCCAAGCTTCACCAATTTCAATTC-3'
$\Delta 2:4$	IPRC8 400/5'/pelF 400/5'/pelR Prott26	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-TTTGTGGCGATGCGAACGAGTGGTTT-3' 5'-GTTCGCATCGCAAACAAAAGTACAAGT-3' 5'-GCGGTCGACACCTGGCACATCGTATCTT-3'
$\Delta 3:1$	IPRC8 100-3-4F 100-3-4R IPCR4	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-CCGCTTTGCAACGCGTACACCTGTGC-3' 5'-TACGCGTTGCAAAGGCGGACTTAGGTT-3' 5'-GCGAAGCTTGATGCGAACGAGTGGTTA-3'
$\Delta 2:3:1$	IPRC8 100-3-4F 100-3-4R 400/5'/pelF	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-CCGCTTTGCAACGCGTACACCTGTGC-3' 5'-TACGCGTTGCAAAGGCGGACTTAGGTT-3' 5'-TTTGTGGCGATGCGAACGAGTGGTTT-3'

	400/5'/pelR Prot26	5'-GTTTCGCATCGCAAACAAAAGTACAAGT-3' 5'-GCGGTCGACACCTGGCACATCGTATCTT-3'
--	-----------------------	--

**Usados para generar mutaciones del promotor de *HAHB4***

Mut 3' osc	IPRC8 Mutosc3' F Mutosc3' R -600	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-ACCCACCCCTAAGTCCGCCTTTGTCTG-3' 5'-GCGGACTTAGGGGTGGGTGGTCCCTT-3' 5'-GGCAAGCTTATTCACCACATCGGGATA-3'
Mut 5' osc	IPRC8 Mutosc5' F Mutosc5' R -600	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-ACGAGTGGTATACTTTTAAGAGGTGCGA-3' 5'-CTTAAAAGTATAACCACTCGTTCGCATC-3' 5'-GGCAAGCTTATTCACCACATCGGGATA-3'
2 Mut osc	IPRC8 Mutosc3' F Mutosc3' R Mutosc5' F Mutosc5' R -600	5'-CGCGGATCCGAGGGTTTGATAAGTGAT-3' 5'-ACCCACCCCTAAGTCCGCCTTTGTCTG-3' 5'-GCGGACTTAGGGGTGGGTGGTCCCTT-3' 5'-ACGAGTGGTATACTTTTAAGAGGTGCGA-3' 5'-CTTAAAAGTATAACCACTCGTTCGCATC-3' 5'-GGCAAGCTTATTCACCACATCGGGATA-3'
Mut W-Box	W-Bo x F W-Bo x R	5'-TTTCCTTTTTTCATATTAAGTAGAGCCC-3' 5'-TTAATATGAAAAGGAAATGAAATTGGTGA-3'

**Usados para el clonado de la construcción de ARNi en pHannibal.**

HAHB4 sentido	RNAi H4S F RNAi H4S R	5'-GGGCTCGAGCTACTCAATCAGTTGGAGG-3' 5'-CCCGGTACCAGTGTAACCAACTATCTGG-3'
HAHB4 antisentido	RNAi H4AS F RNAi H4AS R	5'-GGGTCTAGACTACTCAATCAGTTGGAGG-3' 5'-GGGAAGCTTAGGTGTAACCAACTATCTGG-3'
ADNc HAHB4	T1 T2	5'-GCGGGATCCACCATGTCTCTTCAACAAGTA-3' 5'-GCCGAGCTTTAGAACTCCAACCACTTTTG-3'

**Usados en ensayos de retardo en gel.**

Sonda de -300 a -400	+300 IPCR4	5'-CGCTCTAGACAAAGGCGGACTTAGGTT-3' 5'-GCGAAGCTTGATGCGAACGAGTGGTTTA-3'
-------------------------	---------------	---

**III.15 – Soluciones de trabajo usadas (ordenadas alfabéticamente).**

**Solución I de Minipreparación:** Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), glucosa 50 mM, EDTA 10 mM.

**Solución II de Minipreparación:** NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v).

**Solución de congelamiento:** Hepes (pH7.6) 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 10 mM, glicerol 50 %, DTT 1mM y PMSF 0,2 mM (estos dos últimos se agregaron inmediatamente antes de usar).

**Solución de corrida Laemmli 10x:** Tris 250 mM, glicina 2,5 M, SDS 1% (P/V).

**Solución de desnaturalización:** HEPES 1,3x, formaldehído 10%, formamida 50%

**Solución de diálisis:** NaCl 40 mM, Hepes (pH7,6) 20 mM, EDTA 0,2 mM, glicerol 20 %, DTT 1mM y PMSF 0,2 mM (estos dos últimos reactivos se agregaron inmediatamente antes de usar).

**Solución extracción de ADN Arabidopsis:** Tris-HCl 200 mM (pH 8,0), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5% (p/v)

**Solución extracción ADN girasol y maíz:** CTAB 2% (P/V), NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), EDTA 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2% (V/V)

**Solución extracción HPL:** 0,1 M Tris-HCl pH8, 1M KCl, 25 mg/ml polivinilpolipirrolidona (PVPP), 0,1 % tritón X-100

**Solución extracción LOX:** 0,1 M Tris-HCl pH8, 1M KCl, 25 mg/ml polivinilpolipirrolidona (PVPP)

**Solución de homogeneización:** sacarosa 250 mM, NaCl 10 mM, Pipes (pH 7) 25 mM, EDTA (pH8) 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM (agregar antes de usar), Tritón X-100 0,1% (agregar antes de usar), PMSF 0,2 mM (agregar antes de usar)

**Solución de lisis:** NaCl 2,5M, Hepes (pH7,6) 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 10 mM, glicerol 20 %, DTT 1mM (agregar antes de usar), PMSF 0,2 mM (agregar antes de usar).

**Solución de siembra geles agarosa:** Azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilencianol FF 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v).

**Solución de siembra geles de retardo:** Tris-HCl pH 7,0 100 mM, glicerol 20% (V/V), SDS 4% (P/V),  $\beta$ -mercaptoetanol 10% (P/V), azul de bromofenol 0,01% (P/V).

**Solución de unión geles de retardo:** HEPES pH 7,5 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM.

**Denhardt 100x:** Polivinilpirrolidona 2% (p/v), albúmina sérica bovina 2% (p/v), ficoll 2% (p/v)

**Gel de retardo:** acrilamida 30% (P/V) 6,5 ml, bisacrilamida 2% (P/V) 1,6 ml, TGE 10 x 2 ml, glicerol 50% (P/V) 2 ml, PSA 30% (P/V) 150 µl, TEMED 44 µl, agua bidestilada 40 ml.

**HEPES 1x:** HEPES 20 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM

**LB:** Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l; pH 7,0. Para preparar el medio sólido se añade 15 g/l de agar.

**Medio MS:** KNO<sub>3</sub> 1,9 g/l, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,65 g/l, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,44 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,37 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 g/l, Na<sub>2</sub>EDTA 37,3 mg/l, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 27,8 mg/l, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 22,3 mg/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6,2 mg/l, ZnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 8,6 mg/l, KI 0,83 mg/l, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,25 mg/l, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,025 mg/l, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,025 mg/l. Se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 1 M. Para medios sólidos se añade 8 g/l de agar.

**PBS:** NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l. Se ajusta a pH 7,4 usando HCl.

**Solución OLB:** Mezcla de las soluciones A, B y C en una relación 100:250:150

Solución A: 1 ml de solución O (Tris-HCl 1,25 M (pH 8,0), MgCl<sub>2</sub> 0,125 M), 18 µl β-mercaptoetanol, 5 µl dCTP, 5 µl dGTP, 5 µl dTTP 0,1M c/u

Solución B: Hepes 2 M (pH 6,6)

Solución C: Hexanucleótidos de secuencia al azar (dN<sub>6</sub>) de concentración 90 D.O./ml

**Solución de prehibridización:** SSC 5 x, SDS 0,5% (p/v), solución de Denhardt 5 x

**SSC 6 x:** NaCl 0,9 M, Na<sub>3</sub>citrato 0,09 M

**SSC 2 x:** NaCl 0,3 M, Na<sub>3</sub>citrato 0,03 M

**TAE 1 x:** Tris-Ac 20 mM (pH 8,5), EDTA 1 mM.

**TBE 1 x:** Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 20 mM.

**TE:** Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1mM

**TGE 1 x:** Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, EDTA 1 mM.

***TRIZOL casero:***

Preparación de fenol ácido

- Se fundió el fenol (guardado en freezer a -20 °C) en un baño a 68 °C
- Se adicionó 0,1% de Hidroxiquinoleína (antioxidante, inhibidor de ARNasas)
- Se adicionó agua bidestilada para saturar
- Se dejó descansar un día
- Se extrajo el agua de la fase superior y se le adicionó agua nueva
- Se repitieron los dos últimos pasos dos veces más
- Se fraccionó en frascos, se rotuló y se guardó en heladera.
- De esta forma el fenol es estable entre 8 a 10 meses.

Para la preparación de 100 ml de Trizol: fenol ácido 38 ml, tiocianato de guanidina (0,8M) 9,453 g, tiocianato de amonio (0,4 M) 3,045 g, NaAc pH 5,0 (0,1 M) 3,34 ml (del stock 3 M), glicerol 5% 5,75 ml (del stock 87%), agua bidestilada hasta 100 ml.

***Vitaminas de Gamborg:*** m-inositol 100 mg/l, tiamina-HCl 10 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, piridoxina-HCl 1 mg/l.