



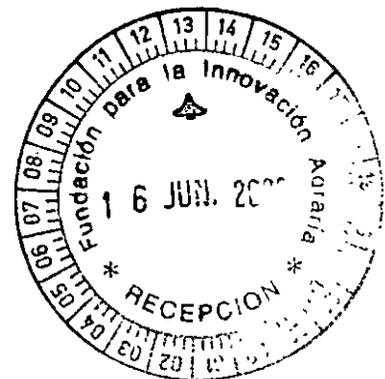
GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

PROYECTO: BIOT-01-A-065

Coordinador del Proyecto: Dr. Simón Ruiz Lara
Firma

Fecha de entrega 16 de Junio de 2006





GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	1.6 JUN. 2006
Hora	13:59
Nº Ingreso	2892

I. ANTECEDENTES GENERALES

- **Código :**
BIOT-01-A-065
BID-PI-C-2004-1-A-065
- **Nombre del Proyecto:**
"Generación de un banco de genes de tolerancia a estrés abiótico de plantas nativas, utilizables en programas de mejoramiento genético vía transgenosis de variedades cultivables"
- **Región o Regiones de Ejecución** (*Originalmente planteadas en la propuesta y las efectivas*):
Séptima Región
- **Agente Ejecutor:**
Universidad de Talca
- **Agente(s) Asociado(s)** (*Originalmente planteados en la propuesta y los efectivos*)
Servicios Integrales en Biotecnología -Bioplanet-Limitada
- **Coordinador del Proyecto:**
Dr. Simón Ruiz Lara
- **Costo Total** (*Programado y Real*):
Programado:
Real:
- **Aporte del FIA** (en pesos; porcentaje del costo total) (*Programado y Real*)
Programado:
Real :
- **Período de Ejecución** (*Programado y Real*)
Programado: 46 Meses
Real: 52 Meses



II. RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto tenía como objetivo principal el generar un banco de genes de tolerancia estrés abiótico obtenidos de la planta *Lycoersicon chilense* que pudiesen ser utilizados en estrategias de mejoramiento genético vía transgenosis de variedades cultivables. Para ello, se colectaron las semillas de la planta en estudio desde su hábitat natural, se seleccionaron plantas de dos poblaciones llamadas LLuta y Candelabro, que presentaran mejor tolerancia a los diversos estrés tabajados. A partir de estas plantas se hicieron plantas clónicas que fueron luego usadas en todos los experimentos. Las técnicas usadas para aislar los genes diferencialmente expresado fueron dos Hibridación substractiva y Differential diplay, con ellas se aislaron más de 100 fragmentos de DNA de expresión diferencial, seleccionándose solo aquellos que presentaban esta característica y no eran falsos positivos de las técnicas empleadas. Dado el número de genes el equipo técnico decidió seleccionar un grupo de genes con los cuales se continuaría la investigación, de estos genes se obtuvieron los cDNAs de largo total y ellos se clonaron en el vector pBI121. Así los plasmidos recombinantes quiméricos fueron usados para transformar la *Agrobacterium tumefasciens* y posteriormente la bacteria transformada para obtener plantas transgénicas de tomate y tabaco, las cuales fueron evaluadas en cuanto a su capacidad de otorgar tolerancia al estrés abiótico. El resultado fue que líneas transgénicas que contenían 4 genes diferentes, fueron capaces de otorgar tolerancia a 150 y 250 mM de Na Cl, cuando para *L. esculentum* un 50 mM de Na Cl resulta tóxico. Por otro lado, no fue posible aislar los promotores de los genes. Sin embargo, para un gen fue posible determinar que su expresión esta regulada por las señales químicas ABA y etileno.

En resumen los objetivos del proyecto fueron alcanzados casi en su totalidad y se ha ganado una nueva fuente de recursos genéticos y se han conseguido genes para el mejoramiento genético vía transgénesis.

En lo económico el proyecto fue ajustado un par de veces sin que ello sobrepasa el 15% del total solicitado inicialmente, con lo cual se puede decir que las cantidades fueron bastante bien calculadas y manejadas. Desde el punto de vista de proyecciones, el proyecto queda en la incertidumbre de lo que ocurrirá con los resultados obtenidos si no se obtiene recurso para continuar su investigación, y poder cerrarlo con patentes y pruebas de campo.



III. INFORME TÉCNICO (TEXTO PRINCIPAL)

1. Objetivos del Proyecto:

El proyecto fue planteado con el siguiente **Objetivo General**:

“Generar un banco de genes de tolerancia a estrés abiótico aislados y caracterizados del genoma de la planta nativa *Lycopersicon chilense* “

y los siguientes **Objetivos Específicos**:

- a. **Obtención y propagación del material vegetal a utilizar en el desarrollo del proyecto.**
- b. **Identificar transcritos diferencialmente expresados en plantas de *L.chilense* sometidas a estrés hídrico.**
- c. **Identificar transcritos diferencialmente expresados en plantas de *L. chilense* sometidas a estrés salino.**
- d. **Identificar transcritos diferencialmente expresados en plantas de *L. chilense* sometidas a estrés por temperaturas bajas.**
- e. **Aislar los genes correspondientes a los transcritos de expresión diferencial que estén relacionados a la tolerancia de las diferentes condiciones de estrés abiótico analizadas.**
- f. **Caracterizar los genes aislados. Determinación de su secuencia nucleotídica e identificación de los elementos regulatorios de la expresión génica.**
- g. **Evaluar la especificidad de expresión de los genes aislados en plantas transgénicas heterólogas (arabidopsis y tomate).**
- h. **Dotar de la estructura tecnológica básica para la ejecución del proyecto**

En el análisis cuantificable del logro de los objetivos planteados, es posible asegurar que estos fueron alcanzados en un 95 %. La razón de ello es que los objetivos específicos f y g solo pudieron ser parcialmente logrados, a diferencia de los restantes que fueron conseguidos en un 100%. A pesar de esta discrepancia, el objetivo General ha sido logrado a cabalidad.

Dada las características de la investigación planteada en este Proyecto, el porcentaje de logro de los objetivos es extremadamente alto, más aún considerando que del substrato de esta investigación, la planta nativa *L.chilense*, se tenía muy escasa información tanto desde el punto de vista fisiológico como de su Biología Molecular. De tal manera que, este proyecto a permitido recuperar un recurso fitogenético de importancia para el país, lo cual puede considerarse un objetivo subsidiario que ha sido también ampliamente logrado. Al mismo



considerarse un objetivo subsidiario que ha sido también ampliamente logrado. Al mismo tiempo y en la línea de objetivos subsidiarios, el proyecto también ha permitido que jóvenes científicos pudieran desarrollar trabajos de Tesis Doctoral. Por otro lado, más de 60 jóvenes entre profesionales y estudiantes de últimos años de carreras de Agronomía, Bioquímica, Ingeniería en Biotecnología y estudiantes de Post-grado tuvieron gracias a este proyecto la posibilidad de participar de manera gratuita en un Simposio que reunió a los más importantes investigadores nacionales en área de biotecnología vegetal y les brindó la oportunidad de compartir experiencias con destacados investigadores Internacionales.

Independientemente de lo anterior, lo más destacado ha sido el lograr que, al menos, cinco genes han demostrado ser capaces de otorgar tolerancia a estrés abiótico a plantas transgénicas de tomate *Lycopersicon esculentum* var. money maker. Abriendo con ello la posibilidad de ampliar las superficies cultivables del país.

2. Metodología del Proyecto:

1.- Colección de semillas de plantas de tomate *L. chilense* desde su habitat natural.

Se realizó una expedición al desierto de Atacama para buscar frutos de la planta en estudio. Un grupo de plantas fueron localizadas en el Valle de Lluta desde los 300 mts de altitud hasta los aproximadamente 1000 mts, las plantas de este grupo fueron denominadas *Lycopersicon chilense* var. Lluta. Un segundo grupo de plantas fue localizado entre los 2300 y 3000 mts de altitud, ha este grupo se les denominó *Lycopersicon chilense* var. Candelabro. Desde ambos grupos de plantas se colectaron frutos. Junto a lo anterior se colectaron muestras de tierra de las plantas del grupo Candelabros para los análisis de suelo, y se realizaron mediciones de la temperatura diurna y nocturna para determinar los máximos y mínimos a los cuales la planta esta expuesta en su habitat natural (Figura 1)

2.- Preparación y siembra de semillas.-

En el laboratorio los frutos colectados de ambos grupos de plantas fueron abiertos para obtener las semillas correspondientes. Una vez que las semillas fueron lavadas secas y esterilizadas una fracción de ellas fue sometida a un shock de bajas temperaturas antes de ser sembradas en: cultivo *in vitro* con medio Murashige Skoog en 0.8 % agar y en macetas en una mezcla 1:1:1 de perlita turba y vermiculita.

3.- Cultivo y replicación de Plantas

Las semillas puestas en cultivo *in vitro* fueron colocadas en cámaras de crecimiento de plantas a un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad a una temperatura de 26 °C y 55% de humedad relativa. A las tres semanas de edad las plantas germinadas fueron separadas dejando solo 3 plantas por magenta. Cuando las plantas cumplieron 5 semanas de edad, diez de cada grupo cultivadas *in vitro* fueron usadas para obtener réplicas de ellas con el fin de asegurar plantas para sucesivos experimentos. Cuando las plantas han alcanzado un tamaño adecuado 4 semanas un tercer repique de las plantas en cultivo *in vitro* fue realizado con fin de tener una colección de plantas clónicas..



4.- *Establecimiento de las condiciones de estrés hídrico de las plantas de L. chilense.*

Para someter a estrés hídrico las plantas se realizaron dos procedimientos, los que estuvieron determinados por los tiempos en los cuales se tomaron las muestras. Así se definió: un periodo corto de tiempo y un periodo largo de tiempo.

Las condiciones de estrés para el periodo corto de tiempo fue el siguiente: Plantas de ambas variedades (Lluta y Candelabro), de aproximadamente 6 semanas de edad que habían sido cultivadas en macetas, fueron retiradas de la maceta y separadas en dos grupos. Un grupo de ellas, se incubó en placas de Petri sobre papel filtro seco a temperatura ambiente y un segundo grupo fue puesto en iguales condiciones pero sobre papel filtro empapado en agua. La masa de las plantas fueron previamente determinadas. Después de permanecer 1, 1,5 y 2 horas, las plantas fueron colectadas, determinada nuevamente su masa, congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C .

Para el estrés hídrico de periodo largo de tiempo, el procedimiento fue el siguiente: Macetas que contenían separadamente tres plantas de la variedad Lluta y tres plantas de la variedad Candelabro, de aproximadamente 8 semanas de edad fueron separadas en dos grupos: Uno de los grupos fue regado periódicamente, en cambio el segundo grupo no fue regado. Con la finalidad de medir la pérdida del peso húmedo de la mezcla sustrato (perlita, turba y vermiculita) del grupo de plantas sin regar, se determinó la masa del sustrato a los tiempos 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días, para lo cual se utilizó una medida estándar que consistió en el volumen de una cápsula de petri pequeña. Similar análisis y en los mismo tiempos, se realizó con las hojas colectadas de la zona basal, central y apical de la planta. En cada tiempo las plantas fueron colectadas, congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C .

5.- *Establecimiento de las condiciones de estrés salino de las plantas de L. chilense.*

Plantas de ambas variedades de 3 semanas de edad cultivadas en macetas, fueron delicadamente retiradas de sus macetas sin dañar la raíz y fueron colocadas en un cultivo hidropónico de $\frac{1}{4}$ medio MS, durante dos días para que ellas se adaptaran a su nuevo régimen de cultivo. Pasado este tiempo las plantas fueron separadas en tres grupos: Un grupo fue mantenido en $\frac{1}{4}$ de medio MS, un segundo grupo fue cultivado en $\frac{1}{4}$ de MS suplementado con 200 mM NaCl y un tercer grupo fue cultivado en $\frac{1}{4}$ de MS suplementado con 300 mM NaCl. Las plantas de cada grupo fueron colectadas a los 0,5, 2, 5, 7 y 10 días de incubación. Posteriormente ellas fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C hasta la purificación de sus RNAs.

Un experimento en iguales condiciones ha sido realizado para estudiar el tiempo que las plantas son capaces de soportar este nivel de salinidad.

6.- *Establecimiento de las condiciones de estrés por temperaturas bajas de las plantas de L. chilense.*

Las plantas han sido sometidas a bajas temperaturas de dos formas:

a) **Exposición de plantas a bajas temperaturas por periodo corto.**

Plantas de *L. chilense* tanto de la variedad Lluta como de la variedad Candelabro cultivadas *in vitro* 6 semanas de edad, fueron sometidas a estrés de baja temperatura mediante incubación por 12 horas a 4°C en cámara de crecimiento con iluminación



permanente. Tras el período de incubación, las plantas en su totalidad fueron procesadas para extracción y purificación de RNA total.

b) Aclimatación a frío mediante exposición a bajas temperaturas por períodos prolongados.

Plantas de ambas variedades de *L. chilense*, cultivadas en macetas, fueron incubadas por un período de hasta 10 días en cámara de crecimiento mantenida a 6°C, 55% de humedad con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Las plantas fueron monitoreadas permanentemente para evaluar su aclimatación a las condiciones de incubación. Para análisis de expresión génica diferencial, muestras de hojas fueron tomadas a las 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 y 240 horas y procesadas para purificación de RNA total.

7.- Extracción y purificación de RNAs totales de plantas experimentales y controles

Dos procedimientos fueron utilizados para la extracción de RNAs totales. La utilización de uno u otro procedimiento fue determinado por el volumen de la muestra. Cuando la muestra es superior a 200 mg fue utilizado el método del Trizol (Gibco BRL) descrito por Chomczynski and Sacchi (Catálogo 15596 Gibco BRL). En cambio, cuando la muestra es inferior a la cantidad descrita fue usado el kit SV total RNA isolation system (Promega). Los RNAs obtenidos por ambos métodos fueron, posteriormente incubados con un exceso de DNase I-RNase free, con el fin de asegurar la eliminación de DNA contaminante. Todos los RNAs obtenidos han sido analizados por electroforesis desnaturante en gel de agarosa-formaldehído.

8.- Realización de hibridaciones substractivas y Differential Display.

- a) Hibridaciones sustractivas por PCR-Select: Para la ejecución de la Técnica de PCR select, es preciso, según las indicaciones de los proveedores, iniciar el procedimiento con RNA poli A+, para lo cual dichos RNAs fueron obtenidos mediante el Kit Poli AT tract mRNA isolation System IV (Promega) de acuerdo a las especificaciones de los proveedores. Con los mRNAs así obtenidos se procedió a realizar la Técnica de PCR-Select cDNA Substraction Kit (Clontech) de acuerdo a las instrucciones de los proveedores a excepción de una modificación realizada en el último punto que consistió en: La cantidad de DNA molde para la realización de la segunda amplificación se diluyó 10 veces más de lo descrito en el protocolo. La temperatura de annealing se disminuyó en 6 °C, y los ciclos se aumentaron al doble de lo señalado en el protocolo.
- b) Differential Display: Esta técnica inicialmente no fue propuesta en el proyecto, por la gran cantidad de falsos positivos que ella daba. Sin embargo, si ella es realizada tomando todos los controles necesarios puede ser una técnica que de una amplia utilidad. Por tal motivo, y utilizando los mismos mRNAs obtenidos de las plantas sometidas a los diferentes estrés, se ha utilizado esta técnica según la modificación de Rompf y Kahl (1997). Así, este protocolo fue adecuado para detectar genes que exhibían variaciones notables en su nivel de expresión. Del mismo modo, el análisis de los perfiles transcripcionales fue realizado en geles de agarosa lo que facilitó enormemente la recuperación de los cDNA diferenciales. Las secuencia de los oligonucleótidos primers arbitrarios utilizados son los siguientes:



Arb2H: 5'- AAGCTTCGACTGT-3' 13
Arb3H: 5'- AAGCTTGATTGCC-3' 13
Arb4E: 5'- GAATTCAGAGGCA-3' 13
Arb5E: 5'- GAATTCGCACCAT-3' 13
Arb6E: 5'- GAATTCTCATATG-3' 13

9.- *Clonamiento y secuenciación de los cDNA*

Los cDNAs obtenidos de mRNAs que mostraron una expresión diferencial tanto en las hibridaciones subtractivas como los obtenidos por differential display, fueron clonados directamente en el vector pGEMT (Promega) y amplificados en la cepa de *E.coli* DH5 α . Dos cDNAs de expresión diferencial obtenida de cada una de las condiciones de estrés, fueron usados como sondas radiactivas para verificar por dot blot de alta astringencia, cual de ellos se encuentra repetido en las diferentes subtracciones. Esto se realizará con el propósito de seleccionar solo aquellos cDNAs diferentes, los cuales una vez identificados fueron sometidos a secuenciación nucleotídica en el secuenciador ALF-Express II (Amersham), utilizando para ello el protocolo sugerido por los proveedores del equipo.

10.- *Comparación por similitud de secuencia en bancos de datos internacionales*

La secuencia nucleotídica de los cDNA de interés, fueron comparados mediante los algoritmos Blast o FASTA, con los ingresados a los banco de datos internacionales tales como, GeneBank o EMBL. Aquellos que presentaron mayor interés y similitudes fueron usados en los próximos análisis.

11.- *Análisis de la expresión diferencial de los genes seleccionados mediante Northern Blot.*

Para la realización de esta metodología fue necesario obtener RNAs totales procedentes de: raíces, tallos y hojas tanto de las plantas tratadas por los distintos tipos de estrés como para las plantas controles. El RNA obtenido fue separado en electroforesis desnaturizante agarosa-formaldehído y posteriormente transferido a membrana de Nylon. Las hibridaciones fueron realizadas a alta astringencia utilizando como sonda la región codificante y la región 3'UTR marcada \square adiactivamente con dATP alfa P³².

12.- *Aislamiento y purificación de DNA genómico de Lycopersicon chilense.*

El DNA genómico fue aislado a partir de hojas de plantas de ambas variedades utilizando el método de Watson y Thomson 1986 (Methods in Enzimology 118, 57-75). Este método permite obtener DNA de alto peso molecular que puede ser utilizado tanto para la elaboración de genotecas como para la amplificación de fragmentos específicos mediante la técnica de PCR.

13.- *Obtención de marcadores moleculares endógenos en Lycopersicon chilense.*

La obtención de genes marcadores tanto de expresión constitutiva como de expresión diferencial son fundamentales para utilizarlos como controles internos de las diferentes condiciones de estrés y para regularizar las cantidades de RNAs que están siendo utilizados



para diferentes ensayos. Por esta razón, es que fueron diseñados una serie de oligonucleótidos primers de diferentes genes que debieran estar presentes en el genoma de *L. chilense* y que pueden ser utilizados para los fines antes señalados. Así, se diseñaron para su síntesis los oligonucleótidos primers para: el gen de la subunidad menor de la RUBISCO; el gen *pcht28* y *H1* que codifican para una endoquitinasa y una histona H1 específica que se expresan en condiciones de estrés hídrico en *L. chilense*; los genes que codifican para la Actina 2 y *Rd29A* (se expresa en diferentes condiciones de estrés) de *Arabidopsis thaliana*; y del gen *Tas14* que se expresa en condiciones de estrés hídrico en *L. esculentum*. Además los primers para los genes involucrados en fotosíntesis: *clFBP* Fructosa-bisfosfatasa cloroplástica, *TRXm* Tioredoxina M, *PsbR* Proteína del PSII, *PsaF* Proteína del PSI y *PsbA* Proteína D1 del PSII.

14.- Aislamiento de los genes correspondientes a los cDNA obtenidos

Para el aislamiento de las zonas regulatorias de los genes se han utilizado tres técnicas:

a.- Screening de genoteca de *L. chilense*

Los cDNAs fueron usados como sondas radiactivas para buscar en una librería genómica de *L. chilense* construidas en el fago λ BlueStar (Novagene). Esta librería ya existía en nuestro laboratorio. Para aislar dichos genes, se utilizó la técnica de hibridación *in situ* sobre placas, lo cual permite identificar a aquellos fagos que presentan los genes correspondientes. Los genes presentes en las colinas recombinantes identificadas, fueron posteriormente, subclonados en el vector plasmídico pUC19 sometido a secuenciación nucleotídica. Conocida su secuencia podrían haber sido caracterizados para identificar las zonas reguladoras de su expresión.

b.- Aislamiento de genes específicos mediante PCR-inversa

Para la realización de la técnica de PCR-inversa, inicialmente fue necesario aislar y purificar DNA genómico de alto peso molecular. Posteriormente, el DNA fue digerido con diferentes enzimas de restricción y sus productos son separados en electroforesis en gel de agarosa, para luego realizar una Hibridación Southern, utilizando las sondas específicas para cada gen, determinándose la enzima con la cual fue llevada a cabo la digestión preparativa. Realizada esta digestión, sus productos fueron sometidos a ligación con DNA ligasa en una solución lo suficientemente diluida como para que los fragmentos deseados puedan autoligarse, generando un DNA circular. Una vez terminada esta etapa, se realiza una amplificación por PCR utilizando dos oligonucleótidos *primers* específicos de la región codificante del gen que nacen en el mismo punto pero con orientación opuesta en cada cadena del DNA. El o los fragmentos amplificados son clonados y sometidos a secuenciación nucleotídica.

c.- Generación de genotecas parciales para el aislamiento de promotores de genes seleccionados.

Esta técnica pretende acotar la cantidad de fragmentos genómicos a analizar, reduciendo la cantidad de sondeos y el tamaño de los fragmentos a secuenciar. Es un poco más laborioso que el screening de la genoteca pero tiene mayor confiabilidad. El procedimiento básicamente consiste en:

Se digieren 10 μ g de DNA genómico con cada una de las siguientes enzimas de restricción: Bam HI, Eco RI, Hind III, Xba I y NdeI. Con los productos de la digestión se realiza un



Southern blot utilizando como sonda radioactiva el cDNA del gen correspondiente. En función de las bandas de hibridación se selecciona aquella enzima que de mayor confiabilidad y se realiza una digestión preparativa. Desde esta electroforesis se aísla y purifica la banda hibridada y se clona en un vector plasmídico como pUC19. Posteriormente, se transforman cepas DH5 α de *E. coli* y se cultivan en medio líquido. Se purifican todos los plásmidos y mediante PCR utilizando primers internos de la secuencia codificante del gen y primers del vector se procede a amplificar el fragmento que contiene el promotor y la secuencia codificante del gen.

15.- Aislamiento de los cDNAs full length de los genes seleccionados y ratificación de sus secuencias nucleotídicas.

Las secuencias nucleotídicas 3' UTR y las secuencias codificantes de los genes seleccionados, sirvieron de base para el diseño y construcción de oligonucleótidos *primers* que permitieron obtener las secuencias específicas de los extremos 5' de los cDNAs de los genes correspondientes. Para la ejecución de este procedimiento se utilizó el Kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Versión 2.0 (Invitrogen). Básicamente, el sistema consiste en la realización de una reacción de RT-PCR. La transcripción inversa (RT) se realiza para obtener la primera cadena de cDNA a partir de mRNA obtenido de plantas sometidas al estrés específico. La RT se realiza con el *primer* específico diseñado para la zona codificante del gen, generándose así la primera cadena del cDNA. Una vez que ha sido eliminado el mRNA duplex, se procede a generar una cola de citosinas en el extremo 3' del cDNA utilizando una Transferasa Terminal de dideoxinucleótidos (TdT), para lo cual se suplementa la reacción con dCTP. Una vez formada esta cola de citosinas se procede a realizar la reacción de PCR en la cual se utiliza un segundo *primer* de la zona codificante del gen que se encuentra en posición ríoarriba del utilizado en la reacción de RT, y como segundo *primer* se usa uno que es complementario a la cola de Citosina y que además lleva la secuencia para diferentes enzimas de restricción. Una vez amplificados los fragmentos que llevan la secuencia 5' UTR del cDNA, este es clonado en pGEM-T y clonados en la cepa de *E. coli* DH5 alfa. Desde las bacterias recombinantes es obtenido el plásmido y su inserto es sometido a secuenciación nucleotídica. Para ello se utilizó el sistema Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham), el que fue utilizado de acuerdo a protocolo indicado por el proveedor. La secuencia fue establecida mediante electroforesis en geles (Reprogel Long Read, Amersham) en el secuenciador semi-automático ALF ExpressII (Amersham). Las secuencias con ambigüedad menor a 2%, fueron analizadas mediante el uso de los programas Vector Screen, y Bioedit, para remover secuencias provenientes del vector. Conocida la secuencia 5' UTR y el sitio de inicio de la traducción se diseñan los oligonucleótidos *primer* adecuados que permiten amplificar específicamente desde el mRNA el cDNA que contiene la secuencia del ORF desde la región 3' UTR y el codón de stop y la región 5'UTR y el codón de inicio de traducción. Los oligonucleótidos *primers* llevan además los sitios de restricción (*Xba* I o *Sst* I) los cuales servirán posteriormente para ligarlos al vector pBI121. Obtenido los cDNAs con los ORF completos, estos ligados a pGEM-T y clonados en DH5 alfa, para proceder nuevamente a la ratificación de su secuencia nucleotídica.

16.- Clonaje de los ORF de los cDNAs full length de genes seleccionados en el vector pBI121.



El vector pBI121 es derivado del plásmido Ti de *Agrobacterium*, con lo cual contiene los elementos necesarios para la integración de este en el genoma de la planta. Además el plásmido contiene, el gen de resistencia al antibiótico Kanamicina, lo cual permite hacer la selección de las plantas transformadas, contiene además 800 pb del promotor 35S del virus del mosaico de la Coliflor, el cual controla la expresión del gen reportero β -Glucuronidasa (GUS) y un fragmento de 260 pb contenido las señales de poliadenilación del terminador del gen de la Nopalina Sintetasa del plasmido Ti de *Agrobacterium*.

Para generar los plásmidos quiméricos que contengan los cDNAs con el ORF completo, es preciso reemplazar el gen GUS por el cDNA correspondiente. Para tal efecto, utilizando las enzimas de restricción *Xba* I y *Sst* I, se digiere el plásmido hasta que se libere el fragmento correspondiente. Posteriormente, los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% de bajo punto de fusión y el plásmido carente del gen GUS es purificado por el sistema EZNA Gel extraction Kit (Omega Bio-tek). Posteriormente, este vector es ligado con el cDNA con el ORF completo, el cual previamente ha sido digerido con las enzimas *Xba* I y *Sst* I, sitios de restricción que fueron incorporadas en los oligonucleótidos *primers*, utilizados en su amplificación.

17.- Obtención de plantas transgénicas de tomate, tabaco y *arabidopsis*

a.- Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de *Agrobacterium tumefaciens* fue realizada por electroporación utilizando el sistema Electromax *Agrobacterium tumefaciens* LBA44044 cell (Gibco BRL). Donde 10^4 células en 20 μ l son transformadas con 100 ng de plásmido quimérico en cubetas Cell-porator setting (Gibco BRL) a un voltaje de 400 Volts y una capacitancia de 300 μ F. Luego las células son tomadas desde las cubetas y se les adiciona a un tubo con 1 ml de medio YM donde son agitadas a 225 rpm (30°C) por 3 hrs. Posteriormente son sembradas en placas YM con 50 μ g/ml de Kanamicina y 100 μ g/ml de Estreptomicina e incubadas 48 - 56 hrs a 30 °C. Las colonias resistentes corresponden a las cepas transformadas, las que son crecidas en medio líquido de YM hasta alcanzar una OD de 0.6 a 600 nM.

b.- Transformación de *Lycopersicon esculentum* variedad money maker

Para la transformación de tomate se ensayaron tres métodos:

1.- Transformación de cotiledones modificado por Filatti y colaboradores (1987)

2.- Transformación de meristemas apicales, método de Pozueta y colaboradores (2001)

c.- Transformación de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi: Se utilizó el método del disco de hoja descrito por Horsch y colaboradores (1984)

d.- Transformaciones de plantas de *Arabidopsis thaliana* var. Columbia utilizando el método descrito por Clough y Bent. (1998)

18.- Evaluación de la especificidad de la expresión de los genes seleccionados en plantas transgénicas.

Las plantas transgénicas fueron sometidos a las diferentes condiciones de estrés abióticos descritos y comparada su respuesta frente a las plantas silvestres y transformadas con pBI121 de tomate.

Los principales problemas que hicieron necesario adecuar la metodología fueron:

- a.- La técnica de PCR-Select para hibridaciones substractivas, no otorgó el número de clones esperables, con lo cual se optó por utilizar la técnica de Differential Display, obligando a realizar un mayor número de controles para ratificar la efectividad del gen que se estaba aislando.
- b.- Las instituciones o empresas que daban el servicio de secuenciación y que existían en el año 2002 en el país, no otorgaban las garantías técnicas de confiabilidad y de seguridad, con lo cual fue necesario adquirir un equipo de secuenciación semiautomático ALF-ExpressII (Amersham), y realizar en el propio laboratorio las respectivas secuencias.
- c.- La genoteca que se tenía de *L. chilense*, mostró por una parte que su título había disminuido considerablemente y que su representatividad también había disminuido, con lo cual, la posibilidad de encontrar los genes de interés se reducía. Por esta razón y por lo elevado de los costos del screening de la genoteca, es que se optó por utilizar las técnicas de PCR inverso y Genotecas parciales, lo cual aumenta considerablemente el tiempo de trabajo, sin aumentar ostensiblemente los costos.
- d.- La baja eficiencia de la transformación de la variedad money maker de *Lycopersicon esculentum*, obligó a realizar modificaciones a los métodos descritos y a utilizar diferentes métodos, alargando el período destinado a la obtención de las plantas transgénicas.
- e.- El deficiente sistema de cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana*, con lo cual no existía certeza de que la transformación llevará a feliz término, condujo a realizar transformaciones de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi), con el objeto de dar cumplimiento al objetivo de tener dos tipos de plantas heterólogas transformadas con los mismo genes.

3. Actividades del Proyecto:

Año	Actividades Programadas	Actividades Reales
2002	Adquisición de equipos	Adquisición de equipos
	Obtención de una colección de Plantas de <i>L. chilense</i>	Obtención de una colección de Plantas de <i>L. chilense</i>
	Obtención de cDNAs por hibridación substractiva correspondientes a genes expresados bajo estrés hídrico	Obtención de cDNAs por hibridación substractiva correspondientes a genes expresados bajo estrés hídrico
	Obtención de cDNAs por hibridación substractiva correspondientes a genes expresados bajo estrés salino	Obtención de cDNAs por hibridación substractiva correspondientes a genes expresados bajo estrés salino
	Obtención de cDNAs por hibridación substractiva correspondientes a genes expresados	Identificación de cDNAs de expresión diferencial mediante differential display de plantas sometidas a estrés



	bajo estrés por temperaturas bajas	hídrico.
	Selección de los genes a ser aislados según su evaluación por condiciones de estrés y comparación con otras secuencias descritas en bases de datos.	Identificación de cDNAs de expresión diferencial mediante differential display de plantas sometidas a estrés salino
		Análisis de la composición química de los suelos de hábitat de <i>L. chilense</i> var. Candelabro
2003	Aislamiento de los genes expresados bajo las condiciones de estrés analizadas.	Obtención de cDNAs por hibridación substractiva correspondientes a genes expresados bajo estrés por temperaturas bajas
	Secuenciación nucleotídica de los genes aislados	Identificación de cDNAs de expresión diferencial mediante differential display de plantas sometidas a estrés por temperaturas
	Análisis de las secuencias obtenidas	Análisis por hibridaciones Northern de la expresión de los genes aislados desde los diferentes tipos de estrés.
		Análisis de la genoteca para el screening de los genes de interés.
		Análisis de la fotosíntesis y de los perfiles transcripcionales de los genes asociados a este proceso, en plantas controles y sometidas a estrés.
2004	Continuación de Aislamiento de los genes expresados bajo las condiciones de estrés analizadas.	Continuación con el análisis por hibridaciones Northern de la expresión de los genes aislados desde los diferentes tipos de estrés.
	Continuación con la secuenciación nucleotídica de los genes aislados y el análisis de las secuencias obtenidas	Screening de la genoteca con genes de interés.
	Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Lycopersicon esculentum</i>	Aislamiento de genes específicos mediante PCR-inversa
	Evaluación de la expresión de los genes seleccionados en las plantas transgénicas	Obtención de los cDNAs de largo total para su clonaje en el vector binario
		Clonaje de los cDNA de largo total en el vector pBI221.
		Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y transformación de



		plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> mediante el método de Fillati y cols.
2005	Continuación con obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Lycopersicon esculentum</i>	Cultivo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> var. Columbia, para ser transformadas con los genes de interés
	Continuación con Evaluación de la expresión de los genes seleccionados en las plantas transgénicas	Obtención de plantas transgénicas de de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi) con el método de Horscn y col.
		Obtención de Plantas transgénicas de <i>Lycopresicon esculentum</i> var money maker con una modificación del método de Fillati y cols, y mediante el protocolo de Pozueta y cols..
		Amplificación y titulación de la genoteca para realizar screening de los genes de interés.
		Continuación con el Aislamiento de genes específicos mediante PCR-inversa.
		Aislamiento de zonas reguladoras de los genes de interés mediante genotecas parciales.
2006		Continuación con Aislamiento de zonas reguladoras de los genes de interés mediante genotecas parciales
		Evaluación de la expresión de los genes seleccionados en las plantas transgénicas

Razones que explican las discrepancias entre las actividades programadas y las efectivamente realizadas, fueron explicadas en el punto 2 de Metodologías de este informe.

4. Resultados del Proyecto:

Los resultados del proyecto se pueden describir de la siguiente forma:

1.- Las plantas de *Lycopersicon chilense* constituyen una fuente de genes involucrados en la tolerancia a estrés, salino y a temperaturas bajas. Esto no había sido determinado anteriormente, solo se suponía, dadas las condiciones atmosféricas del hábitat natural de la planta. Nuestros resultados muestran que los suelos son altamente salinos, casi 10 veces por sobre los niveles considerados tóxicos para tomate Mass (1990) (Figura 2). Por otra parte, nuestros resultados muestran que esta planta no excluye la sal, sino que la absorbe y que la acumula en las hojas, independientemente de que estas sean hojas jóvenes o viejas (Figura 3).

Figura 2 : Concentración de principales elementos en suelos de recolección de semillas de *Lycopersicon chilense*.

Elemento	Concentración (ppm)
Cobre	0,8
Zinc	1,68
Hierro	2,64
Manganeso	8,26
Potasio	426
Calcio	498
Magnesio	67
Sodio	258
Cloruro	566

Niveles de Na⁺ superiores a 46 ppm son considerados como tóxicos en tomate

Mass (1990) Crop salt tolerance. In: Agricultural Assessment and Management Manual. K.K. Tanji (ed.). ASCE, New York. pp. 262-304

Figura 3: Niveles de Na⁺ y K⁺ en hojas de *Lycopersicon chilense* sometidas a estrés salino

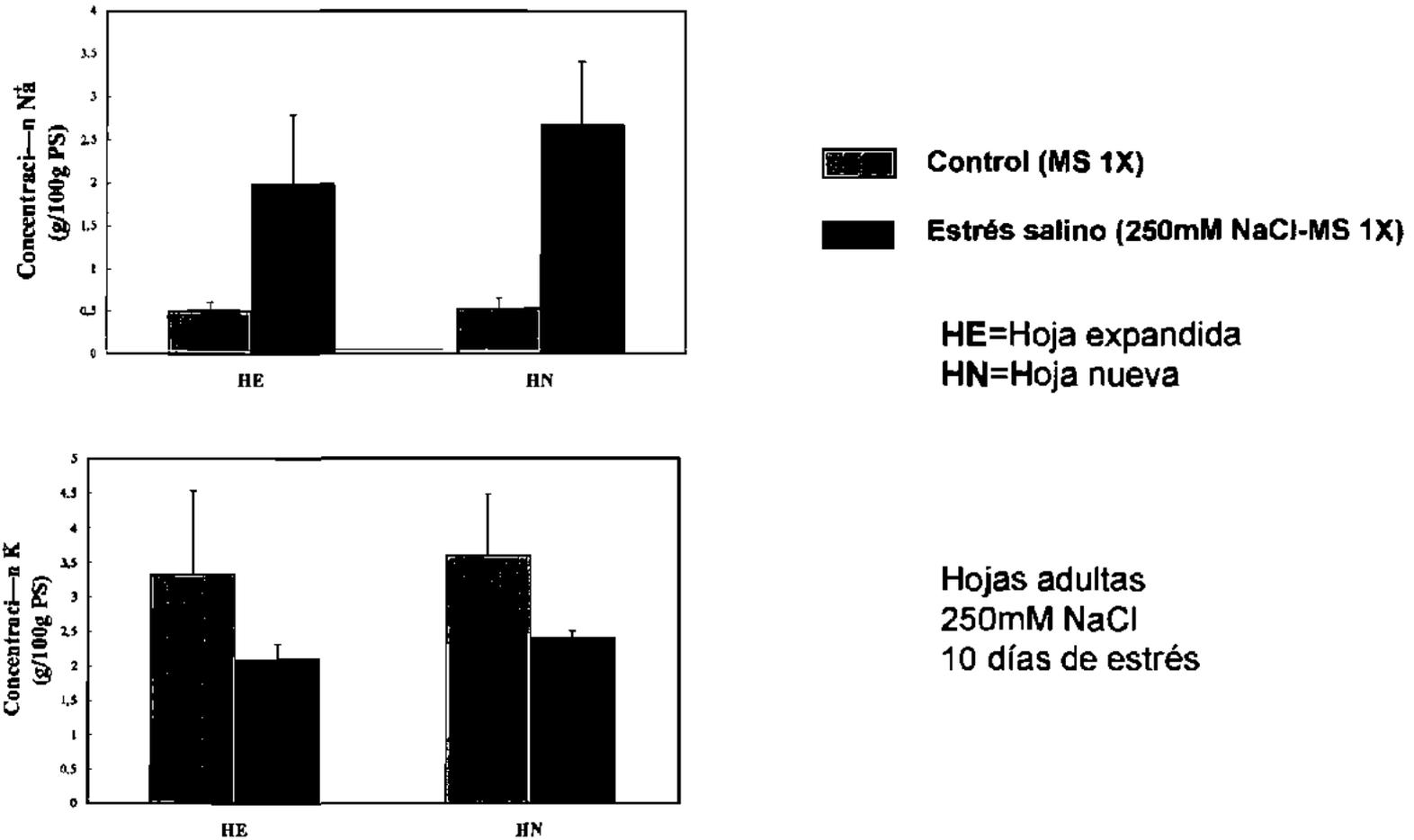
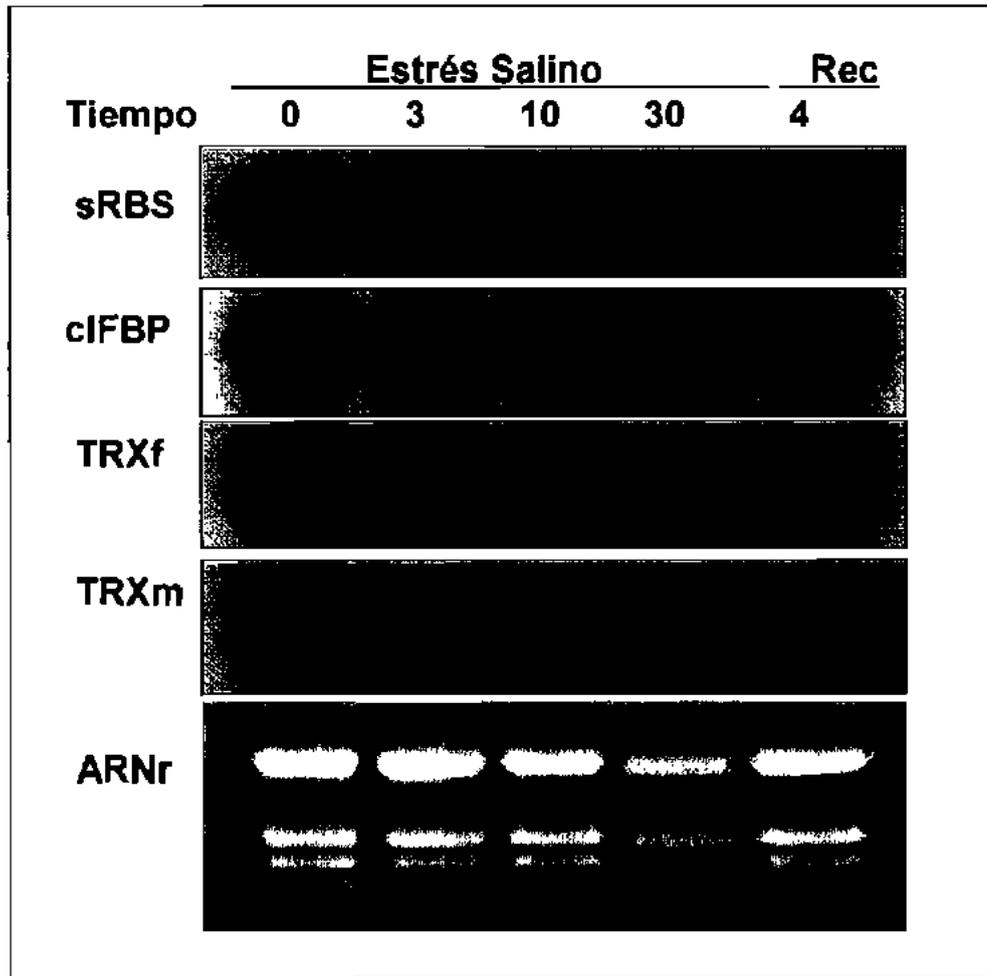


Figura 4: Análisis de la expresión de genes maracadores de la Fotosíntesis durante estrés salino en *Lycopersicon chilense*



sRBS Rubisco
cIFBP Fructosa-bisfosfatasa clor.
TRXf Tioredoxina f
TRXm Tioredoxina M



Además, hemos demostrado que ni la fotosíntesis ni los perfiles transcripcionales de los genes asociados a este proceso son alterados bajo estrés abiótico (figura 4).

2.- Generación de un banco de genes de tolerancia a estrés abiótico, aislados desde *L. chilense* y que pueden ser utilizados en estrategias de mejoramiento genético de plantas cultivadas.

El banco de genes es el siguiente:

<i>Clon</i>	Tipo de estrés	Homología
LCHS1	Deshidratación	Transportador ABC de <i>A. thaliana</i>
LCHS2	Deshidratación	Ferroquelatasa de <i>S. tuberosum</i>
LCHS3	Deshidratación	Inhibidor de la disociación de GDP de <i>N. tabacum</i>
LCHS4	Deshidratación	proteína con homología a gen YOL002c de <i>S. cerevisiae</i>
LCHS5	Deshidratación	Proteína similar a oxidorreductasa de <i>A. thaliana</i>
LCHS6	Deshidratación	Cisteína proteasa de <i>L. esculentum</i>
LCHS7	Deshidratación	Colina kinasa de <i>A. thaliana</i>
LCHS8	Deshidratación	Fitocromo b de <i>A. thaliana</i>
LCHS9	Deshidratación	heat-shock protein 70 de <i>L. esculentum</i>
LCHS10	Deshidratación	Cadena epsilon de la ATPasa de <i>N. tabacum</i> .
LCSS1	Salino	Tioredoxina F de <i>Brassica napus</i>
LCSS2	Salino	Malato deshidrogenasa citosólica de <i>N. tabacum</i>
LCSS3	Salino	Inhibidor de la disociación de GDP de <i>N. tabacum</i>
LCSS4	Salino	Subunidad Alfa de ATPasa de <i>N. tabacum</i>
LCSS5	Salino	Proteína similar a oxidorreductasa de <i>A. thaliana</i>
LCSS6	Salino	Proteína 10 relacionada a patogénesis
LCSS7	Salino	Proteína de transferencia de lípidos de <i>L. pennelli</i>
LCSS8	Salino	Proteína tipo 1 de membrana <i>N. tabacum</i>
LCSS9	Salino	Proteína de función desconocida de <i>A. thaliana</i>



LCSS10	Salino	Oxidoreductasa hierro/ascorbato
LCSS11	Salino	SAM Descarboxilasa
LCCS1	Inducida por Frío	Dominio de lysophospholipase-like protein de <i>Oryza sativa</i>
LCCS2	Inducida por Frío	Dominio de proteína de reparación de DNA <i>B. thetaiotamicron</i>
LCCS3	Reprimida por Frío	Proteína función desconocida (At4g19003) <i>A.thaliana</i>
LCCS4	Inducida por Frío	Glicil-tRNA sintetase (cadena beta) <i>A.thaliana</i>
LCCS5	Reprimida por frío	4-alpha-glucanotransferase (malQ) <i>H. influenzae</i>
LCCS6	Reprimida por frío	Proteína función desconocida <i>A.thaliana</i>
LCCS7	Reprimida por Frío	Proteína Ca/b de PSI de <i>L. esculentum</i>
LCCS8	Inducida por Frío	heat-shock protein 70 de <i>L. esculentum</i>
LCCS9	Inducida por Frío	proteína NIN de la especie <i>Lotus japonicus</i>

De algunos de estos genes se poseen los cDNAs de largo total, y algunos de ellos se presentan a continuación:

```
atgagtcacacaaccacaattgccccacaaggctattcaaagggttggttccttgatttt
M S P Q P Q L P Q Q G Y S K V W F L D F
gatagccttgtacctaattggtgtcacatgatgtaagagcattgagattggtgaggg
D S L V P K L L S H D V K S I E I V E G
gatggtggtgctggaagcatcgagcaaatgaactttggtgaagggtggaccaattaagtgc
D G G A G S I E Q M N F V E G G P I K C
ttgaagcgcaaaattcatgtgattgatgacaagaatttggttaacaaaatattcacttatt
L K R K I H V I D D K N L V T K Y S L I
gaaggtgatgttcttggtgacgaattggaatcaattggctatgatgtcaaatttgaagct
E G D V L G D E L E S I G Y D V K F E A
gctggagatggaggttggtgttgcaagacaacaactgagtatcacacaaagggtgatcat
A G D G G C V C K T T T E Y H T K G D H
gttgtgagtgaagaagaacacaatgtaggcaaaagggaagccattgacctattcaaggcc
V V S E E E H N V G K G K A I D L F K A
atcgaagcgtacctcctcgtataatccttctgtctacgcttaa
I E A Y L L A N P S V Y A -
```

Figura 5. ORF y secuencia nucleotídica del gen LCSS6. Presenta un ORF de 153 aminoácidos y una secuencia nucleotídica de 462 pares de bases.



```
atggaaatggttaacaagattgcatgctttgtgcttttatgcatggtagtggttgcaccc
M E M V N K I A C F V L L C M V V V A P
catgcagaggcactaacttgtgggtcaagttacatctaccttggctccttgtctcccttat
H A E A L T C G Q V T S T L A P C L P Y
ctaatgaatcgcggtcctctcggaggctgttgtgggtggtgtaagggtccttttgggtcaa
L M N R G P L G G C C G G V K G L L G Q
gccagactacagtagaccgacagaccgcatgcacttgcctaaaatcagctgcttcttct
A Q T T V D R Q T A C T C L K S A A S S
tttacaggccttgatttgggcaaagctgctagtctcccttagcacttgtagtgtcaacatc
F T G L D L G K A A S L P S T C S V N I
ccttacaagatcagccctctactgactgctctaaagttcagtaa
P Y K I S P S T D C S K V Q -
```

Figura 6. ORF y secuencia nucleotídica del gen LCSS7. Posee un ORF de 94 aminoácidos y una secuencia nucleotídica de 285 pares de bases

ATG	GCT	TCT	AAT	ACA	TTG	ATG	AGT	TGT	GGA	ATT	CCA	GCT	GTT	TGC	CCC	TCT	TTC	CTC
M	A	S	N	T	L	M	S	C	G	I	P	A	V	C	P	S	F	L
TCT	TCT	ACC	AAG	TCC	AAA	TTC	GCC	GCC	GCG	ATG	CCG	GTC	TAC	GTT	GGA	GCT	ACC	AAC
S	S	T	K	S	K	F	A	A	A	M	P	V	Y	V	G	A	T	N
TTC	ATG	TCT	AGG	TTC	TCC	ATG	TCA	GCT	GAT	TGG	ATG	CCC	GGG	CAG	CCC	CGT	CCA	TCT
F	M	S	R	F	S	M	S	A	D	W	M	P	G	Q	P	R	P	S
TAC	CTC	GAC	GGC	TCA	GCC	CCC	GGA	GAT	TTT	GGA	TTT	GAT	TCA	CTT	GGT	TTA	GGA	GAA
Y	L	D	G	S	A	P	G	D	F	G	F	D	S	L	G	L	G	E
GTA	CCT	GCA	AAT	TTG	GAA	AGA	TAC	AAA	GAA	TCT	GAA	CTT	ATT	CAT	TGC	AGA	TGG	GCT
V	P	A	N	L	E	R	Y	K	E	S	E	L	I	H	C	R	W	A
ATG	CTT	GCT	GTT	CCC	GGA	ATC	ATA	GTA	CCA	GAA	GCA	TTG	GGC	TTA	GGT	AAT	TGG	GTC
M	L	A	V	P	G	I	I	V	P	E	A	L	G	L	G	N	W	V
AAG	GCC	CAA	GAA	TGG	GCA	GCC	ATT	CCT	GGT	GGA	CAA	GCT	ACA	TAT	TTG	GCC	CAG	CCT
K	A	Q	E	W	A	A	I	P	G	G	Q	A	T	Y	L	G	Q	P
GTT	CCA	TGG	GGA	ACA	CTT	CCT	ACT	ATT	TTG	GCT	ATT	GAA	TTT	TTA	GCC	ATA	GCC	TTT
V	P	W	G	T	L	P	T	I	L	A	I	E	F	L	A	I	A	F
GTA	GAA	CAC	CAA	AGG	AGT	ATG	GAA	AAA	GAT	TCA	GAA	AAG	AAG	AAG	TAT	CCT	GGT	GGG
V	E	H	Q	R	S	M	E	K	D	S	E	K	K	K	Y	P	G	G
GCT	TTT	GAC	CCA	TTG	GGT	TAC	TCT	AAA	GAC	CCT	GCT	AAA	TTT	GAA	GAA	CTC	AAA	GTT
A	F	D	P	L	G	Y	S	K	D	P	A	K	F	E	E	L	K	V
AAG	GAA	ATC	AAG	AAT	GGT	CGT	CTT	GCA	TTG	TTG	GCA	ATT	GTG	GGA	TTT	TGT	GTA	CAA
K	E	I	K	N	G	R	L	A	L	L	A	I	V	G	F	C	V	Q
CAA	TCA	GCA	TAT	CTA	GGA	ACA	GGA	CCA	TTG	GAG	AAC	TTG	GCA	ACT	CAC	TTG	GCT	GAC
Q	S	A	Y	L	G	T	G	P	L	E	N	L	A	T	H	L	A	D
CCA	TGG	CAC	AAC	AAC	ATT	GGG	GAT	GTT	ATT	ATC	CCT	AAA	GGC	ATT	TTC	CCT	AAT	TAA
P	W	H	N	N	I	G	D	V	I	I	P	K	G	I	F	P	N	*
ATT	GTA	CTA	TTT	ATC	ATA	TAG	TAT	ATT	AGC	CAA	AAA	CAC	CTT	GTA	AAA	CTC	TCC	CAT
I	V	L	F	I	I	*	Y	I	S	Q	K	H	L	V	K	L	S	H
GTA	CTA	ATA	GAT	TTC	TAA	TGG	AAT	GGA	CTT	TTT	GTG							
V	L	I	D	F	*	W	N	G	L	F	V							

Figura 7. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del ORF correspondiente al gen que codifica para la proteína Ca/b de *L. chilense*. El ORF contiene 259 aminoácidos y una secuencia nucleotídica de 780 pares de bases



```
ATGAGTGAATTGGGTTTGATTTTCGGAACGAGAATTGCCTTGTTGCCGTTGCAAGGCAAAGAGGTATCG
M S V I G F D F G N E N C L V A V A R Q R G I
ACGTCGTGCTTAATGATGAGTCCAATCGTGAGACGCCTGCTATTGTCTGCTTCGGTGACAACGAGCGCTT
D V V L N D E S N R E T P A I V C F G D N E R F
CATCGGCACTGCTGGAGCTGCTTCTACCATGATGAACCCCAAAAACCTCCATCTCTCAAATTAAGCGCTTA
I G T A G A A S T M M N P K N S I S Q I K R L
ATTGGTCGCCAGTTTTCCGACCTGAGCTTCAAAGGGATATCAAATCCTTTCCCTTTTCTGTCCACGAA
I G R Q F S D P E L Q R D I K S F P F S V T E
GCCCTGATGGCTATCCTTTGATACATGCTAATTATTTGGGAGAGAAGCGAGCCTTTACCCCGACTCAAGT
G P D G Y P L I H A N Y L G E K R A F T P T Q V
CATGGCATGATGTTGTCTAACCTGAAAGGTATTGCCGAGAAGAATTTGAATACAGCTGTTGTGCGACTGC
M G M M L S N L K G I A E K N L N T A V V D C
TGTATTGGTATTCCCTGTTTACTTTACCGACCTCCAGCGTAGGGCTGTTCTCGATGCTGCCACTATTGCTG
C I G I P V Y F T D L Q R R A V L D A A T I A
GCTTGCATCCCTTGGCGCTTGATCCACGAGACTACAGCTACGGCTTTGGCATATGGTATTTATAAGACAGA
G L H P L R L I H E T T A T A L A Y G I Y K T D
TTTGCCAGAGAGTGACCAGCTCAATGTTGCATTGATTGACATTGGACACGCAAGCATGCAAGTCTGTATT
L P E S D Q L N V A F I D I G H A S M Q V C I
GCAGGCTTCAAAAAGGACAGCTCAAAATCTTGTCTCACGCTTTTCGATCGCTCCCTTGGGGGAAGGGACT
A G F K K G Q L K I L S H A F D R S L G G R D
TTGATGAAGTTCTTTTCAATCATTTTGTGCTAAGTTCAAGGACGAGTACAAGATTGACGTCTCCAGAA
F D E V L F N H F A A K F K D E Y K I D V S Q N
TGCTAAGGCTTCTCTCAGGCTCCGTGCTACATGCGAGAACTGAAAAGGTTCTAAGCGCTAATCCTCTG
A K A S L R L R A T C E K L K K V L S A N P L
GCACCGTTGAATATCGAGTGTTTGTGATGAGAAAGATGTTAGGGGTGTCATCAAGAGGGGAAGAGTTTG
A P L N I E C L M D E K D V R G V I K R E E F
AAGAGATCAGCATCCCGATTTTGGAGCGTGTAAGAGGCCTCTAGAGAAAGCTCTCTCTGATGCAGGCT
E E I S I P I L E R V K R P L E K A L S D A G L
CACTGTTGAAGATGTACATATGGTTGAGTTATTGGCTCTGGCTCTCGTGTCCCTGCTATGATCAAGATT
T V E D V H M V E V I G S G S R V P A M I K I
CTAACTGAGTTTTTTGGTAAGGAGCCCAGGCGTACAATGAATGCAAGTGAGTGTGTGCAAGGGGATGTG
L T E F F G K E P R R T M N A S E C V S R G C
CCTTGCAAGTGTGCCATTCTCAGTCCGACCTTTAAAGTTTCGCGAATTTTCAGTTTCATGAGAGCTTCCCTTT
A L Q C A I L S P T F K V R E F Q V H E S F P F
CTCAATTTCTCTCGCTTGGAAAGGAGCAGCTTCTGAAGCTCAAAATGGAGGAGCTGAGAATCAGCAGAGC
S I S L A W K G A A S E A Q N G G A E N Q Q S
ACCATTGTTTTTCCCAAAGGAAATCCCATTCCTAGTGTCAAGGCTCTAACGTTTTTATCGTTTCTGGAACAT
T I V F P K G N P I P S V K A L T F Y R S G T
```

Figura 8. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del ORF correspondiente al gen que codifica para la proteína Hsp70 de *L. chilense*. El ORF es de 437 aminoácidos y corresponde a una secuencia nucleotídica de 1314 pares de bases.



```
atggaagtagcagaaggagctcgccacagacttacagccaatattccctattcctccctc
M E V A E G A R H R L T A N I P Y S S L
accgttgatcattctctctctattactcatctaaagcctaaaatcgtagaacggtgcaag
T V D H S L S I T H L K P K I V E P C K
gacttgttcaaccaatgggtcaaatctagatggttctcacttctctgtagagactgtgtct
D L F N Q W S N L D G S H F S V E T V S
gggtggcatcacaatctattgctaaaagtatctgtaagagaagatgacggaaagcatgaa
G G I T N L L L K V S V R E D D G K H E
aatatgacagttaggttatatgggtccaaatactgaatatgtcattaaccgtgaacgagaa
N M T V R L Y G P N T E Y V I N R E R E
atgcaggcgattcaacacctctcagaggctgggtttgggtgccaagttgcttgacagtattt
M Q A I Q H L S E A G F G A K L L A V F
gggaatggcatgggttcagtcatttattgatgacagctactttaacgccccagacatgagc
G N G M V Q S F I D A R T L T P P D M S
aaccxaaagcttgctgctgaaattgcaaagcaactccgaaagttccatcaggtagaaatt
N P K L A A E I A K Q L R K F H Q V E I
ccgggctccaaagaacctcaagtgtggaatgatgtgctcaagttctacaaaaatgcatca
P G S K E P Q V W N D V L K F Y K N A S
actctccaatttgatgatgggtgagaagaagatgatgagacaactttgttcccagaa
T L Q F D D G E E K K R K Y E T T L F P E
gttcataatgaaatcatagagctcaaggaattgactgaccgtcttaacgccccagtggtg
V H N E I I E L K E L T D R L N A P V V
tttgctcacaatgacttactctctggaatctgatgcttaatgaggagaaagaaaagctg
F A H N D L L S G N L M L N E E K E K L
tatttcattgattttgagtatggatcctacaattacaggggatttgacatagggaaatcac
Y F I D F E Y G S Y N Y R G F D I G N H
ttcaatgaatatgctggctacgattgtgattacagcttatatccaaataaggatcagcag
F N E Y A G Y D C D Y S L Y P N K D Q Q
tttcatttcttcaggcactattttgattctgaccaaccgaataaggtatctgacaaggac
F H F F R H Y L D S D Q P N K V S D K D
cttgaagccttatatgtcgagaccagtagttacatgcttagcttcacacctatactgggct
L E A L Y V E T S S Y M L A S H L Y W A
ctctggccttgatccaggcgaaaatgtcacccatcgattttgattacatcagttacttc
L W A L I Q A K M S P I D F D Y I S Y F
ttcctgctataatgaatacaagaagcagaaggagaaagtcctctcttttagccaagtca
F L R Y N E Y K K Q K E K V L S L A K S
tatctctcgaaaccgagctgggtaaaaggctgatgtag
Y L S K P E L G K R L M -
```

Figura 9. Secuencia nucleotídica y aminoácídica del ORF correspondiente al gen que codifica para la proteína Colina kinasa de *Lycopersicon chilense*. Presenta un ORF de 372 aminoácidos y una secuencia nucleotídica de 1119 pares de bases.



```
atggacttgccagtttctgccattggttttgaaggttttgaaaagaggctcgaatttct
M D L P V S A I G F E G F E K R L E I S
ttcgtcgagcctggctgtgttgctgatcctaattgaaaaggacttcgatctctcacaag
F V E P G L F A D P N G K G L R S L T K
gcacagttggatgagattctcggacctgctgagtgaccattgttgataacctgtcaaat
A Q L D E I L G P A E C T I V D N L S N
gactatgttgattcctatgtgctgtccgagtcgagcctcttcgtttattcttacaagata
D Y V D S Y V L S E S S L F V Y S Y K I
atcatcaaaacatgtggcaccacaaagctgcttcttgaattccgcccattctgaggttg
I I K T C G T T K L L L A I P P I L R L
gctgagacctgtctctcaaagtacaagacgtgaggtatacccgtaggagcttcattttc
A E T L S L K V Q D V R Y T R G S F I F
cctgggtctcaatcgtttctcaccgccacttttctgaagaagttgctgtcctcgatgga
P G A Q S F P H R H F S E E V A V L D G
tattttgaaaagcttgctgcccgttagcaaggctgtgattatgggaaatcccgacaaaact
Y F G K L A A G S K A V I M G N P D K T
cagaaatggcatgtttactctgcctcagctgggactgttcagtgtaatgaccctgtttac
Q K W H V Y S A S A G T V Q C N D P V Y
actcttgagatgtgtatggctggtttgacagggagaaggcatctgtcttctacaaaact
T L E M C M A G L D R E K A S V F Y K T
gaagaaagttcggctgctcacatgactgttagatctggcatcaggaagatcctccccaag
E E S S A A H M T V R S G I R K I L P K
tttgagatgtgattttgagtttgaaacctgtggttattctatgaattctattgaagga
F E I C D F E F E P C G Y S M N S I E G
gctgctgtttcaaccattcacattacccccggaggacggcttttagctatgccagctttgaa
A A V S T I H I T P E D G F S Y A S F E
tctgttgatgatgatcctaaaaccactgagttgggtcccctggttgagaggggtgcttgca
S V G Y D P K T T E L G P L V E R V L A
tgttttgagccagctgagttctctattgctctgcatgctgatgttgctaccaagttactg
C F E P A E F S I A L H A D V A T K L L
gagcgtgtttgctctgttgatgttaagggtactctcttgctgagtgaggagtcagaagag
E R V C S V D V K G Y S L A E W S P E E
tttgcaaaaggcggttccattgtctaccagaagttcactagaacvccttactgtgaatct
F G K G G S I V Y Q K F T R X P Y C E S
cccaagtccggttctgaagggctgctggaaggaggaagagaaagaagaaaaggagtag
P K S V L K G C W K E E E K E E K E -
```

Figura 10: Secuencia nucleotídica y aminoacídica del ORF del gen que codifica para la proteína SAMDC de *Lycopersicon chilense*. Presenta un ORF 358 aminoácidos y una secuencia nucleotídica de 1077.



```
agctctaccattttataacactagaatttgtaaaccctagatttgctgtaacagaaag
atggatgaagagtatgatgtgatttgcttggtactggctctcaaagaatgtatcctcagc
M D E E Y D V I V L G T G L K E C I L S
ggctctctctctgttgatgggtctcaaggtcctgcacatggacagaaatgactactatgga
G L L S V D G L K V L H M D R N D Y Y G
ggagaatcgacgtctctcaatcttgccagctctggaagaggttcaggggaagtgataag
G E S T S L N L V Q L W K R F R G S D K
cctccagctcaattgggttctagcagggattataatgttgacatgatccctaagttcatt
P P A Q L G S S R D Y N V D M I P K F I
atggctaattgggtgcgcttgtagagttctaataccacaccgatgtcacaaaatacttatac
M A N G A L V R V L I H T D V T K Y L Y
ttcaaagctggtgatggcagctttgtgtataataaaggaaaggtccacaaggtgcctgcc
F K A V D G S F V Y N K G K V H K V P A
actgatatggaggcaacttaaatctcctttaaattgggcatttttgagaaacgccgtgctcga
T D M E A L K S P L M G I F E K R R A R
aagttcttcatctatgttccaggtattataaggagagtgacccaaagacacatgaggggatg
K F F I Y V Q D Y K E S D P K T H E G M
gatctaacaagggtagacagcaagagagcttattgcaaaatatggctcttgatgacaatact
D L T R V T A R E L I A K Y G L D D N T
gtggacttcattggctcatgcatggcattacacagagatgaccgctacttagacaaacct
V D F I G H A L A L H R D D R Y L D K P
gcgttggatacagtgaaagagaatgaagctgtatgctgagctctcttgacagttttcaagga
A L D T V K R M K L Y A E S L A R F Q G
ggatcaaccatataatctaccctttatatggattaggagagcttccccggcgctttgctcga
G S P Y I Y P L Y G L G E L P R A F A R
cttagtgctgtgtatgggtgggacctatatgctgaacaaacctgaatgcaaggtagacttt
L S A V Y G G T Y M L N K P E C K V D F
gatgaagaagggaaaagtctgtggtgtcacttcagaaggagagacagctaagtgaagaaa
D E E G K V C G V T S E G E T A K C K K
gttgtgtgtgatccttcttacttgaacaacaaggttagaaaggttgaaaagttgcaaga
V V C D P S Y L N N K V R K V G K V A R
gctgtcgaattatgagccacccaattccaaataccaatgattcacactcagtgcaaatt
A V A I M S H P I P N T N D S H S V Q I
attttaccocaaaaacaattgggcccgtaaatctgatctgtacctgttctgtttgttcttac
I L P Q K Q L G R K S D L Y L F C C S Y
actcataatggttgcctccaaagggcaaatatttgatttgcctcaacagagggcagaact
T H N V A P K G K F I A F V S T E A E T
gataatccggagagtgaaactgaagcctggattgatcttctaggacaagtggatgaaatc
D N P E S E L K P G I D L L G Q V D E I
ttctttgaagcatatgacagatttgagcctgtcattgagccctcttagataattgtttt
F F E A Y D R F E P V I E P S L D N C F
atttctactagctatgatgctacaactcactttgagtcgaccgttgatgatgtcctcaac
I S T S Y D A T T H F E S T V D D V L N
atgtataccttgataactggaaggttctggacctcaatgtggatctaagtgtcgcgagt
M Y T L I T G K V L D L N V D L S A A S
gccgctgaagaatgagatgggtctcttgccctgtgtacctctatgtactgttctttgggt
A A E E *
tattacttgattgttctctctgttctgtgtaagagttggtgcccttgcttataaaaaa
aatatgcttttttaatgcaacgatgagataatgtttgttgaagttggtgatatgtatactg
tgggtatttg
```

Figura 11: Secuencia nucleotídica y aminoácídica del ORF del gen que codifica para la proteína Inhibidor de la disociación de GDP de *Lycopersicon chilense*.

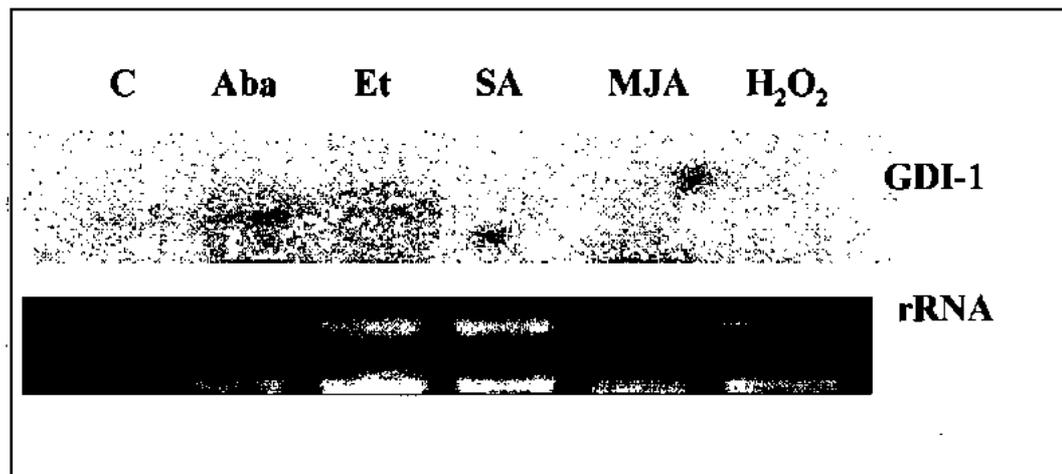
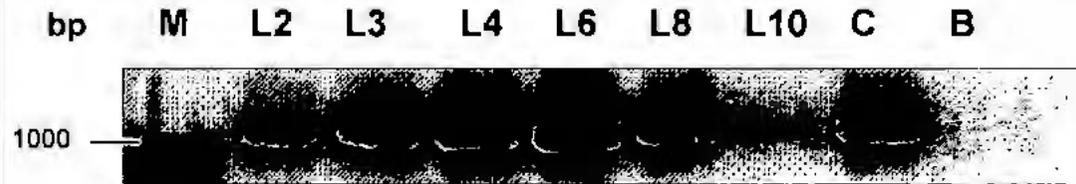


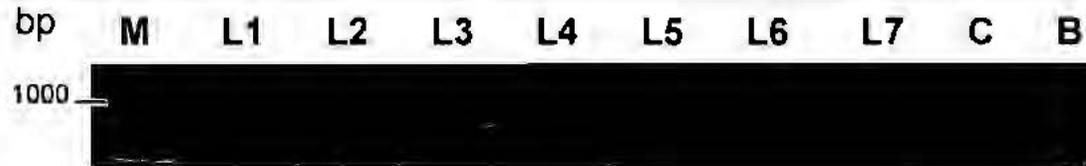
Figura 12 : Respuesta del gen de la proteína de inhibición de la disociación de GTP, a diversas señales químicas.

Figura 13: RT-PCR de plantas trasgénicas de *L. esculentum* var. MM transformadas con las construcciones:

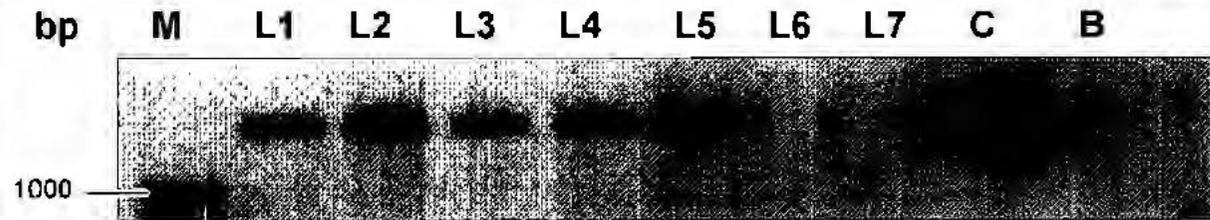
35S::SAMDC



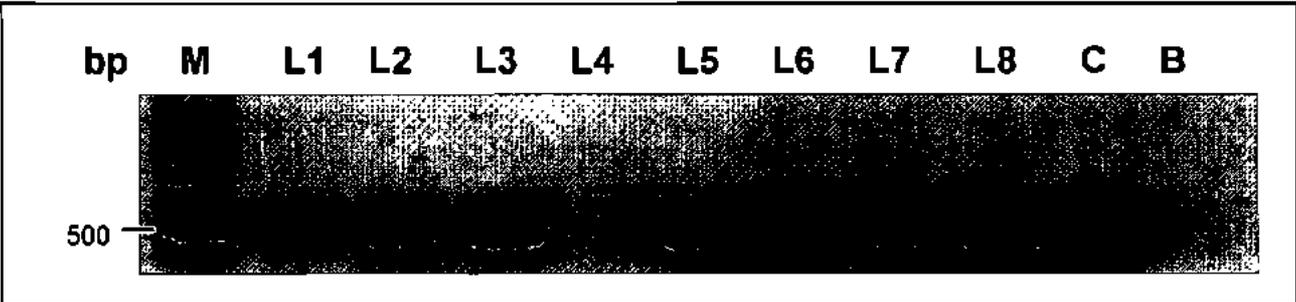
35S::CAB



35S::GDI



35S::Pr10



35S::LTP

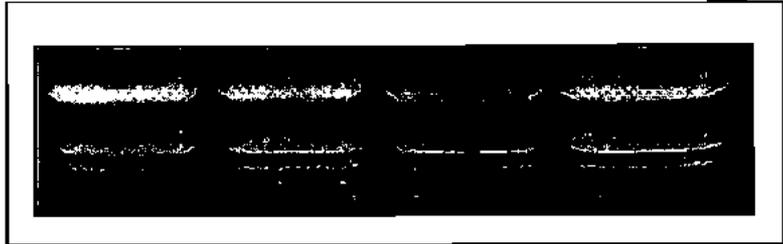
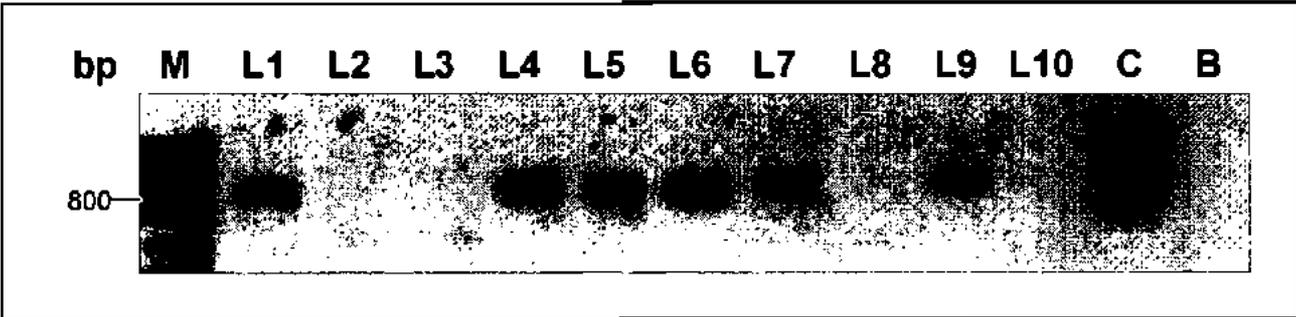


Figura 13 B.

***L. esculentum* var MM**

C L1 L2



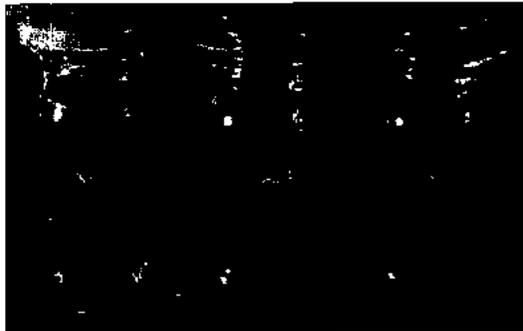
Construcción 35S::GDI

L1 L2 L3



150 mM NaCl

L1 L2 L3



Construcción 35S::LTP

L1 L2 L3



Construcción 35S::SAM

Figura 14: Plantas Transgenicas de tomate tolerantes a 150 mM NaCl

L. esculentum
Control



35S:: Ca/b



35S:: SAMdC



Figura 15: Platas transgénicas tolerantes a 200 mM sal en cultivo hidropónico



Figura 16: Plantas transgénicas en tierra y disponible para posteriores evaluaciones.



Todas las secuencias obtenidas en este proyecto han sido ingresadas al Gene Bank de Palo Alto California, y por lo tanto están protegidas por derechos de autor o descubridor.

3.- Caracterización de la respuesta del gen de la proteína Inhibidor de la disociación de GDP de *Lycopersicon chilense*, a diferentes estrés y por diferentes señales químicas del sistema de transducción de señales. Para este caso hemos demostrado que el gen es regulado por la vía de transducción de señales del Etileno y ABA, cuyos elementos en *cis* deberían estar presentes en las zonas reguladoras del gen (Figura 12), lo cual será advertido cuando se aísle la zona promotora del gen, lo cual no fue posible en el transcurso del proyecto.

4.- Obtención de cuatro plantas transgénicas de *Lycopersicon esculentum* que sobre- expresan diferentes genes de interés y que otorgan tolerancia a estrés abiótico.

La sobre-expresión de los genes quiméricos en las plantas transgénicas fue demostrada mediante RT-PCR, utilizando un primer del vector que hibrida con la zona entre el sitio SST1 de clonaje y el terminador NOS, y el segundo primer de la zona codificante del gen presente el vector. El resultado de dicho experimento se observa en la figura (12 y 13).

Las plantas transgénicas tolerantes a sal a 150 y 250 mM NaCl son mostradas en las Figuras 14 y 15 respectivamente. El estado actual de las plantas en tierra y algunas floreciendo también son mostradas en la figura 16.

5. Fichas Técnicas y Análisis Económico:

Sea anexan las fichas técnicas de:

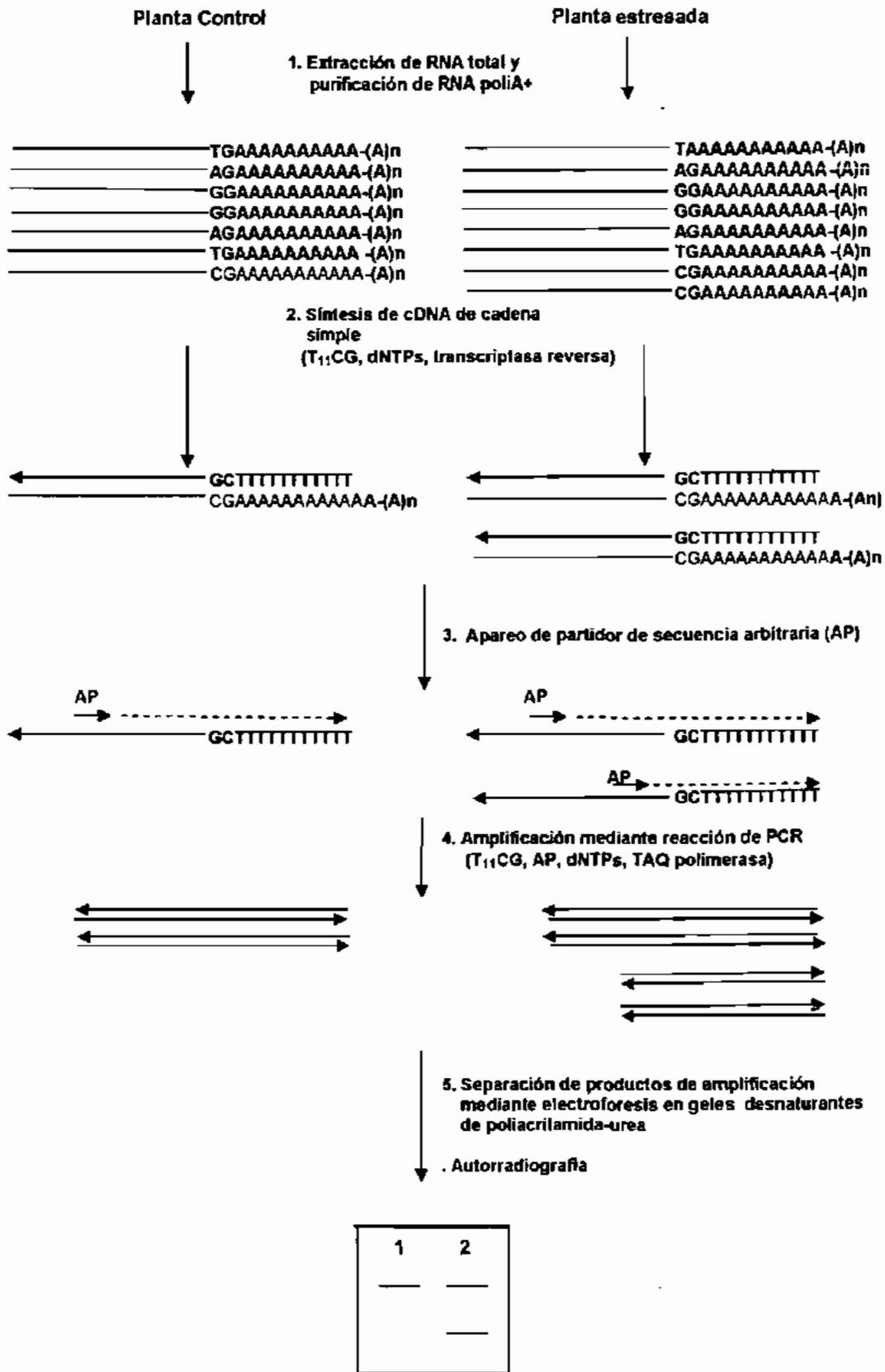
- a.- Protocolo de Differential Display
- b.- Protocolo de medición de solutos
- c.- Protocolo de IPCR o PCR-inverso
- d.- Protocolo de transformación de *Lycopersicon esculentum* por el método de Fillati
- e.- Protocolo de transformación de *Lycopersicon esculentum* por el método de Pozueta
- f.- Protocolo de transformación de *Arabidopsis thaliana* por el método de Clough y Bent.
- g.- Protocolo de transformación de *Nicotiana tabacum* por el método de Horsch y col.

6. Impactos y Logros del Proyecto:

Dado los resultados obtenidos en el proyecto es imposible poder determinar de manera cuantitativa los impactos productivos, económicos y comerciales. Las plantas transgénicas de tomate tolerantes a sal o de cualquier otra especie hortícola donde los genes en cuestión sean colocados, son de gran valor comercial, y por cuanto aumenta substancialmente la cantidad de suelos agrícolas disponibles, aumentando la producción total del fruto de la planta.

Por otra parte los impactos sociales puedan ser también enormes, aya que poblaciones pobres de zonas geográficas con suelos degradados, podrían tener a través de esta vía la posibilidad de obtener recursos al sembrar con estas plantas.

En cuanto a los impactos tecnológicos, es posible a la luz de los resultados tener:



Protocolo: Medición de solutos

29/05/02

1. Se trabajara con plantas de *Lycopersicon chilense* crecidas en perlita y regadas con fertilizante VITASAC (descripción 11/04/02)

Variedades:- Lluta: 3 plantas 4 meses de crecimiento

Candelabro: 2 plantas 4 meses de crecimiento

2.- De las tres plantas de **Lluta**

- 1 se utilizara como control

- Las otras 2 plantas se regaran con una solución de 200 mM NaCl, una vez por semana (presentan mayor tolerancia a la sal)

2.1.- De las 2 plantas **Candelabro**

- Una se utilizara como control

- La otra se regara con una solución de 100 mM NaCl, una vez por semana (presenta menor tolerancia a la sal)

3.- A los 2, 10 y 15 días se tomaran hojas jóvenes y viejas, se lavaron las hojas con agua bidestilada, luego se secaron a 70°C por 24 hrs. (hasta quedar como polvo)

4.- Se realizara la medición de los solutos utilizando 100 mg de tejido.

5.- Los iones son determinados por espectrofotometría de absorción atómica y los cloruros por titulación.

Referencias para el estudio

“Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit”.

Hong-Xia Zhang and Eduardo Blumwald

Nature biotechnology volume 19 August 2001

La sobre expresión de *AtNHX1* (Antiporte Na^+ / H^+ vacuolar de *Arabidopsis thaliana*) permite a las plantas transgénicas de tomate crecer en 200 mM NaCl.

Medición solutos mg / 100 mg peso seco

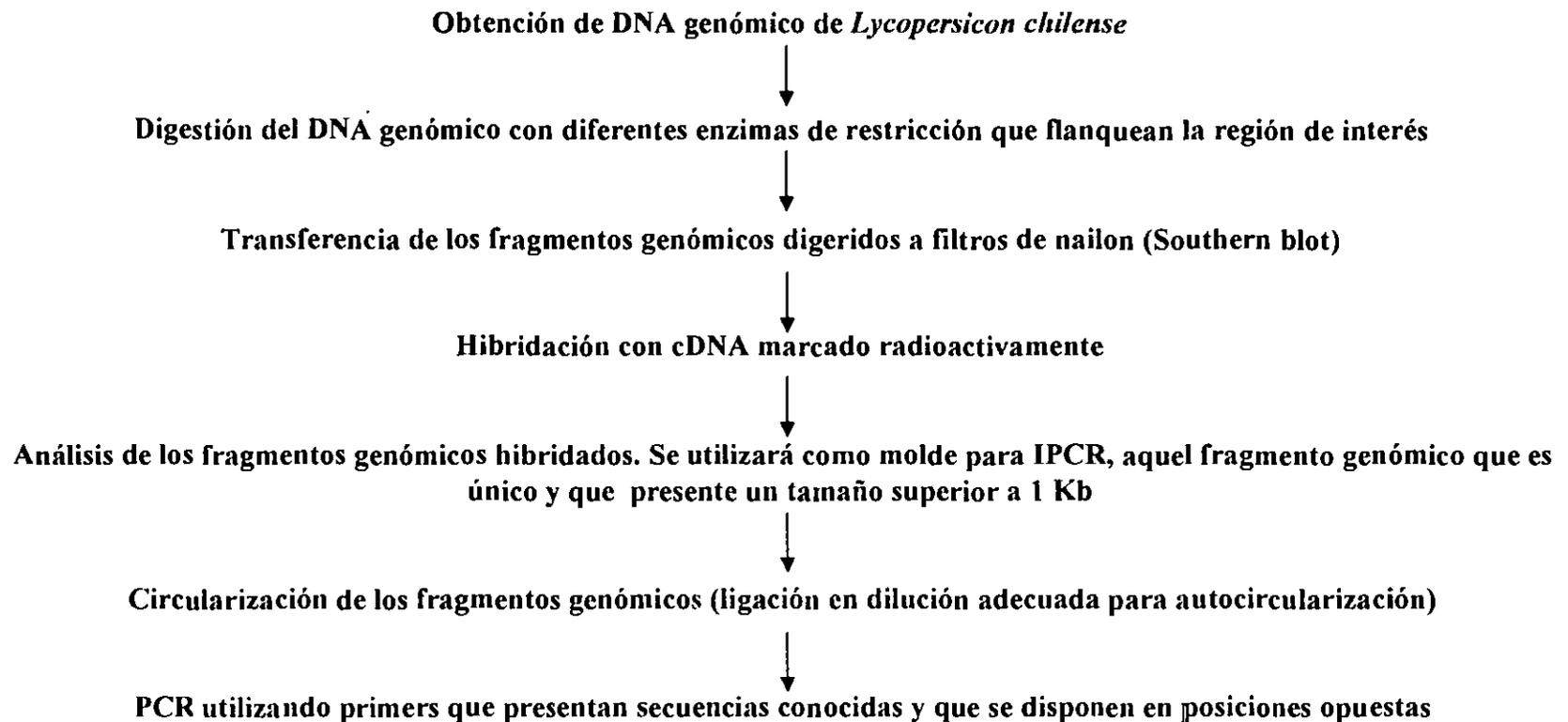
	Plantas silvestres	Plantas Transgénicas
Na^+	0.01 mg/ 100mg peso seco	1 mg/ 100mg peso seco
K^+	6-7 mg/ 100mg peso seco	2 mg/ 100mg peso seco
Cl^-	0-0,01 mg/ 100mg peso seco	1,1 -1,0 mg/ 100mg peso seco

Planta	Condición	Variedad	2 días estrés	10 días estrés	15 días estrés
1 ^a hojas jóvenes	Control	Lluta	290 mg P. seco	350 mg P. seco	350 mg P. seco
1 ^b hojas viejas	Control	Lluta	230 mg P. seco	260 mg P. seco	330 mg P. seco
2 ^a hojas jóvenes	200 mM NaCl	Lluta	Ocupado	240 mg P. seco	470 mg P. seco
2 ^b hojas viejas	200 mM NaCl	Lluta	350 mg P. seco	240 mg P. seco	410 mg P. seco
3 ^a hojas jóvenes	200 mM NaCl	Lluta	210 mg P. seco	230 mg P. seco	320 mg P. seco
3 ^b hojas viejas	200 mM NaCl	Lluta	220 mg P. seco	220 mg P. seco	270 mg P. seco
4 ^a hojas jóvenes	Control	Candelabro	220 mg P. seco	340 mg P. seco	450 mg P. seco
4 ^b hojas viejas	Control	Candelabro	190 mg P. seco	180 mg P. seco	300 mg P. seco
5 ^a hojas jóvenes	100 mM NaCl	Candelabro	220 mg P. seco	380 mg P. seco	460 mg P. seco
5 ^b hojas viejas	100 mM NaCl	Candelabro	220 mg P. seco	160 mg P. seco	290 mg P. seco

FICHA TÉCNICA

IPCR (PCR-INVERSA)

Este método se utiliza para amplificar secuencias de DNA que flanquean regiones de secuencias conocidas



TRANSFORMACIÓN DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* variedad Money Maker)

(Fillati J.J; Kiser . J; Rose . R1987) Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary tumefaciens vector. Biotechnology 5: 726 -730.
Protocolo de Jessica Dietae & Astud Blau.

Esterilización de las Semillas

Las semillas son sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 30% por 8 min, se le adiciona además unas gotas de triton 100 ó de tween 20, también se puede utilizar el SDS (± 0.02%). Se tratan 2 min con etanol 70 % luego se enjuagan 3 veces con abundante agua destilada estéril, se dejan secar las semillas dentro de la placa en el interior de la campana de flujo laminar. Cuando las semillas están completamente secas se siembra un grueso de ellas en cada recipiente con medio MS Murashige & skoog 1962, suplementado con vitaminas. Posteriormente se colocan en una cámara de cultivo a una temperatura de 25°C con foto periodo de 16 hrs. Luz/ 8 hrs. oscuridad, en oscuridad por 7 días (hasta 10 días).

Medio MS:

1 Lt. (½ MSO = 7 gr / L)	+ 100,0 ml (30%) Sacarosa
	+ 8,0 gr /l de Agar.
	+ 1,0 ml de Vitaminas 1000x

Vitaminas (1000x)

Nicotinic acid	0.1 gr
Pyridoxine	0.1 gr
Tiamine	0.02 gr
Glicine	0.4 gr
Myo- inositol	20.0 gr
	1 Lt

Inducción de Callos

A la semana de haber plantado las semillas de tomate, se proceden a cortar los cotiledones sobre un disco de papel filtro estéril humedecido con 10 mM MgSO₄. Para esto se cortan todas las plántulas de 1 caja a una altura de 1 cm y luego se realiza el corte a los cotiledones propiamente tal (en la base y punta de ellos). Después los cotiledones se trasladan a una placa con medio inductor de callos. En este traslado se debe tener especial cuidado en no dañar con las pinzas el cotiledón, este debe quedar con el envés hacia arriba. Se realizan 2 días de preincubación en oscuridad. Se colocan en una cámara a temperatura de 25°C con foto periodo de 16 hrs luz/ 8 hrs oscuridad.

Medio Inductor de Callos:

1 Lt. (½ MSO = 7 gr / L)	+ 100,0 ml (30%) Sacarosa
	+ 1,0 ml 2,4 D (1mg/ml)
	+ 0,2 ml Kinetin (1mg/ml)
	+ 8,0 gr /l de Agar.
	+ 1,0 ml de Vitaminas 1000x

Transformación de Cotiledones

Para la transformación de cotiledones se deben preparar previamente las células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*, para esto se crecen a confluencia DO₆₀₀ = 1.0 en un volumen de 10 -15 ml en tubos falcón con medio YM. Se centrifugan a 4000 rpm por 25 min, el pellet se resuspende con pipeta en 10 ml de Mg SO₄.

Posteriormente se vuelve a centrifugar y resuspender en las mismas condiciones anteriores y por ultimo se vuelven a centrifugar y finalmente se resuspenden en 10 ml de $MgSO_4$ (esta suspensión es la que se utiliza). Para poder realizar la transformación se coloca esta suspensión celular (10 ml) en una placa petri pequeña (6 cm de diámetro) y ahí se van trasladando los cotiledones, con cuidado, se agitan un poco en la suspensión celular y se dejan unos segundos (10 seg) y nuevamente se transfieren a las placas inductoras de callos en la cuál estaban, dejándolas con el envés hacia arriba. Se cocultivan 2 días en oscuridad. Se colocan en una cámara a temperatura de 25°C con foto periodo de 16 hrs luz/ 8 hrs oscuridad.

Inducción de Brotes

Trascurrido el periodo de preincubación se trasladan los cotiledones a un medio inductor de brotes. Para su incubación se colocan en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C con foto periodo de: 16 hrs luz/ 8 hrs oscuridad. Los cotiledones en este medio deben estar aproximadamente 7 a 10 días, transcurrido ese tiempo deben ser cambiadas de medio porque los antibióticos y nutrientes tienden a agotarse. Los cotiledones serán mantenidos en este medio hasta que exista desarrollo de plántulas, el proceso total de trabajo es largo y puede durar de 3- 5 meses, este tiempo depende de las construcciones que se utilicen.

Medio de Inducción de Brotes:

- | | | |
|---------------------------|---|-----------------------------------|
| 1 Lt. (½ MSO = 7 gr / L) | + | 100 ml 30% Sacarosa (3% sac p/v) |
| | + | 1,0 ml Zeatin (1mg/ml) |
| | + | 1,0 ml Kanamicina (100mg/ml) |
| | + | 0,5 ml Carbenicilina (500 mg/ml) |
| | + | 8.0 gr /l de Agar. |
| | + | 1,0 ml de Vitaminas 1000x |

Inducción de Raíces

Cuando la plántula alcance un desarrollo aceptable aproximadamente de 1-2 cm se traspasara a un medio de inducción de raíces, estas se demoraran en aparecer entre 7- 10 días, luego las plantas se trataran en forma normal, por lo tanto se puede repicar en medio MS suplementado con vitaminas 1000x y posteriormente traspasarlas a tierra.

Medio de inducción de raíces:

- | | | |
|---------------------------|---|----------------------------------|
| 1 Lt. (½ MSO = 7 gr / L) | + | 100 ml 20% Sacarosa (2% sac p/v) |
| | + | 1.0 ml Kanamicina (100mg/ml) |
| | + | 8.0 gr /l de Agar. |
| | + | 1,0 ml de Vitaminas 1000x |

Protocolo obtenido desde:

Plant Cell, Tissue and Organ Culture: 67: 173 - 180, 2001

Enhanced regeneration of tomato pepper seedling explants for *Agrobacterium* - mediated transformation

Javier Pozueta, Guy Houlné, Luis Cañas, Rodolphe Schantz & Jesús Chamarro

Metodología

Las semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cvs. Money maker) son esterilizadas en etanol al 70% (v/v) por 10 segundos, luego son traspasadas a una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 20 min., y posteriormente lavadas en abundante agua estéril. Son germinadas en medio MS (Murashige and Skoog, 1962), adicionando 3% Sacarosa y 0.8% agar planta (Duchefa), en cámara de cultivo a 25°C con fotoperiodo de 16h/ días ($65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Después de la germinación (4 - 6 días) las plantulas son cortadas en la base del cotiledón y en los meristemas apicales con un bisturí.

Las *Agrobacterium tumefaciens* transformadas son crecidas toda la noche en medio LB con Kanamicina (50 ug/ml) y Estreptomicina (100 ug/ml) diluida a una $\text{OD}_{600} = 0.1$ y crecidas a $\text{OD}_{600} = 0.4 - 0.5$. La suspensión bacteriana es centrifugada a 3000xg por 5 min en tubos falcon de 50 ml y resuspendidas en medio MS líquido usado para infectar los explantes. La suspensión bacteriana resuspendida en medio MS líquido es colocada en placas petri de 150 x 20 mm, conteniendo los explantes, y es agitada gentilmente por 10 min. Los explantes infectados son extraídos de esta suspensión y secados en papel filtro estéril y cocultivados por 2 días en medio MS fresco en cámara de cultivo a 25°C con fotoperiodo de 16h/ días ($65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Transcurrido este período los explantes son transferidos a un medio MS sólido conteniendo 250 ug/ ml de Ticarcillin y 40 ug/ ml de Kanamicina incubados en cámara de cultivo a 25°C con fotoperiodo de 16h/ días ($65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Después de 3 - 4 semanas las plantulas emergentes elongan y pueden ser cortados y traspasados un medio inductor de raíces y cultivados en cámara de cultivo a 25°C con fotoperiodo de 16h/ días ($65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

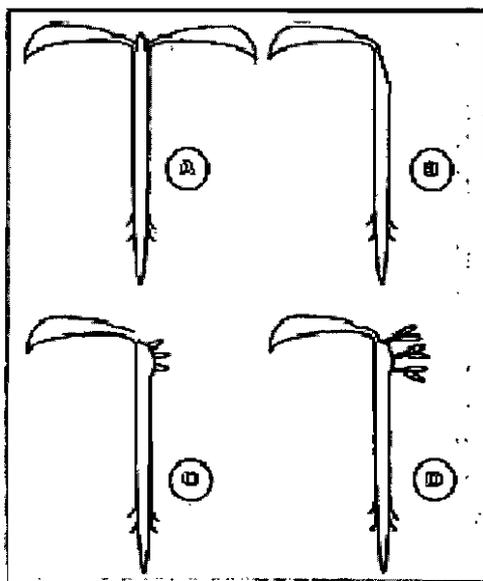


Figure 1. Sequential steps of plant regeneration from flamingo-bill explants. (A) Tomato/hell pepper seedling. At this developmental stage the leaf primordia are visible. (B) The flamingo-bill explant is excised upon removal of one cotyledon and the primary and secondary meristems. (C) Callus development and regeneration of meristems from the cut surface of flamingo-bill explants (0-14 days after excision). In the case of hell pepper, but not in tomato, at the beginning of this stage, the remaining cotyledon must be excised for further shoot regeneration. (D) Shoot regeneration and elongation (14-21 days after excision).

Elección de Método:

La transformación de tomate vía *Agrobacterium* no es considerado un problema real, lo importante es obtener un método de transformación de tomates más eficiente, rápido y universal, lo cual se documenta en literatura (Mc Cormick et al., 1986; Chyi and Phillips, 1987; Fillati et al., 1987; van Roekel et al., 1993; Frary and Earle, 1996). Los métodos reportados en general son tediosos y consumen mucho tiempo, con eficiencias de transformación variable (4-12%) (Hamza and Chupeau, 1993; van Roekel et al., 1993).

Tanto raíces como cotiledones de plántulas jóvenes producen activamente PGRs (**reguladores del crecimiento de plantas**) involucrados en el control de organogénesis (Hicks, 1994). Esta observación propone que el balance de PGRs producido por estos organismos puede inducir *de novo* regeneración de meristemas, desde meristemas apicales y axiales que han sido cortados en las plántulas durante su desarrollo temprano. Este reporte describe el desarrollo de un procedimiento de regeneración de plantas simple y eficiente, en un medio libre de PGR, aplicable a diferentes cultivares de tomate y pimentón. El proceso es compatible con la ingeniería de plantas mediada por *Agrobacterium*.

TECHNICAL ADVANCE

Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*

Steven J. Clough and Andrew F. Bent

Metodología:

Crece en macetas plantas de *Arabidopsis* vigorosas y sanas hasta que florezcan. Cortar los primeros tallos (inflorescencias), para obtener varios tallos secundarios. Las plantas estarán listas 4-6 días después de podarlas.

Preparar la cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que portan los genes de interés, para esto se crecen en un cultivo líquido a 28°C en medio YEP, con agitación y con los antibióticos de selección correspondientes. Se pueden utilizar células en cultivo en fase logarítmica media o en fase estacionaria. Centrifugar las bacterias, y resuspenderlas a una $DO_{600} = 0.8$ en una solución fresca de 5% sacarosa. Se necesitan 450 ml para cada 2 a 3 potes con plantas de *Arabidopsis*. Antes de sumergir las plantas agregue Silwet L-77 a la solución a una concentración de 0.05% (500 μ l/ L). Sumerja cuidadosamente el extremo de la inflorescencias en la solución de *Agrobacterium* por 2-3 segundos. Ponga las plantas sumergidas bajo una bolsa plástica por 16 - 24 horas, para mantener la humedad, no exponer a excesiva luz (el aire al interior de la bolsa se calienta). Saque las bolsas y trate las plantas normalmente, dejando un papel debajo, por las posibles semillas que cayeran. Riegue moderadamente. Una vez que las semillas en las silicuas (frutos) maduren, deje de regar. Coseche las semillas maduras. Déjelas secar y luego almacene en frío (4°C) por lo menos una semana. Esterilice las semillas tratándolas con hipoclorito de sodio al 10% por 7 min, y luego lavándolas al menos dos veces con agua destilada estéril. Seleccionar las transformantes en placas con medio MS y el marcador de selección (50 μ g/ml de kanamicina). Trasplantar las putativas transformantes a tierra.

Resultados

04-05-05 Germinar semillas de *Arabidopsis thaliana* variedad Columbia en medio MS.

18-05-05 Traspaso a tierra.

Problemas

No existen cámaras de crecimiento adecuadas para *Arabidopsis thaliana*

Cultivo de plantas en tierra: 100 μ E (5000 lux). Esta iluminación supone la saturación de la capacidad fotosintética de las plantas. El tipo de luz es la misma para día largo (fase reproductiva) o día corto (fase vegetativa). En estos casos sólo cambia el tiempo de iluminación (16 ó 8 horas por día).

Un aspecto fundamental es que la cámara debe estar refrigerada para compensar el calor generado por la iluminación. La potencia de refrigeración debe estar acorde con la cantidad de vatios utilizados.



Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	Nuevo	Nuevo		Planta Transgénica, tolerante a sal
Proceso				
Servicio				

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes		
Solicitudes de patente		
Intención de patentar	4	Plantas transgénicas tolerantes a sal a estrés hídrico y a bajas temperaturas
Secreto industrial		
Resultado no patentable		
Resultado interés público		

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica		
Generación nuevos proyectos		

Los impactos científicos fueron los siguientes:

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (<i>Citas, título, descripción</i>)
Publicaciones	3	Effect of salt stress in the adjustment of K^+/Na^+ ratio and photosynthesis rate and differential gene expression in <i>Lycopersicon chilense</i> Dun. Enviado a Plant Physiology and Biochemistry
(<i>Por Ranking</i>)		A GDP dissociation inhibitor gene Rab-GDI is differentially regulated by abiotic stress, ABA and ethylene in wild type tomato species (<i>Lycopersicon chilense</i>). En preparación
		Comparative analysis of the response physiological to drought stress of some isoprenoids of the route plastid in two <i>Lycopersicon</i> species. En preparación
Eventos de divulgación científica		Simposio "Mecanismos moleculares de la respuesta a defensa a estrés biótico y abiótico". 12 y 13 de Enero de 2006. Salon Diego Portales



	<p>Universidad de Talca. Simposio. "Bases Moleculares y Fisiológicas de la respuesta a estrés. XVIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. 11 de Enero de 2006. Simposio "Mecanismos moleculares en respuesta a estrés a Plantas" XVII reunión Anual de la Sociedad de Botánica de Chile. Talca, 17 de Enero de 2006.</p> <p>Presentación en Congresos: Análisis de la expresión génica diferencial durante la aclimatación a estrés salino en <i>L. chilense</i>. Tapia, Yañez, Ruiz-Lara, S. XXVII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Talca Enero 2006.</p> <p>Identificación y análisis de la expresión del gen <i>LCHGDI1</i>, en la planta nativa de tomate <i>L. chilense</i>. XLVII. Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Pucón, Chile. Noviembre de 2004.</p> <p>Presentaciones en Jornadas de Investigación de la Universidad de Talca. Aislamiento y caracterización de genes expresados bajo estrés por deshidratación en <i>Lycopersicon chilense</i> Iván Ahumada, Isabel Verdugo, Simón Ruiz. "2002</p> <p>Identificación de genes de Deshidrina en <i>Lycopersicon chilense</i>, y análisis de su expresión diferencial. Paulina Ferrada, Hildegard Kranen, Fernando Pobrete, Enrique González. "2002</p> <p>"Identificación de genes expresados diferencialmente durante estrés salino en la especie <i>Lycopersicon chilense</i>" Tapia G. , Yañez M. y Ruiz-Lara, S. 2003</p> <p>Estudios fisiológicos y moleculares implicados en la tolerancia al estrés por sequía en dos especies de <i>Lycopersicon</i>. Loyola, J., Ahumada, I, Ruiz- Lara S. 2003</p> <p>Artículos y Notas de Prensa publicados en la</p>
--	---



		<p>revista Bioplanet:</p> <p>Artículo en N° 12 de Noviembre- Diciembre de 2002, llamado Saldo a Favor.</p> <p>Artículo N° 28 del mes de Marzo-Abril de 2004, titulado "Potenciado la tolerancia a la salinidad en plantas".</p> <p>Nota de Prensa publicada N°39 de Enero – Febrero de 2006, titulado Biotecnología de la Tolerancia y adaptación a estrés en plantas.</p> <p>Artículo de 3 páginas que esta en preparación y que será publicada en el número 41 de Abril-Mayo de 2006.</p> <p>Artículos en prensa (seminarios): Alta participación de expertos en Simposio Internacional. Semanario universidad de Talca. Viernes 24 de Marzo de 2006.</p>
Integración a redes de investigación		

Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (<i>Título, grado, lugar, institución</i>)
Tesis pregrado	0	
Tesis postgrado	3	<p>Trabajo de Tesis Doctorales en Programa de Doctorado en Ciencias, mención Ingeniería Genética Vegetal de la Universidad de Talca.</p> <p>Análisis de la expresión de los genes involucrados en la tolerancia al estrés salino y sequía en <i>Lycopersicon chilense</i> y su relación con la regulación de los procesos fotosintéticos y el metabolismo de azúcares. Estudiante Gerardo tapia San Martín. Defensa de Tesis Doctoral realizada en Octubre de 2005, cvalificación Nota 6,5.</p> <p>Análisis Comparativo de la expresión de genes involucrados en la síntesis de isoprenoides en <i>Lycopersicon chilense</i> y <i>L. esculentum</i>, bajo condiciones de estrés abiótico. Estudiante de Doctorado José Loyola. Tesis en redacción.</p> <p>Análisis de la expresión de genes que codifican para proteínas de la superfamilia LHC y su relación con la tolerancia a estrés fotooxidativo en la especie nativa de</p>



		<i>Lycopersicon chilense</i> . Estudiante Javier Chilian, Trabajo de Tesis en Ejecución
Pasantías		
Cursos de capacitación		

7. Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

Los únicos problemas enfrentados en el proyecto fueron de carácter Técnico y fueron enfrentados mediante cambios en las metodologías de trabajo y mediante la adquisición del equipo necesario cuando correspondía.

Los problemas fueron enunciados en la sección dos de la Metodología de este informe.

8. Otros Aspectos de Interés

Lo lamentable es que este Proyecto que tiene resultados que pueden ser patentables, pero que se requiere una última etapa de investigación de laboratorio antes de ensayos de campo, se quede sin financiamiento y no exista ninguna posibilidad en el propio FIA, para que tenga una vía de continuación. Ya que de no obtener a la brevedad financiamiento, las líneas transgénicas de tomate y tabaco empezaran a perderse.

9. Conclusiones y Recomendaciones:

Este Proyecto ha cumplido sus objetivos en un 95%, un porcentaje extremadamente alto para el área de la Biotecnología Vegetal. La experiencia de trabajo, desde su gestión, análisis económicos y técnicos fueron muy satisfactorio. Las personas llámense Jefes de Unidades de Proyectos, Supervisores y evaluadores económicos, siempre otorgaron el máximo de ayuda para el éxito del Proyecto, en todas su áreas. La recomendación es que continúen en esta senda y que en el futuro puedan tener recursos como para mantener proyectos exitosos.

IV. INFORME DE DIFUSIÓN

Se adjunta el Programa del Simposio “Mecanismos moleculares de la respuesta a defensa a estrés biótico y abiótico en plantas”. Este Simposio estaba contemplado en el Programa de Difusión del Proyecto. Se adjunta además el listado de estudiantes Becados por el Proyecto para Asistir al Simposio y una ficha de cada uno de ellos.

Además se adjuntan, las carátulas de los Simposios en que participaron los investigadores cancelados por el Proyecto.

Se adjuntan también los resúmenes y carátulas de todas las actividades Científicas y de divulgación enunciadas en el punto III.6 de este informe.



UNIVERSIDAD DE TALCA



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico en plantas”

12 y 13 de Enero de 2006

Auditorio Diego Portales Universidad de Talca

Participantes:

- Dr. Eduardo Blumwald.** University of California Davis, USA.
- Dra. Montserrat Pagés.** Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España
- Dra. Blanca San Segundo.** Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España.
- Dr. Patricio Arce** Pontificia Universidad Católica de Chile
- Dr. José Casaretto.** Universidad de Talca. Chile
- Prof. Luis Meza-Basso** Universidad de Talca. Chile
- Dra. María Teresa Pino** INIA-La Platina. Chile
- Dr. Humberto Prieto** INIA-La Platina. Chile
- Dr. Simón Ruiz Lara.** Universidad de Talca. Chile
- Dr. Boris Sagredo** INIA-Rayentué. Chile

PROGRAMA

Jueves 12 de Enero

- 14:30-15:30** Inscripciones
- 15:30-15:45** Inauguración del Simposio
- 15:45-16:30** Conferencia Dr. Eduardo Blumwald
“Regulación de la selectividad del antitransportador vacuolar de Na^+/H^+ de *Arabidopsis thaliana*, y su rol en el estrés salino”
- 16:30-17-15** Conferencia Dra. Montserrat Pagés
“Regulación de genes inducidos en respuesta al ABA y al estrés hídrico en el maíz”
- 17:15-17:45** Break
- 17:45-18:30** Conferencia Dra. Blanca San Segundo
“Mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos”

Viernes 13 de Enero

Mañana

- 09:00-09:30** Conferencia Dr. José Casaretto
“Complejos transcripcionales que regulan genes involucrados en la tolerancia a desecación en plantas”
- 09:30-10:00** Conferencia Dr. Boris Sagredo
Detección de genes de resistencia a virus y nematodos en germoplasma de papa mediante marcadores moleculares y su utilización en el programa de mejoramiento genético de papa de INIA”
- 10:00-10:30** Conferencia Dr. Humberto Prieto
“Interacción *Botrytis* – Vid: mecanismos moleculares gatillados en la defensa vegetal”
- 10:30-11:00** Break
- 11:00-11:30** Conferencia Prof. Luis Meza-Basso
“Desarrollo de Biopesticidas”
- 11:30-12:00** Conferencia Dr. Patricio Arce
“Tolerancia a salinidad en Cítricos”

12:00-12:30 Conferencia Dra. María Teresa Pino
"La sobre-expresión de Factores de Transcripción de Arabidopsis (CBFs o DREBs) en papas aumenta la tolerancia a heladas"

12:30-13:00 Conferencia Dr. Simón Ruiz
"Genes para potenciar la tolerancia a estrés abiótico en plantas"

Tarde

15:30-16:15 Conferencia Dra. Blanca San Segundo
"Aproximaciones biotecnológicas para mejorar la resistencia de las plantas frente a enfermedades"

16:15- 17:00 Conferencia Dra. Montserrat Pagés
"Respuestas moleculares del maíz a la sequía"

17:00-17:30 Break

17:30-18:30 Conferencia Dr. Eduardo Blumwald
"Desarrollo de cultivos tolerantes al estrés ambiental: Oportunidades y desafíos"

18:30 Cierre.

Regulación de la selectividad del antitransportador vacuolar de Na^+/H^+ , *atNHX1*, de *Arabidopsis thaliana*.

Eduardo Blumwald

*Dept of Plant Sciences, University of California,
Davis, CA 95616, USA*

AtNHX1, es un antitransportador vacuolar de Na^+/H^+ de *Arabidopsis* que juega un rol central en el establecimiento de la homeostasis iónica de la célula y en la tolerancia a la salinidad de la planta. *AtNHX1* facilita la acumulación de los iones de Na^+ en las vacuolas, aliviando el efecto toxico del sodio en los procesos metabólicos de las células. La sobre-expresión de *AtNHX1* ha servido para mejorar la tolerancia a la salinidad de una variedad de plantas, incluyendo *Arabidopsis*, tomate, maíz, arroz, trigo, algodón, etc. Igualmente, la utilización de homólogos de *AtNHX1* de otras plantas ha servido para desarrollar variedades tolerantes a la salinidad. *AtNHX1* también facilita el transporte de K^+ en la vacuola y juega roles importantes en la manutención de la homeostasis de K^+ y del pH celular, procesos que son esenciales para el desarrollo de la planta. Plantas mutantes con una inserción de T-DNA en *AtNHX1* (*nhx1*) son más sensitivas a la salinidad y tienen un reducido tamaño de hojas. La transformación de las plantas *nhx1*, con un cDNA de *AtNHX1* controlado por un promotor 35S, recuperó el fenotipo de las plantas control. Los perfiles de expresión de las plantas control, las plantas *nhx1* y las plantas *NHX1::nhx1* fueron analizados usando Affimetrix ATH1 GeneChip[®] DNA microarrays. Nuestros resultados demuestran que *AtNHX1* influencia la expresión de una variedad de genes, incluyendo genes relacionados al tráfico intravesicular.

La identificación de un conjunto de proteínas (que residen en la vacuola) que interactúan con el extremo C-terminal de *AtNHX1* nos ha permitido ir comprendiendo los múltiples roles de los antitransportadores vacuolares. Una de estas proteínas, *AtCaM15*, es una calmodulina que se asocia con *AtNHX1* de una manera dependiente de la concentración de Ca^{2+} y del pH de la vacuola. La asociación de *AtCaM15* con *AtNHX1* promueve una modificación en la selectividad del antitransportador por Na^+ o K^+ . Nuestros resultados sugieren la presencia de señales intravacuolares que regulan la actividad de los antitransportadores en respuesta a cambios ambientales percibidos por las células.

Regulación de genes inducidos en respuesta al aba y al estrés hídrico en el maíz

Montserrat PAGÉS

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB).

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). 18-26 Jordi Girona, 08034, Barcelona, SPAIN

La hormona vegetal, ácido absísico (ABA) juega un papel importante durante el desarrollo de las plantas y en la transducción de la señal en respuesta a la sequía. Estudios moleculares sobre las regiones promotoras de los genes inducidos por ABA y en respuesta a la sequía demostraron la existencia de vías independientes para la regulación de la expresión génica mediada por elementos *cis* específicos. El aislamiento y la caracterización de proteínas que forman parte de la maquinaria de la transcripción de varios genes inducidos por sequía es un paso importante en la elucidación de las diferentes vías de regulación que controlan la expresión génica de los genes inducidos por el estrés. El gene *rab17* de maíz se expresa durante el desarrollo embrionario y está inducido en respuesta al ABA y la sequía en embriones y en tejidos vegetativos. Los elementos *cis* ABRE y DRE están implicados en la regulación del gene por ABA y sequía. Utilizando el sistema del One-Hybrid, hemos aislado dos nuevas proteínas que se unen al elemento DRE designadas DBF1 y DBF2, que son miembros de la familia AP2/EREBP de factores de transcripción de plantas. Los resultados obtenidos demuestran que el ABA juega un papel en la regulación de la actividad de los genes DBFs, lo que sugiere la existencia de una vía de regulación génica dependiente del ABA, a través el elemento C-repeat/DRE. En paralelo, dos factores de transcripción pertenecen a la familia bZIP fueron aislados, uno de ellos (EmBP-2) es similar al EmBP-1 de Trigo, mientras el otro ZmBZ es homólogo al OSBZ8 de arroz. Los dos factores (EmBP-2 y ZmBZ), se expresan durante el desarrollo embrionario y EmBP-2 está inducido por ABA y estrés osmótico in hojas. La sobreexpresión de estos factores en plantas de *Arabidopsis* que contienen promotores *rab/gus* indica que estos factores podrían regular la expresión de los genes *rab* a través los elementos DRE y ABRE.

Busk and Pages *Plant Cell* 9, 2261-2270. 1997.

Kizis and Pages *Plant Journal* 30, 679-689. 2002.

Nieva et al. *Plant Mol Biol.* 58 (6) 899-914 (2005)

Mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos

Blanca San Segundo.

Departamento de Genética Molecular. Instituto de Biología Molecular de Barcelona. CSIC. Jordi Girona 18, 08034 Barcelona. España.

Las plantas, como otros seres vivos, se encuentran sometidas a condiciones ambientales desfavorables, ante las cuales deben adaptarse para sobrevivir. Son muchos los organismos potencialmente perjudiciales para la planta, desde agentes infecciosos (virus, viroides, bacterias, hongos), hasta organismos consumidores de vegetales (insectos, nematodos). Para contrarrestar el ataque por parte de estos organismos, las plantas desarrollan una amplia gama de respuestas de defensa.

En muchos casos, las plantas no son susceptibles del ataque por un patógeno gracias a un tipo de resistencia basal o resistencia general ("non-host resistance"). Este es un proceso complejo, no específico de patógeno y duradero, en el cual participan una gran variedad de defensas, tanto constitutivas como inducibles. Este tipo de resistencia, se desencadena tras el reconocimiento de patrones moleculares asociados al patógeno (pathogen-associated molecular patterns, o PAMPs) y está asociado a la expresión de genes de defensa. En otros casos, la resistencia viene condicionada genéticamente y está gobernada por el reconocimiento entre el producto de un gen de resistencia (gen *R*) de la planta con el producto de un gen de avirulencia (gen *avr*) del patógeno (teoría gen-a-gen). Este reconocimiento determina la rápida puesta en marcha de las respuestas de defensa de la planta. A diferencia de la resistencia basal, la resistencia mediada por genes *R* es altamente específica (cultivar de la planta huésped-raza del patógenos). Así, una mutación única en el gen *avr* del patógeno es suficiente para que no se produzca el reconocimiento por parte de la planta y en consecuencia se origine la enfermedad.

Los mecanismos moleculares que conducen hasta la activación de las respuestas de defensa de las plantas se encuentran bajo intensa investigación. Tras el reconocimiento del patógeno (o de moléculas derivadas del patógeno) se activan una serie de mecanismos en los que intervienen múltiples vías de señalización que conducen hasta la activación de las respuestas de defensa. La primera línea de defensa se observa en las células que se encuentran en contacto directo, o en la proximidad del patógeno. Aquí, se observan cambios importantes en el flujo de iones de la membrana plasmática, generación de especies reactivas de oxígeno y cambios en el estado de fosforilación de proteínas. Se ha descrito la implicación de proteínas quinasa MAP kinasas (Mitogen-

activated protein kinases, MAPKs) y de proteínas quinasa dependientes de calcio (calcium-dependent protein kinases, CDPKs) en la respuesta frente a patógenos. Estas respuestas locales pueden llevar a una muerte celular rápida, conocida como respuesta hipersensible ("hypersensitive response", HR), y a la detención de la expansión del patógeno. Una segunda línea de defensa, implica cambios metabólicos importantes que están dirigidos hacia el reforzamiento de la pared celular, la activación del metabolismo secundario con la síntesis de fitoalexinas (compuestos antimicrobianos), la síntesis de proteínas y/o péptidos con actividad antimicrobiana, o de moléculas señalizadoras para la activación de las respuestas de defensa a nivel sistémico. Una respuesta generalizada en las plantas es la síntesis y acumulación de proteínas relacionadas con patogénesis (proteínas PR, "Pathogenesis-Related proteins). Las proteínas PR se sintetizan no solo en los puntos de infección sino también en sitios distantes y confieren protección a la planta frente a infecciones posteriores no solo por el patógeno que inicialmente indujo su expresión sino también frente a otros patógenos. Este fenómeno se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR, "systemic Acquired Resistance"), y viene a representar la tercera línea de defensa de las plantas. Existe además una forma diferente de resistencia inducida promovida por rizobacterias no patogénicas del suelo, conocida como resistencia sistémica inducida (ISR, Induced Systemic Resistance).

En la actualidad, se está dedicando una atención especial al estudio de los mecanismos de señalización que están implicados en la resistencia frente a patógenos, tanto a nivel local como a nivel sistémico. La identificación de genes reguladores de la respuesta de defensa indica que las plantas utilizan diferentes vías frente a diferentes patógenos. Por lo general, estas vías están caracterizadas por moléculas señalizadoras específicas que son cruciales para la regulación de la expresión de genes de defensa. La molécula más estudiada es el ácido salicílico. Otras vías utilizan el ácido jasmónico, ácido abscísico o etileno para su activación. El óxido nítrico, las especies reactivas de oxígeno, la sistemina, sacarosa, y más recientemente los lípidos se encuentran asimismo implicados en la activación de las respuestas de defensa, locales y/o sistémicas.

Complejos transcripcionales que regulan genes involucrados en la tolerancia a desecación en plantas

Casaretto, J.A.

Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca, Chile

Las proteínas LEA están involucradas en conferir tolerancia a la desecación en plantas. Su expresión está regulada por programas de desarrollo en semillas, estreses ambientales y por la acción de la hormona ácido abscísico (ABA). Dos factores transcripcionales, uno de tipo bZIP (HvABI5) y otro con dominio B3 (HvVP1) son necesarios para activar el gen *Lea* de cebada *HvA1* y mediar la señal por ABA. HvABI5 es capaz de unir directamente regiones reguladoras *cis*, sin embargo se desconoce el rol de HvVP1 en la activación de dicho promotor. Se ha evaluado la posible función que tendrían proteínas 14-3-3 como adaptadores del complejo transcripcional que activa al promotor de *HvA1*. Estas proteínas regulan múltiples procesos celulares en distintos organismos multicelulares y en plantas actúan como reguladores de enzimas y canales de membranas. Varias isoformas de proteínas 14-3-3 de cebada han sido identificadas y todas parecen afectar la activación del promotor de *HvA1*. Dos de ellas han demostrado poder interactuar con HvABI5 en ensayos de doble híbrido. Este modelo de complejo transcripcional también ha sido investigado en genes *Lea* de *Arabidopsis thaliana*. Estos resultados son evidencia del rol de proteínas 14-3-3 en la regulación de la expresión génica en plantas.

Detección de genes de resistencia a virus y nematodos en germoplasma de papa mediante marcadores moleculares y su utilización en el programa de mejoramiento genético de INIA.

Sagredo, B.

CRI Remehue del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Casilla 24-O.
bsagredo@inia.cl

El mejoramiento genético de la papa (*Solanum tuberosum* $4x = 2n = 48$) es un proceso largo y tedioso. Su naturaleza autotetraploide y su elevada heterocigocidad generan progenies con altos grados de segregación. La identificación y selección de genotipos que combinen el máximo de caracteres deseados requiere de poblaciones iniciales de gran tamaño, que después de un arduo proceso de selección y evaluaciones agronómicas, la liberación de una nueva variedad en promedio puede tomar 12 años o más.

La incorporación de métodos de selección asistido por marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético puede aumentar la eficiencia de identificación y selección de genotipos superiores portadores de genes de interés. Esto podría disminuir tanto los costos como el tiempo necesario para el desarrollo de una nueva variedad. El programa de mejoramiento genético de papa del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) está desarrollando métodos de selección asistidos por marcadores moleculares para identificar genotipos portadores de los genes *Ryadg*, *Rx* y *H1* que confieren resistencia a los virus PVY, PVX y a la plaga cuarentenaria del Nematodo dorado (*Globodera rostochiensis* W.), respectivamente. Estas plagas producen importantes pérdidas en rendimiento y calidad al cultivo de la papa. Se presentarán los avances obtenidos en la caracterización del germoplasma de papa de INIA en función de la presencia de estos genes y su identificación mediante marcadores moleculares, incluyendo estudios de segregación en algunas de sus progenies. Se discutirá la aplicación práctica de estos marcadores moleculares en el proceso de selección, en el programa de mejoramiento genético de papa de INIA.

Proyecto Financiado por FIA (BIOT-01-A-015)

Interacción *Botrytis* – Vid: mecanismos moleculares gatillados en la defensa vegetal.

H. Prieto,

Laboratorio de Biotecnología, INIA-La Platina

La vid (*Vitis vinifera*) representa el frutal de mayor importancia económica en nuestro país siendo utilizado para el consumo fresco y para la producción de vinos y pisco. Todos cultivares existente son afectados, en alguna medida, por el hongo necrotrófico *Botrytis cinerea*. Esta interacción genera la enfermedad conocida como pudrición gris, que lleva a fuertes pérdidas en pre- y post-cosecha y reduce así la calidad organoléptica y la condición final de la fruta.

Para que esta enfermedad ocurra en condiciones de campo, dos son las situaciones específicas en las que el hongo puede interaccionar de manera directa con su hospedero: a) una inoculación temprana al momento de la floración tardía-cuaja del fruto y b) la activación de estas esporas previamente inoculadas o una nueva inoculación de esporas a través de micro-heridas en la piel del fruto, producto de su proceso de maduración.

Independientemente del mecanismo de inoculación, la infección por este patógeno lleva a la activación de señales defensivas en la planta, agrupadas en la Reacción de Hipersensibilidad (HR) y en la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR). Utilizando tejido foliar de sistemas modelo, como *Arabidopsis* y tomate, se ha logrado dilucidar parcialmente, algunos de los mecanismos de respuesta a este hongo. Sin embargo, éstos no son del todo entendidos en vides, por lo que los genes y/o procesos biológicos involucrados en esta respuesta defensiva son bastante desconocidos, más aún si se considera que *Botrytis* puede infectar distintos órganos, como hojas, flores y frutos.

Con el fin comenzar a entender esta respuesta, se analizó el perfil transcripcional de genes involucrados en la respuesta a infección de hojas y frutos, de dos cultivares de interés agronómico para el país: Thompson Seedless (Sultanina) y Carménère. Se utilizaron microarreglos diseñados con unigenes obtenidos desde el secuenciamiento de 100.000 ESTs, de diferentes tejidos de ambos cultivares. Éstos se hibridaron con muestras de RNA purificados desde muestras de tejidos infectados en forma controlada, a diferentes tiempos post inoculación. Los perfiles de hibridación obtenidos para estos tejidos, se compararon con aquellos obtenidos en tejidos sanos (sin infectar). En forma paralela, se han determinado los niveles de hormonas conocidamente relacionadas con estos mecanismos defensivos: ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA).

Los complejos patrones de respuesta observados en estos estudios comparativos en ambos cultivares evaluados y entre sus órganos, serán presentados y discutidos, con el fin de proporcionar una visión integrativa de los posibles procesos gatillados por la infección de *Botrytis cinerea* en su desafío a *Vitis vinifera*.

Estos trabajos han sido financiados gracias a la Iniciativa Genoma Chile, Proyecto “Plataforma científica-tecnológica para el desarrollo de la genómica vegetal en Chile. Etapa I: Genómica funcional en vid”.

Desarrollo de biopesticidas

Luis Meza-Basso.

Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca

En la actividad silvoagrícola, uno de los factores que atenta en contra del desarrollo sustentable es el uso indiscriminado de pesticidas químicos. Los plaguicidas químicos son exitosos gracias a su eficacia respecto a otras formas de control. Sin embargo son altamente tóxicos para los seres vivos y contaminan el medioambiente ¿Como controlar los numerosos organismos plagas con el mínimo costo ambiental? Esta preocupación estimula la utilización de los llamados “biopesticidas” que son ambientalmente seguros en comparación a los pesticidas químicos.

En la búsqueda de formas complementarias, nuestro laboratorio se ha concentrado en el desarrollo de alternativas que pretenden asegurar la calidad del ambiente y la salud humana. La primera aproximación explota el potencial de aislados nativos del *Bacillus thuringiensis* (Bt) pertenecientes a nuestra colección.

Se seleccionó el cultivo tomate considerando que es una de las principales especies hortícolas cultivadas en Chile, siendo esta especie blanco de una plaga conocida como “polilla del tomate” (*Tuta absoluta*, Lepidoptera Meyrick). Se seleccionaron las cepas nativas de Bt más promisorias a través de ensayos de actividad biológica en condiciones de laboratorio. Si bien la utilización de formulaciones de Bt es una alternativa válida, la aplicación de Bt (cristales y esporas) tiene limitantes debido a la inestabilidad de la toxina es fotosensible y baja persistencia en el medio. En primera instancia, los resultados fueron erráticos, debido a la forma de alimentación de la larva. Ésta se alimenta del mesófilo y toma contacto con la epidermis de la hoja en dos puntos, uno al entrar y otro al salir, disminuyendo así la probabilidad que la larva ingiera la toxina y por ende, disminuye la eficacia del control.

Ambos problemas han sido abordados mediante (a) la transferencia de un gen de la δ -endotoxina de un Bt nativo a bacterias del género *Bacillus* que colonizan naturalmente el filoplano de plantas de tomate. En efecto, dos especies *B. licheniformis* y *B. subtilis* fueron transformadas con un gen *cry1Ab* de Bt. La proteína recombinante fue monitoreada durante el ciclo de crecimiento de la bacteria hospedera. El transgen fue expresado, ejerciendo la acción insecticida *in situ* por tiempos controlables. (b) El problema del hábito alimenticio de las larvas está siendo abordado mediante (i) la generación de plantas transgénicas mediante la transferencia de genes de δ -endotoxinas,

dirigiendo la expresión de mediante la utilización de un promotor específico para mesófilo. Se pretende además, incorporar un gen de una quitinasa que potencie el efecto de la toxina de Bt (ii) una segunda aproximación se apoya en la generación de plantas resistentes mediante la expresión combinada de un gen híbrido en cloroplastos, para la producción de formas de proteínas Cry1.

En el área de biopesticidas, se estudia también un segundo tema relacionado con la generación de resistencia al ataque del pulgón verde del duraznero (*Myzus persicae persicae*) mediante péptidos antibióticos. *Myzus persicae* es viable gracias a un endosimbionte perteneciente al género *Buchnera*, bacteria emparentada con *E. coli*. Se ensayaron tres péptidos antibacterianos (indolicidina, magainina II y cecropina P1) mediante el análisis de supervivencia de *Myzus persicae* a diferentes dosis. Se seleccionó indolicidina, sintetizándose el gen de este antibiótico a partir de oligonucleótidos sintéticos. Se construyeron dos vectores para la expresión del gen de indolicidina en *Arabidopsis*. El primero para la expresión del gen de indolicidina bajo el control del promotor CaMV 35S y el segundo, para la expresión restringida a tejido floemático, bajo el control del promotor CoYMV. Los resultados preliminares sugieren que indolicidina reduce la sobrevivencia de *Myzus persicae* afectando su endosimbionte.

Tolerancia a la salinidad en cítricos.

Patricio Arce-Johnson y Ximena Alvaréz.

P. Universidad Católica de Chile (parce@bio.puc.cl), Departamento de Genética Molecular y Microbiología.

Los cítricos son especies que pueden crecer en condiciones semiáridas bajo condiciones de irrigación controlada. Sin embargo, estas especies presentan baja tolerancia a suelos salinos. Para incrementar las áreas cultivadas en zonas semiáridas de Chile con estas especies, es fundamental contar con variedades de mayor tolerancia a la sal, dado los altos niveles de algunos iones en estos suelos. Por ello, se evaluó la tolerancia a NaCl y B bajo condiciones *in vitro*, en los portainjertos de cítricos, C-35 citrange, Citrumelo Swingle y Rubidoux. Los parámetros evaluados fueron altura de planta, número y largo de raíces, brotes secundarios y daño foliar. Para NaCl se evaluaron las concentraciones 50, 100, 150 y 200 mM. El largo de las raíces fue el parámetro más sensible y permitió discriminar a C-35 con una mayor tolerancia frente a Citrumelo y Rubidoux. Para B se evaluaron concentraciones de 1.08 a 4.32 mg/l en los tres patrones. En estas condiciones experimentales, altos contenidos de B en el medio no evidenciaron daño en ninguno de los portainjertos de cítricos. Concentraciones mayores de 6.50, 8.67 y 13.01 mg/l para B se evaluaron en C-35 sin mostrar efectos deletéreos en las condiciones evaluadas. Al cultivar explantes en altas concentraciones de NaCl y B en el medio de cultivo, se observó un dramático efecto en quemadura de hojas, indicando una acción sinérgica en el daño ejercido.

Para incrementar la tolerancia a sales en cítricos, se está implementando un programa de transformación genética que permita introducir genes foráneos con el propósito de incrementar la tolerancia a la salinidad. Para el patrón de cítricos C-35 citrange, utilizando como explantes segmentos de epicotilos y secciones de entrenudos, se ha conseguido seleccionar explantes tolerantes a antibiótico, los que están siendo evaluados respecto de la presencia y expresión del transgén.

Agradecimientos: ASOEX, FDF e INNOVA CHILE Proyecto 204-4037

Aclimatación a Bajas Temperaturas y la Sobre-Expresión de Factores de Transcripción (CBFs/DREBs) de *Arabidopsis* Aumentan la Tolerancia a Heladas en Papas

Maria-Teresa Pino^{1,3}, Zoran Jeknić^{1,2}, Jeffrey S. Skinner^{1,2}, Eun-Jun Park¹, Patrick M. Hayes², and *Tony H.H. Chen¹

¹*Department of Horticulture, ALS 4017, Oregon State University, Corvallis, OR 97331, USA*

²*Department of Crop and Soil Science, Oregon State University, Corvallis, OR 97331, USA*

³*Departamento Mejoramiento Genético, INIA-La Platina, Santiago, Chile.*

En plantas, la aclimatación a bajas temperaturas es un proceso complejo y poco entendido, que envuelve una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y anatómicos que ocurren en conjunto con un mejoramiento en la capacidad para tolerar heladas. En la última década y gracias a las nuevas herramientas biotecnológicas disponibles, se han logrado importantes avances en esta materia; el descubrimiento de genes asociados a tolerancia al frío y en particular de los factores de transcripción (CBF/DREB) de *Arabidopsis* despiertan grandes expectativas. Los CBF/DREB son FT que regulan la expresión de varios genes regulados por el frío (genes COR) en respuesta a bajas temperaturas, conduciendo a un subsiguiente incremento en tolerancia a heladas. En el presente trabajo se introducirá la forma de acción de los CBF/DREB y se darán a conocer algunos resultados de la sobre-expresión de estos FT en *Solanum commersonii* Dun. y *Solanum tuberosum*, las cuales fueron transformadas mediante el método de *Agrobacterium* con los FT *AtCBF1*, *AtCBF2* y *AtCBF3*. Plantas de ambas especies sobre-expresando *AtCBF1* en forma constitutiva mejoraron significativamente su tolerancia a heladas, incluso sin un periodo previo de aclimatación al frío. En conjunto y paralelamente al incremento en la tolerancia a heladas, líneas *S. commersonii* transgénicas sobreexpresando *AtCBF1* en forma constitutiva mostraron cambios bioquímicos, fisiológicos y anatómicos, comúnmente asociados tanto al fenómeno de aclimatación como a la tolerancia a heladas, entre los cuales destacan incremento de osmo protectores (azúcares, prolina), cambios en los parámetros fotosintéticos, pigmentos y cambios en la ultraestructura de la hoja. Sin embargo, la expresión constitutiva de los CBFs estuvo asociada a alteraciones morfológicas y crecimiento retardado, en particular en los primeros estados de desarrollo. Los resultados de otro estudio comparando la sobre-expresión de *AtCBF3* bajo el control de un promotor constitutivo (*35SCaMV*) versus un promotor inducible (*Rd29A*) mostró que plantas expresando el gene bajo el control de un promotor inducible no presentaron alteraciones morfológicas aun cuando incrementaron su tolerancia al frío; asimismo la expresión de *AtCBF3* envolvió la acción de varios genes COR. Por otra parte, líneas de ambas especies sobre-expresando el gene *AtCBF2* no mejoraron significativamente su tolerancia a heladas respecto a plantas control.

Genes para potenciar la tolerancia a estrés abiótico en plantas

Simón Ruiz Lara.

Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca. sruiz@utalca.cl

El estrés salino, las temperaturas bajas y la sequía son los factores abióticos que provocan mayor perjuicio en el crecimiento y desarrollo de las plantas. El incremento en la aridez y salinidad de los suelos tanto por prácticas inadecuadas de irrigación como por factores climáticos diversos, hace que el estudio de los mecanismos de tolerancia que poseen las especies nativas a estos tipos de estrés adquiera especial relevancia.

La planta nativa *Lycopersicon chilense* es una especie silvestre de tomate cuyo hábitat natural es el desierto de Atacama, sitio en el cual está expuesta a severas condiciones de sequía, salinidad y altas fluctuaciones de temperatura. La alta plasticidad fenotípica que presenta esta especie le permite adecuarse a las restricciones impuestas por el medio y la convierte en un interesante modelo para el estudio de los mecanismos de tolerancia al estrés salino que operan en especies glicófitas.

En este trabajo se ha determinado que, luego de un periodo de aclimatación, *L. chilense* activa sus mecanismos de tolerancia al estrés. La aclimatación se traduce en una serie de cambios tanto en la expresión de genes, como en la acumulación de azúcares, modificaciones en la fotosíntesis, cambios en la morfología de la hoja y la ultra estructura celular. Se han identificado una serie de genes que son diferencialmente expresados durante el estrés salino, sequía y temperaturas bajas, los cuales, según los procesos en que participan las proteínas codificadas han sido clasificados en cuatro grupos: genes de respuesta generalizada al estrés, recuperación de homeostasis osmótica-iónica, control de crecimiento-expansión celular y genes que codifican para proteínas de detoxificación de especies reactivas de oxígeno y de reparación de componentes dañados.

cDNAs de genes representativos de los cuatro grupos, han sido clonados en vectores binarios y utilizados para generar plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi y de *Lycopersicon esculentum* var. Money maker. Los efectos fenotípicos de la sobreexpresión de dichos genes y la capacidad para otorgar tolerancia a los diferentes estreses están siendo evaluados.

Financiado por:

Fundación para la Innovación Agraria (FIA), Proyecto Biot-01-A-065.

Programa de Biotecnología en Solanáceas. DIAT-UTALCA.

Centro de investigación en Biotecnología Silvoagropecuaria (CIBS)

Aproximaciones biotecnológicas para mejorar la resistencia de las plantas frente a enfermedades.

Blanca San Segundo.

Departamento de Genética Molecular. Instituto de Biología Molecular de Barcelona. CSIC. Jordi Girona 18, 08034 Barcelona. España.

Las enfermedades producidas por patógenos limitan de manera muy importante la producción de las cosechas. Al mismo tiempo, las prácticas de la agricultura actual que se basan en producciones en grandes extensiones de monocultivos favorecen la aparición de epidemias que son responsables de importantes pérdidas económicas.

El control de las enfermedades producidas por microorganismos en cultivos de interés agronómico puede y debe abordarse cumpliendo diferentes estrategias. La Biotecnología Vegetal, integrada de una manera adecuada con los sistemas de mejora genética tradicionales representa una herramienta de gran utilidad para la obtención de nuevas variedades más resistentes al ataque por patógenos. Las ventajas directas que se derivan de la utilización de variedades transgénicas resistentes a enfermedades incluyen el incremento en la producción y la reducción en el uso de productos químicos en el campo, con el consiguiente beneficio que ello supone en la conservación del medio ambiente y en la reducción de los costes de producción.

En el transcurso de los últimos años se ha recogido una gran cantidad de información acerca de los procesos de defensa naturales de las plantas y se han identificado una colección importante de genes que participan en dichos procesos, o genes de defensa. Para muchos de ellos se ha descrito una actividad antimicrobiana, tanto *in vitro* como *in vivo* (p.e. quitinasas, β -1,3-glucanasas, defensinas o tioninas). El término "antimicrobiano" generalmente se utiliza para definir a cualquier compuesto que destruye o que inhibe el crecimiento de hongos y bacterias. El conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en la respuesta de defensa de las plantas nos proporciona diferentes opciones y estrategias para el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a patógenos. Así, son muchos los ejemplos descritos en la literatura, que muestran que los genes de defensa vegetales son útiles para la obtención de plantas transgénicas mejoradas en sus propiedades de resistencia frente a patógenos (hongos y bacterias, fundamentalmente). Hay que decir aquí también que la protección que confiere un gen de defensa de origen vegetal con actividad antimicrobiana al ser expresado en plantas transgénicas no es completa. Se trata de una protección parcial,

que es efectiva solo frente a un limitado espectro de patógenos. En general, la expresión simultánea de estos genes de defensa, por ejemplo quitinasas junto con β -1,3-glucanasas, tiene un efecto protector superior al que aporta la expresión individual de cada uno de ellos. Hasta la fecha, las estrategias basadas en la utilización de genes que codifican proteínas con actividad antimicrobiana de origen vegetal no han permitido obtener variedades de interés comercial resistentes a patógenos. Muy probablemente, ello se debe a que no se conoce todavía la combinación adecuada, dentro del conjunto de genes que participan en la defensa, que es efectiva para combatir a cada patógeno.

Las estrategias con mejores perspectivas de éxito, más efectivas y duraderas, dirigidas a la protección frente a patógenos mediante la utilización de genes de defensa vegetales residen en la capacidad de poder actuar mediante transformación genética en las vías de señalización que conducen a la activación de la respuesta natural de defensa de la planta. Ello puede conseguirse bien mediante la utilización de genes reguladores, o bien modulando los niveles de las moléculas señalizadoras involucradas en la respuesta de defensa de la planta. En cualquier caso el objetivo final es la activación de la expresión de un conjunto de genes defensa endógenos de la planta. La utilización de esta estrategia requiere no obstante un conocimiento mucho más profundo acerca de las rutas de señalización implicadas en la respuesta de defensa de una planta, así como, de las posibles rutas secundarias que puedan resultar afectadas.

La producción de proteínas o péptidos antimicrobianos no es una estrategia defensiva utilizada exclusivamente por el reino vegetal, ya que se observa también en otros organismos, como animales, incluyendo artrópodos (y en particular insectos), anfibios y mamíferos. *A priori*, cualquier gen de defensa proveniente, bien de una planta o bien de otro organismo, es candidato para ser utilizado como transgén en la mejora genética de plantas.

Hay organismos que representan una buena fuente suministradora de genes antimicrobianos, genes cuyos productos son importantes para la protección de los mismos frente a otros organismos de su entorno. Este es el caso de hongos antagonistas o micoparásitos del suelo (p.e. *Trichoderma* spp.) frecuentemente utilizados como agentes para el control biológico). Estos organismos han evolucionado específicamente para atacar a otros hongos del suelo, pero no a las plantas. El hongo del suelo *Aspergillus giganteus* sintetiza y secreta una proteína de pequeño tamaño, muy

compacta y resistente a proteólisis, a la que se ha denominado proteína AFP (AntiFungal Protein). El gen *afp*, cuando es expresado en plantas transgénicas de arroz confiere protección frente al hongo *Magnaporthe grisea*.

Por otra parte, se sabe que en la respuesta inmune de insectos participan una gran gama de péptidos con actividad antimicrobiana (defensinas, cecropinas). Estos péptidos protegen a los insectos de la acción de los microorganismos que son ingeridos cuando se alimentan de una planta. Las cecropinas son una familia de péptidos de naturaleza básica que se encuentran en la hemolinfa de insectos. Se ha comprobado la capacidad de cecropinas de insectos para inhibir el crecimiento de importantes fitopatógenos. Asimismo, se sabe que plantas de arroz que expresan estos genes son más resistentes a la infección por hongos patógenos.

Un aspecto importante que se desprende de los resultados obtenidos de la utilización de genes de defensa de origen no vegetal que codifican proteínas o péptidos con actividad antimicrobiana, es que la introducción en plantas de este tipo de genes es capaz de conferir un nivel de protección más elevado y frente a un espectro mucho más amplio de patógenos de lo que se observa con la utilización de genes vegetales como transgenes.

Respuestas moleculares del maíz a la sequía.

Montserrat Pagés

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB).

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).18-26 Jordi Girona, 08034, Barcelona, SPAIN

El estrés hídrico es el estrés con más incidencia en las plantas y por lo tanto en la producción agrícola. Las plantas desarrollan mecanismos de respuesta y de tolerancia a la falta de agua y el estudio de estos mecanismos a nivel molecular ha tenido un enorme avance en los últimos años. Se han descrito muchos genes que están regulados por sequía y el análisis de la expresión de estos genes ha revelado la existencia de múltiples vías de transducción de señal entre la percepción de la señal de déficit hídrico y la expresión génica. La hormona vegetal ABA, que es esencial en los procesos del desarrollo de la semilla y en el control de apertura de los estomas, es un elemento clave en el procesamiento de esta respuesta celular al déficit hídrico. Con respecto a la naturaleza de las diversas proteínas inducidas durante el déficit hídrico se está haciendo un esfuerzo para conocer su papel en la tolerancia al estrés. En la embriogénesis tardía, cuando el embrión sufre una deshidratación progresiva y severa, se expresan una serie de genes que están relacionados con la tolerancia a la desecación. El ABA es un prerrequisito para su expresión, aunque los niveles de la hormona en condiciones normales está muy por encima de las condiciones requeridas para su inducción. El gen *rab17* se expresan abundantemente en los embriones maduros del maíz y en tejidos vegetativos en condiciones de estrés osmótico. Hemos analizado la sobreexpresión de la proteína Rab17 en plantas transgénicas con el fin de evaluar su resistencia a sequía y salinidad. Los resultados obtenidos indican una mayor tolerancia de las plantas que sobreexpresan Rab17 al estrés hídrico así como una mejor recuperación de las mismas en condiciones de estrés. La proteína Rab17 es la proteína más fosforilada del embrión de maíz. Nuestros resultados indican un papel importante de Rab17 durante la germinación en condiciones de estrés osmótico así como la importancia de la fosforilación de dicha proteína por la proteína quinasa CK2 en este proceso, lo que permitirá en un futuro próximo la obtención de plantas mejor adaptadas a terrenos y climas poco aptos para la agricultura.

Referencias

-Riera, M., Figueras, M., Lopez, C., Godoy, A., Pagès, M. (2004) Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein RAB17 from Maize. *Proc Nat Acad Sci. USA*, vol 101, no 26, 9879-9884.

-Gendra, E. Moreno, A. Alba, MM. Pagès M. (2004). Interaction of the plant glycine-rich protein MA16 with a novel nucleolar DEAD box RNA helicase protein from *Zea mays*. *Plant Journal* 38 (6) 875-86.

-Riera, M., Peracchia, G., de Nadal, E., Ariño, J., Pagès, M. (2001) Maize protein kinase CK2: Regulation and functionality of three regulatory subunits. *Plant Journal* 25 (4) 365-374.

-Riera, M., Peracchia, G., Pagès, M. (2001). Distinctive features of plant protein kinase CK2. *Mol. Cell Biochem.* 227, 119-127.

Desarrollo de cultivos tolerantes al estrés ambiental : Oportunidades y desafíos

Eduardo Blumwald

Dept of Plant Sciences, University of California,

Davis, CA 95616, USA

Salinidad y sequía son dos de los mayores estrés abióticos que reducen la productividad agrícola. Altos niveles de salinidad en el suelo y la escasez de recursos hídricos afectan una gran proporción del territorio mundial y la pérdida de tierra arable por la salinización del suelo y la sequía está directamente en conflicto con las necesidades de la población mundial, estimada en crecer en 1,5 billones de personas en los próximos 20 años. Esfuerzos empleados para mejorar el crecimiento de cultivos no han sido muy fructíferos porque los mecanismos básicos que emplean las plantas para tolerar el estrés no están completamente entendidos. Aunque ha habido un suceso relativo con soluciones técnicas para tratar el problema (en particular tratamiento de suelos), las soluciones biológicas han sido más difíciles de desarrollar. El desarrollo de plantas transgénicas, a las cuales se les han introducido nuevos genes o que han sido alteradas para sobre-expresar genes propios, será discutida. Énfasis será puesto en la sobre-expresión de transportadores de iones que hacen posible la reducción del sodio citoplasmático. Además, serán discutidos algunos de los mayores desafíos y oportunidades para incrementar la tolerancia de cultivos al estrés ambiental, tomando salinidad como un caso de estudio.



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	José Miguel
Apellido Paterno	Celedón
Apellido Materno	De Andriaca
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Las Peñas 2867, Prov, Stgo
Fono y Fax	09-658 6808
E-mail	jose-celedon@yahoo.com jceledon@inia.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	INIA
Cargo o actividad que desarrolla	Investigación

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación

José Miguel Celedón



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	Luis Ignacio
Apellido Paterno	Morones
Apellido Materno	Fuentealba.
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Esmeralda 546, Chullín, VIII Reg.
Fono y Fax	208936 (Fax) 232378
E-mail	luisimorones@udec.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	Facultad de Economía Universidad de Concepción.
Cargo o actividad que desarrolla	Alumno Post-grado

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	ANA
Apellido Paterno	MERCADO
Apellido Materno	SEGUEL
RUT personal	
Dirección, comuna y región	AV. ESPAÑA 1680. VALPARAISO
Fono y Fax	08-3613446
E-mail	ana.mercado@usm.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	CENTRO de Biotecnología UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA.
Cargo o actividad que desarrolla	Post-Doctorado

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	Débora
Apellido Paterno	Véliz
Apellido Materno	Vallejos
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Julio Puga #1094 Valdivia X Región
Fono y Fax	(09)8642906
E-mail	apis_dvv@yahoo.es
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	Universidad Austral de Chile
Cargo o actividad que desarrolla	Asistente de investigación

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	Jorge Luis
Apellido Paterno	Pérez
Apellido Materno	DÍAZ
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Pedro de Valdivia 1680 Valdivia X.R.
Fono y Fax	09-3740451 - 63-254021
E-mail	jperezd@hotmail.com
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	Universidad Austral de Chile
Cargo o actividad que desarrolla	Asistente Investigación

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación

Jorge Pérez D.



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	Lorena
Apellido Paterno	Pizarro
Apellido Materno	Ancos
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Manuel Montt 2299. Depto SOS. Santiago. RM.
Fono y Fax	4539954
E-mail	lorebh@utr.net
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	Universi. de Chile Facultad de Ciencias
Cargo o actividad que desarrolla	estudiante

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	ELENA
Apellido Paterno	BARINDELLI
Apellido Materno	PIZARRO
RUT personal	
Dirección, comuna y región	PJE. FILADOR 1087, MAIPÚ, R.M.
Fono y Fax	08.28844-11
E-mail	elena.barindelli@gmail.com
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	Laboratorio de Bioquímica Vegetal) fitoremediación - USACH -
Cargo o actividad que desarrolla	Tesista.

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	Gonzalo Vera
Apellido Paterno	VERA
Apellido Materno	JUNO SCHANN
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Los Quilleyes #484-B, La Florida, Stgo
Fono y Fax	08-6623478
E-mail	gonzalo.vera.j@gmail.com
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	USACH
Cargo o actividad que desarrolla	Tesista

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación

[Handwritten signature]



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	MARITZA
Apellido Paterno	BERTI
Apellido Materno	DÍAZ
RUT personal	
Dirección, comuna y región	SEGUNDA TRANSVERSAL 5847 - SULL
Fono y Fax	978 5867
E-mail	mberti@uchile.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS U. de Chile
Cargo o actividad que desarrolla	INVESTIGADOR, DOCTORANTE.

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	DAVID
Apellido Paterno	Contreras
Apellido Materno	PEZOA
RUT personal	
Dirección, comuna y región	SANZ no 40, Est. Central Santiago
Fono y Fax	09-7192019
E-mail	DCONTRERASP@GMAIL.COM
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	UNIVERSIDAD DE CHILE
Cargo o actividad que desarrolla	Estudiante.

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	JAVIERA
Apellido Paterno	Gonzalez
Apellido Materno	Cruz
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Portugal 71 Dpto 205 Stgo RM
Fono y Fax	724 3060
E-mail	javigonz@uchile.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	Universidad de Chile Fac. Ciencias Agronomicas
Cargo o actividad que desarrolla	Alumna Doctorado

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

"Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas"

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	José Tomás Matos
Apellido Paterno	Matos
Apellido Materno	Picero
RUT personal	
Dirección, comuna y región	CARLOS ANTONIO 2375 D46 PROVIDENCIA, STGO.
Fono y Fax	56-2-6862579 09-6134556
E-mail	jtmatos@puc.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	Lab Bioquímica, Facultad Ciencias Biológicas y Facultad Agronomía PUC
Cargo o actividad que desarrolla	Estudiante Doctorado

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	PAOLA
Apellido Paterno	CANÓN
Apellido Materno	GUIDETTI
RUT personal	
Dirección, comuna y región	LAS DAWAS 2650 DEPTO 307, PROVIDENCIA SANTIAGO.
Fono y Fax	686 2579 /
E-mail	pcanong@uc.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	Pontificia Universidad Católica de Chile
Cargo o actividad que desarrolla	Estudiante de Doctorado

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	XIMENA
Apellido Paterno	ALVAREZ
Apellido Materno	GERDING
RUT personal	
Dirección, comuna y región	MANUEL ANTONIO MAIRA 987 D. 504, PROVIDENCIA, STGO, RM
Fono y Fax	02-4749904
E-mail	xaa@vare@uc.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	P.U.C., FAC. AGRONOMIA
Cargo o actividad que desarrolla	ESTUDIANTE DOCTORADO

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	CATALINA
Apellido Paterno	RADRIGÁN
Apellido Materno	NAVARRO
RUT personal	
Dirección, comuna y región	BROWN NORTE 1679 PROVIDENCIA, STGO. R. T.
Fono y Fax	3415933
E-mail	cradriagn@uc.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	Pontificia Universidad católica de Chile
Cargo o actividad que desarrolla	Alumna Post-grado (magister Ciencias Vegetales)

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	PILAR MACARENA
Apellido Paterno	GIL
Apellido Materno	MONTENEGRO
RUT personal	
Dirección, comuna y región	COSTANERA 130 DEPTO 301 CONCON, VIÑA DEL MAR
Fono y Fax	09-2183056
E-mail	pmgil@puc.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE. INIA LA CRUZ.
Cargo o actividad que desarrolla	ESTUDANTE DOCTORADO.

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	Román Andrés
Apellido Paterno	Pérez
Apellido Materno	Castro
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Doble Alameda 1708
Fono y Fax	(02) 2090694
E-mail	romanbcg@yahoo.com
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	IBIA, La Plata. Aceptado Programa de Do. de U de Talca
Cargo o actividad que desarrolla	Asesoría técnica en investigación

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	ALVARO GONZALO
Apellido Paterno	CASTRO
Apellido Materno	OYARZÚN
RUT personal	
Dirección, comuna y región	SANTA ROSA 1160 LA PLATINA, METROPOLITANA.
Fono y Fax	75 75 129
E-mail	biondi@gmail.com
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	INVA LA PLATINA.
Cargo o actividad que desarrolla	INVERTIDOR ASOCIADO.

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	Gabriela Millaray
Apellido Paterno	Rojas
Apellido Materno	Rojas
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Doble Almeyda 5484 Tucnoa Santiago
Fono y Fax	2269412 - 3952205
E-mail	rojas-gaby-@hotmail.com
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	INIA - CRI La Platina
Cargo o actividad que desarrolla	Alumna Testa

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	Carolina Araya Mandujano
Apellido Paterno	Araya
Apellido Materno	Mandujano
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Soaquin del Pino 692, El Bosque. EM
Fono y Fax	5286869
E-mail	carolina.arayam@gmail.com
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	INIA, La Platina
Cargo o actividad que desarrolla	Tesista.

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	Mariela
Apellido Paterno	Huichalef
Apellido Materno	Carbonell
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Dr. Johow 775 depto 205-B Ñuñoa
Fono y Fax	02-2375880
E-mail	mhuichalef@gmail.com
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	Universidad de Chile Facultad de Ciencias
Cargo o actividad que desarrolla	Estudiante

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación

M. Huichalef



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	Carolina
Apellido Paterno	Espinoza
Apellido Materno	Contreras
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Zueich sur #01150, San Gabriel Región Peta
Fono y Fax	02-52323509
E-mail	callolli@hotmail.com
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	INIA, LA PLATINA
Cargo o actividad que desarrolla	ESTUDIANTE, TESISISTA

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	Carlos
Apellido Paterno	Aguirre
Apellido Materno	Dumenez
RUT personal	
Dirección, comuna y región	LIRA 132 D.202 Santiago
Fono y Fax	6336425
E-mail	c.aguirre@terra.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	MIA la Plotina
Cargo o actividad que desarrolla	Investigador

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	Felipe Gonzalo
Apellido Paterno	GAINZA
Apellido Materno	CONTES
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Americo Vespucio 4115, MACUL, METROPOLITANA
Fono y Fax	2214886 - 086255228 FAX: 4686977
E-mail	Felipe - GAINZA@Y21100.COM
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	INIA - LA PLATA, CHILE
Cargo o actividad que desarrolla	INVESTIGADOR

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	JOSE RICARDO
Apellido Paterno	PEREZ
Apellido Materno	DUAZ
RUT personal	
Dirección, comuna y región	ISLA TEJA SYN VALDIVIA X REGION
Fono y Fax	63- 22 12 33
E-mail	JRPEREZD@GMAIL.COM
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	UNIVERSIDAD AUSTRAL
Cargo o actividad que desarrolla	

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCION

Nombre	Carolina
Apellido Paterno	Folch
Apellido Materno	Paiva
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Ruta 5 Sur Norte Km 8 Osorno
Fono y Fax	(64) 233515. (64) 233746: FAX
E-mail	
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	INIA- Bomelue
Cargo o actividad que desarrolla	Asistente de investigación

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	ADRIANA DEL CARMEN
Apellido Paterno	BASTÍAS
Apellido Materno	BARRIENTOS
RUT personal	
Dirección, comuna y región	Schubert 1950, OSORNO, X
Fono y Fax	09 0073693
E-mail	NANNA.BASTAS@PA400.COM
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	UNIVERSIDAD AUSTRAL
Cargo o actividad que desarrolla	

Por favor marque con una cruz si recibe beca de



Alojamiento, Movilización y alimentación

Bastías



SIMPOSIO

“Mecanismos moleculares de la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas”

FICHA DE INSCRIPCIÓN

Nombre	MÓNICA
Apellido Paterno	MATHIAS
Apellido Materno	RAMWELL
RUT personal	
Dirección, comuna y región	MACKENNA 1566 depto 3 OSORNÓ x REGIÓN
Fono y Fax	(64) 233515 (64) 237746
E-mail	mmathias@unia.cl
Nombre de la organización, universidad donde trabaja	INIA - REMENUE
Cargo o actividad que desarrolla	ASISTENTE INVESTIGACION ÁREA BIOTECNOLOGIA

Por favor marque con una cruz si recibe beca de

Alojamiento, Movilización y alimentación

Mónica Mathias



**XXVIII REUNION ANUAL DE LA
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR DE
CHILE**

**9 - 12 de Enero de 2006
TALCA
CHILE**

17:15 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO EN LA ARGINASA TIPO I: MUTACIONES DE LIGANDOS PARA EL GRUPO CARBOXILO DE LA ARGININA (Substrate specificity of human arginase I: mutations of ligands to the arginine carboxyl group) Orellana M^a Soledad, Alarcón R, Neira B, Carvajal N, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Biológicas, Universidad de Concepción.

17:30-18:00

CAFÉ

8:00-20:00

SIMPOSIO

SIMPOSIO BASES MOLECULARES Y FISIOLÓGICAS DE LA RESPUESTA A ESTRÉS
COORDINADOR: Dr. Simón Ruiz

18:00 Dra. Blanca San Segundo. Departamento de Genética Molecular. Instituto de Biología Molecular de Barcelona. CSIC. Jordi Girona 18, 08034 Barcelona. España. **MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE A PATÓGENOS.**

18:30 Dr. Hugo Peña-Cortés¹ Alvaro Cuadros¹, Ingrid Ramírez¹, Manuel Pinto², Thomas Fichet², Alejandro Riquelme², Patricio Hinrichsen³, Humberto Prieto³, Marlene Rosales³, Enrique González⁴ and Simón Ruiz⁴. ¹Centro de Biotecnología, UTFSM, Valparaíso, Chile. ²Universidad de Chile, Santiago, Chile. ³Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Platina, Santiago, Chile. ⁴Universidad de Talca, Talca, Chile. **PROYECTO DE DESARROLLO DE LA GENÓMICA FUNCIONAL EN CHILE: ETAPA I VID (DEGECHIVID): USO DE ESTS Y MACROARREGLOS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE GENES Y RUTAS METABÓLICAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DEL FRUTO Y MECANISMOS DE DEFENSA CONTRA *Botrytis cinerea*.**

19:00 Dr. Eduardo Blumwald. Dept of Plant Sciences, University of California, Davis, CA, USA. **REGULACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DEL ANTI-TRANSPORTADOR VACUOLAR DE NA⁺/H⁺, ATNHX1, DE *Arabidopsis thaliana*.**

19:30 Dra. Montserrat Pagés. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB) Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).18-26 Jordi Girona, 08034, Barcelona, SPAIN. **REGULACIÓN DE GENES INDUCIDOS EN RESPUESTA AL ABA Y AL ESTRÉS HIDRICO EN EL MAÍZ.**

20:15-21:15

CONFERENCIA Dr. OSVALDO CORI

TRAVESIA DE UNA INVESTIGACION BIOQUIMICA: DE LAS PLANTAS AL HOMBRE

Dra. M. Antonieta Valenzuela

Laboratorio de Bioquímica Dr. Osvaldo Cori, Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas, Universidad de Chile.

PRESENTA: Dr. Rafael Vicuña

21:15

CENA/FIESTA

ISSN 0016-5301

GAYANA BOTANICA®

VOLUMEN 63

SUPLEMENTO

2006

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION - CHILE

XVII REUNION DE LA SOCIEDAD DE BOTANICA DE CHILE



Talca, 16 al 20 de enero de 2006

ORGANO OFICIAL DE LA SOCIEDAD BOTANICA DE CHILE

SIMPOSIO 3

MECANISMOS MOLECULARES EN RESPUESTAS A ESTRÉS EN PLANTAS

Organizadores: Simón Ruiz y José Casaretto

Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca

RESPUESTAS MOLECULARES DEL MAÍZ A LA SEQUÍA (Molecular responses in maize to drought). Pagés, M. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, España.

El estrés hídrico es el estrés con más incidencia en las plantas y en la producción agrícola. Las plantas desarrollan mecanismos de respuesta y de tolerancia a la falta de agua y el estudio de éstos a nivel molecular ha tenido un enorme avance los últimos años. La fitohormona ABA, que es esencial en el desarrollo de la semilla y control de apertura de los estomas, es un elemento clave en el procesamiento de la respuesta celular al déficit hídrico. En la embriogénesis tardía, cuando el embrión sufre una deshidratación progresiva y severa, se expresan genes que están relacionados con la tolerancia a la desecación, siendo ABA un prerequisite para su expresión. El gen *rab17* se expresa abundantemente en los embriones maduros del maíz y en tejidos vegetativos en condiciones de estrés osmótico. Sobreexpresión de *rab17* en plantas transgénicas indican una mayor tolerancia de las plantas al estrés hídrico, así como una mejor recuperación de las mismas en condiciones de estrés. La proteína Rab17 es la proteína más fosforilada del embrión de maíz. Nuestros resultados indican un papel importante de Rab17 durante la germinación en condiciones de estrés osmótico así como la importancia de la fosforilación de dicha proteína por la proteína quinasa CK2. Esto permitirá la obtención de plantas mejor adaptadas a terrenos y climas poco aptos para la agricultura.

MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE A PATÓGENOS (Plant defense mechanisms against pathogens) San Segundo, B. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Biología Molecular de Barcelona. CSIC, Barcelona, España.

Para contrarrestar el ataque de organismos patogénicos, las plantas cuentan con una amplia gama de respuestas de defensa. En muchos casos, las plantas no son susceptibles al ataque de patógenos gracias a una resistencia basal. Este es un proceso complejo, no específico y duradero en el cual participan defensas constitutivas e inducibles, el que se desencadena tras el reconocimiento de patrones moleculares asociados al patógeno y está asociado a la expresión de genes de defensa. En otros casos, la resistencia es específica y depende del reconocimiento de un gen de avirulencia del patógeno por el producto de un gen de resistencia de la planta. Múltiples vías de señalización conducen a la activación de respuestas de defensa. La primera línea de defensa ocurre en células próximas al patógeno (cambios del flujo de iones en membranas, generación de especies reactivas de oxígeno y fosforilación de proteínas). Estas respuestas locales pueden llevar a una muerte celular rápida que detiene la expansión del patógeno. Una segunda línea de defensa implica cambios metabólicos dirigidos hacia el reforzamiento de la pared celular, la activación del metabolismo secundario para la síntesis de fitoalexinas, proteínas con actividad antimicrobiana o moléculas señales de que activan defensas a nivel sistémico. Las vías de respuesta están caracterizadas por señales específicas para la regulación de la expresión de genes como el ácido salicílico, ácido jasmónico, ácido abscísico o etileno. Oxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, sistemina, sacarosa, y más recientemente los lípidos, se encuentran asimismo implicados en la activación de las respuestas de defensa.

DESCIFRANDO LOS MECANISMOS MOLECULARES QUE REGULAN LA POLARIDAD CELULAR Y LA UBICACIÓN DE ORGANELOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PLANTA Y FRENTE A ESTÍMULOS AMBIENTALES COMO LA LUZ (Deciphering the mechanisms that regulate cell polarity and organelle positioning during development and in response to environmental stimuli). Meisel, L., Tejos, R., Mora-



**XXVIII REUNION ANUAL DE LA
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR DE
CHILE**

**9 - 12 de Enero de 2006
TALCA
CHILE**

involucra un mecanismo redox, que podría ser secundario a la inducción de genes trazadores de acción tiroidea (mGPDH y ANT 2) que generan estrés oxidativo, los cuales son gatillados por complejos hormona-receptor que interactúan con elementos de respuesta a T3 o por factores intermedarios activados por T3.

Financiado por FONDECYT 1030499 y FONDECYT 1050131.

PERFIL DE ENERGIA LIBRE Y DE POTENCIAL ELECTROSTATICO EN EL VESTIBULO INTRACELULAR DE LOS CANALES DE K⁺ DEPENDIENTES DE VOLTAJE. (Free energy and electrostatic potential profile in the inner vestibule of voltage gated potassium channels). González W§, Berneche S‡, Latorre R*, González-Nilo FD§. §Centro de Bioinformática y Simulación Molecular, Universidad de Talca, ‡ Structural Biology Division, Biozentrum, University of Basel, Switzerland, *Centro de Estudios Científicos (CECS), Valdivia.

Los canales de K⁺ dependientes de voltaje, a pesar de tener un filtro de selectividad muy conservado que permite discriminar Na⁺ por sobre K⁺, presentan diferentes escalas de conductancia. Se ha observado que al mutar las cargas E321(N) y E324(N), emplazadas en el vestibulo intracelular de hSlo, un canal de alta conductancia, ésta se reduce a la mitad. En cambio, en la doble mutante D261N-E264Q del vestibulo extracelular de hSlo no se observan cambios significativos en la conductancia (González-Nilo y cols., Biophysical Society Meeting, Long Beach, USA, 2005). Estas variaciones en la conductividad de las mutantes se han asociado con cambios en el potencial electrostático. También se postula que los diferentes valores de conductancia de los canales de K⁺ están determinados por la distribución de estos iones en ambos vestibulos. Para comprobar la hipótesis anterior, se construyó un modelo por homología de hSlo basado en la estructura cristalina de Kv1.2 (Long y cols Science 309; 897-903, 2005) y MthK. Usando Potencial Mean Force (PMF) se calculó el perfil de energía libre de un ion de K⁺ en la posición S4 saliendo por el vestibulo intracelular de hSlo, de la doble mutante E321N-E324N y del canal Kv1.2. Los resultados indican que en el canal hSlo de alta conductancia hay una mayor afinidad en la posición S4 del vestibulo intracelular respecto a la doble mutante estudiada por Brelidze y cols. (PNAS 100; 9017-9022, 2005) y al canal de baja conductancia Kv1.2. Financiado por Fondecyt 1040254.

REGULACION POR HEMO DE UNA GLUTAMIL-tRNA SINTETASA EN *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (A GluRS that is regulated by heme). De Armas M, Levicán G, Katz A, Orellana O. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

La glutamil-tRNA sintetasa (GluRS) cataliza la formación de glutamil-tRNA (Glu-tRNA), que es sustrato común de la biosíntesis de proteínas y de tetrapirroles (hemo, clorofila y otros) por la vía C5. Esta última vía, comienza con la reducción del glutamato del Glu-tRNA a glutamato semialdehído por la glutamil-tRNA reductasa (GluTR), que se considera la primera enzima de la formación de ácido δ -amino levulinico, el precursor universal de la biosíntesis de tetrapirroles.

En *Acidithiobacillus ferrooxidans* una bacteria acidófila que participa en la biolixiviación de minerales, los niveles intracelulares de hemo, varían considerablemente dependiendo de las condiciones de cultivo. En condiciones en que se eleva la concentración intracelular de hemo, se observa una disminución del contenido de GluTR y una inactivación reversible y específica de la actividad de la GluRS1, una de las dos GluRS de este microorganismo. La actividad de la GluRS1 recombinante se inhibe por hemo, un análogo de hemo y esta inhibición se revierte por NADPH. Esto resultados indican

que las funciones de la GluRS y la GluTR se regulan coordinadamente por el contenido de hemo y que en *A. ferrooxidans*, la GluRS es la primera enzima en la biosíntesis de hemo.

Financiado por Fondecyt (1020087), Universidad de Chile y DAAD.

ESTUDIOS DEL ESTADO DE OLIGOMERIZACION DE FICOBILIPROTEINAS POR HERRAMIENTAS BIO-INFORMATICAS (Studies of the oligomerisation state of Phycobiliprotein by bioinformatics tools). Martínez-Oyanedel J, Sepúlveda J, Cabrera JR, Burgos F, Figueroa M, Bunster M. Laboratorio Biofísica Molecular. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción

Los ficobilisomas son complejos proteicos encargados de la captación y conducción de la luz en algas rojas y cianobacterias. En *Gracilaria chilensis* estos ficobilisomas están formados por: Ficoeritrina (PE), Ficocianina (PC) y Aloficocianina (APC), cuya unidad básica es un heterodímero ($\alpha\beta$). Las secuencias y las estructuras terciarias de ambas subunidades en las tres proteínas son muy semejantes, como hemos demostrado al resolver las estructuras tridimensionales de Ficoeritrina y Ficocianina por difracción de rayos-X (1eyx, 2bv8). La unidad funcional para Ficoeritrina y Ficocianina, en todas las estructuras cristalinas resueltas, corresponde a un hexámero del heterodímero, sin embargo Aloficocianina se presenta solo como un trímero del heterodímero.

En el presente estudio mediante herramientas bioinformáticas y análisis estructural se revisaron los residuos involucrados en las superficies de interacción en Ficocianina y Ficoeritrina, con el objeto de encontrar los patrones conservados en secuencia, potenciales electrostáticos y residuos vecinos. La comparación de los patrones de hexámeros y trímeros nos permitieron encontrar las diferencias que causarían la diferencia en el estado de oligomerización entre las ficobiliproteínas.

Estas diferencias están siendo analizadas por estudios de docking molecular de mutantes, *in silico*, de PC para tratar de inducir la hexamerización de la Aloficocianina.

Financiamiento Proyecto DIUC 205.037.002-1, DIUC 205.037.004-1.

ANALISIS DE LA EXPRESION DE GENES PARA PROTEINAS DE FOTOSISTEMAS EN PLANTAS DE *Lycopersicon chilense* EXPUESTAS A BAJAS TEMPERATURAS. (Expression analysis of genes encoding photosystems proteins in cold-stressed *Lycopersicon chilense* plants). Chilian RJ, Poblete F, González E. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca.

Cuando las plantas son expuestas al efecto combinado de bajas temperaturas y altas intensidades lumínicas se produce una sobreexcitación del aparato fotosintético que conduce a la producción y acumulación de radicales libres, generando estrés oxidativo. La disipación del exceso de energía en forma de calor (NPO) es uno de los más importantes mecanismos protectores frente a este tipo de estrés, participando activamente en este proceso proteínas de la superfamilia LHC.

Para el estudio de los mecanismos genético-moleculares involucrados en la respuesta de NPQ se ha seleccionado como modelo a la planta nativa *Lycopersicon chilense*, tanto debido a que ella posee un alto grado de adaptación a diversos factores medioambientales que propician estrés oxidativo como a su cercanía filogenética con otras solanáceas cultivables lo que ofrece la posibilidad de desarrollar estrategias para la obtención de plantas tolerantes a estrés oxidativo. La expresión de genes de la superfamilia LHC ha



**XXVIII REUNION ANUAL DE LA
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR DE
CHILE**

9 - 12 de Enero de 2006
TALCA
CHILE

RIBOZIMAS DE HORQUILLA Y MARTILLO INACTIVAN EL mRNA DE LA DESHIDROGENASA ALDEHÍDICA MITOCONDRIAL (ALDH2) DE RATA: HACIA UNA TERAPIA GÉNICA PARA EL ALCOHOLISMO (Hairpin and hammerhead ribozymes silence the mRNA for rat mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) towards gene therapy for alcoholism) Lobos L^{1,2}, Muñoz C², Israel Y², Sapag A². ¹Programa de Magister en Bioquímica, ²Laboratorio de Farmacoterapia Génica, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Un tratamiento farmacológico habitual para el alcoholismo es generar una aversión al consumo de alcohol con disulfiram. Este fármaco inactiva eficazmente la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2), enzima que participa en el metabolismo del etanol, pero es muy tóxico. Una alternativa farmacológica es imitar el efecto del disulfiram inactivando el mRNA de la ALDH2 con ribozimas, RNAs catalíticas pequeños capaces de disminuir la síntesis proteica por ocupación o degradación del mRNA.

Se ensayaron ribozimas de horquilla y martillo dirigidas hacia un mismo blanco del mRNA de la ALDH2 en células de hepatoma de rata en cultivo. Se lipofectaron células H4-II-E-C3 con plásmidos portadores de genes de ribozimas y se midió la actividad de la ALDH2 espectrofotométricamente en extractos celulares. Se usaron ribozimas control para determinar posibles efectos de antisentido. La ribozima de horquilla disminuyó en 42% (p<0,005) la actividad de la ALDH2, siendo un 18% adjudicable a un efecto de antisentido. En cambio, la ribozima de martillo redujo en 20% la actividad de la ALDH2 exclusivamente por acción de antisentido.

Una ribozima de horquilla dirigida a los nucleótidos 1553 a 1571 del mRNA de la ALDH2 de rata es un buen candidato para experimentos *in vivo* enfocados hacia el desarrollo de un fármaco génico para el alcoholismo.

Beca Universidad de Chile PG06504, Iniciativa Científica Milenio P99 031F, FONDECYT 1040555.

ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN CODIFICANTE DEL TRANSPORTADOR DE YODO DE LA TIROIDES DEL ROEDOR *Aulyscomis boliviensis* DEL ALTIPLANO ANDINO. (Isolation and characterization of the coding gene for the iodide symporter of the *Aulyscomis boliviensis* Thyroid from the Andes highland) Arriagada A¹, Navarro C, Valdés C, Valenzuela M², Cabello G², Molina A², Gompert B³, Riedel C¹. ¹Universidad Andrés Bello, ²Universidad de Tarapacá, ³University Collage London.

El Na⁺/I⁻ symporter (NIS) media el transporte activo de yoduro, primer paso en la biosíntesis de las hormonas tiroideas. Mamíferos que habitan ambientes pobres en yodo, como el altiplano de los Andes, desarrollan hipotiroidismo. Sin embargo, el roedor *Aulyscomys boliviensis* que es autóctono de esta zona no es hipotiroideo, a pesar de tener un 40% menos de yoduro en el plasma. Esto sugiere que el transporte de yoduro debería ser más eficiente en esta especie. El presente estudio pretende caracterizar el transportador de yoduro de este roedor e identificar modificaciones en la secuencia aminoacídica que expliquen su adaptación a un ambiente pobre en yodo. Fracciones de membrana de la glándula tiroidea de *A. boliviensis* y del ratón de laboratorio fueron analizadas por Western blot. En *A. boliviensis* el anticuerpo anti-NIS detectó un polipéptido de ~65 kDa y en el ratón se detectó un polipéptido de ~100 kDa. El análisis de la secuenciación parcial del cDNA del roedor mostró un 88% y un 92% de identidad respecto al NIS de ratón en la secuencia nucleotídica y aminoacídica respectivamente. Los tres sitios de glicosilación se encuentran conservados en NIS de *A. boliviensis* y en el COOH terminal de NIS se observaron cambios en algunos residuos de treoninas por alaninas.

Nuestros resultados muestran que la diferencia en el peso molecular aparente de NIS de *A. boliviensis* no se debe a su secuencia aminoacídica. Esta diferencia puede deberse al distinto grado de glicosilación de la molécula. Las diferencias aminoacídicas encontradas y/o el grado de glicosilación podrían conferir a NIS mayor eficiencia para transportar yoduro y de esta manera permitirle a este roedor una mejor adaptación para vivir en un ambiente escaso en yodo.

Proyecto Interno UNAB DI-01-05/R

EL HONGO *Penicillium purpurogenum* SECRETA TRES ISOENZIMAS DE ARABINOFURANOSIDASA. (The fungus *Penicillium purpurogenum* secretes three arabinofuranosidase isoenzymes). Ravanal C¹, Fritz M¹, de Ioannes P², Carvallo M², Braet C^{2,3}, Navarrete M¹, Prades M¹, Eyzaguirre J^{1,2}. ¹Laboratorio de Bioquímica, Departamento Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, Santiago. ²Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago. ³Department of Biochemistry, National University of Ireland, Galway, Irlanda.

El hongo *Penicillium purpurogenum* al crecer separadamente en diversas fuentes de carbono (xilano de avena, coseta de remolacha y coronta de maíz) secreta al medio de cultivo tres arabinofuranosidasas (ABF 1, 2 y 3), que presentan actividad frente a los sustratos artificiales p-nitrofenil α -L arabinofuranósido (pNPAr) y metil umbeliferil α -L arabinofuranósido. Al comparar la producción de ABF total por el hongo en las fuentes de carbono indicadas se observó que el mejor inductor es la coseta de remolacha. Las tres isoenzimas fueron purificadas a homogeneidad y caracterizadas. Los pesos moleculares de las ABFs, determinados por SDS-PAGE, son 58 KDa, 70 KDa y 47,5 KDa, respectivamente. Su punto isoeléctrico, estimado por isoelectroenfoque, es de 6,5, 5,1 y 5,8. La determinación de estructura cuaternaria sugiere que las 3 ABFs son monoméricas. Los parámetros cinéticos frente a pNPAr muestran que la KM para la ABF 2 es de 98,6 μ M, mientras que las KM para ABF1 y 3 son más altas (1,23 mM y 0,65 mM respectivamente). Las temperaturas óptimas para las ABFs 1, 2 y 3 son de 50, 60 y 50 $^{\circ}$ C. El análisis de la estabilidad térmica mostró que la ABF 2 es la enzima más estable de las tres, manteniendo un 50 % de su actividad por 4 horas a 50 $^{\circ}$ C. Las ABFs 2 y 3 actúan sobre sustratos naturales como el arabinano de remolacha y el arabinoxilano, liberando en ambos casos arabinosa, lo que se aprecia por cromatografía en capa fina, y se cuantifica por un método enzimático. La ABF 2 puede actuar sobre arabinano desramificado, no así la ABF 3, indicando que la ABF 3 sólo tiene actividad exo-arabinofuranosidasa. La secuencia aminoacídica de las ABF 1 y 2 muestra que se trata de proteínas producidas por genes diferentes.

Fuentes de financiamiento: FONDECYT, Universidad Andrés Bello y DIPUC.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DURANTE LA ACLIMATACIÓN A ESTRÉS SALINO EN *Lycopersicon chilense*. (Analysis of differential gene expression during salt stress acclimation in *Lycopersicon chilense*). Tapia G, Yañez M, Ruiz-Lara S. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca.

Los efectos de la salinidad en las plantas, junto con los mecanismos de tolerancia que presentan algunos vegetales, han sido aspectos ampliamente estudiados, especialmente en especies halófitas. Sin embargo, dadas las características particulares de este tipo de plantas, aún existen muchas interrogantes por resolver. En este sentido las plantas glicófitas que muestran ciertos niveles de tolerancia a estrés salino

XLVII
REUNIÓN ANUAL DE LA
SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CHILE

XVI REUNIÓN ANUAL DE
LA SOCIEDAD DE BOTÁNICA DE CHILE

23 al 26 de noviembre 2004
Gran Hotel Pucón

SOCIEDADES PARTICIPANTES

Sociedad de Microbiología de Chile

Sociedad de Genética de Chile

Sociedad de Ecología de Chile

DEGECHIVIDb: UNA PLATAFORMA BIOINFORMÁTICA PARA EL ANÁLISIS GENÓMICO EN VIDES. (DEGECHIVIDb: A bioinformatic platform for the genomic analysis in grapevines. ¹Cuadros, A., ²González, D., ¹Peña-Cortés, H. ¹Centro de Biotecnología "Daniel Alkhalay", UTPSM, ²Centro de Bioinformática, Universidad de Talca.

Patrocinante: Hugo Peña-Cortés

El desarrollo de la genómica vegetal y la bioinformática son áreas de desarrollo prioritario en Chile. En el marco de la iniciativa Genoma Chile, se ha establecido la realización del proyecto "plataforma científico-tecnológica para el desarrollo de la genómica de vegetales en Chile", que en su primera etapa contempla la secuenciación de 100.000 ESTs (*expressed sequence tags*) provenientes de diferentes tejidos de los cultivares Thompson seedless (Sultanina) y Carménère con el objetivo de dilucidar procesos fisiológicos involucrados en la formación de semillas, maduración del fruto y respuesta a patógenos. El procesamiento conjunto de estos ESTs y las más de 140.000 secuencias de vides disponibles en las bases de datos públicas, hacen vital el establecimiento de una plataforma bioinformática que permita la realización de análisis genómicos y su integración con datos transcripcionales provenientes de la plataforma de microarreglos generada en este proyecto.

DEGECHIVIDb es una plataforma bioinformática capaz de adquirir automáticamente las secuencias generadas, filtrar la contaminación presente (secuencias bacterianas, vector, rRNA y errores de secuenciación), realizar las tareas de ensamblaje y anotación funcional. Además, se han integrado rutinas bioinformáticas que permiten la reconstrucción de vías metabólicas y de regulación, categorización funcional, selección de clones y diseño de macroarreglos.

Este trabajo ha sido financiado por la Iniciativa Genoma Chile-FONDEF G02P1002.

IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *LCHGDII* EN LA PLANTA NATIVA DE TOMATE *Lycopersicon chilense*. Identification and expression analysis from gene *LchGDII* in the native plant tomato *Lycopersicon chilense*. ^{*}Iván Ahumada-Díaz, Luis Meza-Basso - Simón Ruiz-Lara Patrocinante: Luis Meza-Basso. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. ^{*}Centro de Investigación en Biotecnología Silvo-agrícola. Universidad de Talca-Chile

En el marco del proyecto "Generación de un banco de genes de tolerancia a estrés abiótico obtenidos de plantas nativas, utilizables en programas de mejoramiento genético vía transgénesis de variedades cultivables", hemos aislado mediante la técnica de Differential display, varios genes que se expresan diferencialmente en la planta nativa de tomate *Lycopersicon chilense* sometida a sequía. Utilizando la metodología RACE fue obtenida completamente la secuencia codificante de uno de los genes aislados. La secuencia aminoacídica codificada por esta proteína presentó similitud a proteínas del tipo de las GDP dissociation inhibitor (GDI) de otras especies de plantas. Para determinar el curso de la inducción de la expresión del gen bajo condiciones de sequía, estrés salino y temperaturas bajas, hibridaciones Northern fueron realizadas utilizando una sonda específica correspondiente a la región 3' UTR del gen *LchGDII*. Los resultados mostraron que en las tres condiciones de estrés abiótico, el gen *LchGDII* es activado transcripcionalmente. Sin embargo, se detectó una inducción temprana para temperaturas bajas y acumulación del transcrito en el tiempo en condiciones de sequía y estrés salino. Adicionalmente, se evaluó la respuesta transcripcional del gen a diferentes señales químicas. *LchGDII* es expresado diferencialmente bajo la acción de ABA y etileno.

FINANCIAMIENTO

Fondo de Innovación Agraria (FIA)

Centro de Investigación en Biotecnología Silvoagrícola

"CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE UN GEN TIPO MADS-BOX EN VIDES (*Vitis vinifera*)" (Cloning and sequencing of a MADS-box gene in Grape (*Vitis vinifera*)) Federici, F.; Medina, C.; Arce-Johnson, P. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Los genes homeóticos tipo "MADS box gene" representan una gran familia de factores de transcripción con funciones esenciales durante el proceso de diferenciación y desarrollo en las plantas. El análisis de los mutantes de genes homeóticos ha llevado a postular el modelo ABC, que explicaría cómo la función combinada de tres clases de genes; A, B, y C; determinan la identidad de los cuatro verticilos de órganos florales. En *Arabidopsis*, hay dos genes clase A (*API*, *APETALA 1* y *AP2*, *APETALA 2*), dos de clase B (*PI*, *PISTILLATA* y *AP3*, *APETALA 3*), y un solo gen perteneciente a la clase C (*AG*, *AGAMOUS*). Nosotros hemos clonado un gen tipo MADS-box en vides (*Vitis vinifera* var. Cabernet sauvignon) homólogo a *PISTILLATA* (*VvPI*; *Vitis vinifera PISTILLATA*). *VvPI*, al igual que el resto de los genes de la familia de los MADS-box, contiene los cuatro dominios típicos de los genes MADS: el dominio de la caja MADS, el dominio "Intervening", el dominio de la caja K (Keratin-like) y el dominio C-terminal.

El estudio de este gen podría contribuir al conocimiento de la fisiología de la floración en la vid y, por tanto, al mejoramiento de la productividad de esta especie.

Agradecimientos: Proyecto Fondec G02S1001.



Z
JORNADA de
INVESTIGACION Y
ASISTENCIA TECNICA



UNIVERSIDAD DE
TALCA

**Vicerrectoría Académica
Dirección de Investigación y Asistencia Técnica**

**Segunda Jornada de Investigación
y Asistencia Técnica**

Editor: Dr. Iván Palomo G.

Corrección de textos : María Cecilia Tapia C.
Fotografías : Bárbara Fuentes Yáñez
Diseño Gráfico e Impresión : Impresora Gutenberg®
4 Sur 1185 - Talca

Universidad de Talca
Dirección de Investigación y Asistencia Técnica
2 Norte 685, Talca, Chile
Casillas : 747 - 721
e-mail: diat@utalca.cl
Teléfono: (56-71) 200484; Fax: (56-71) 201563
Talca, Marzo de 2004

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS POR SEQUÍA EN DOS ESPECIES DE *LYCOPERSICON*

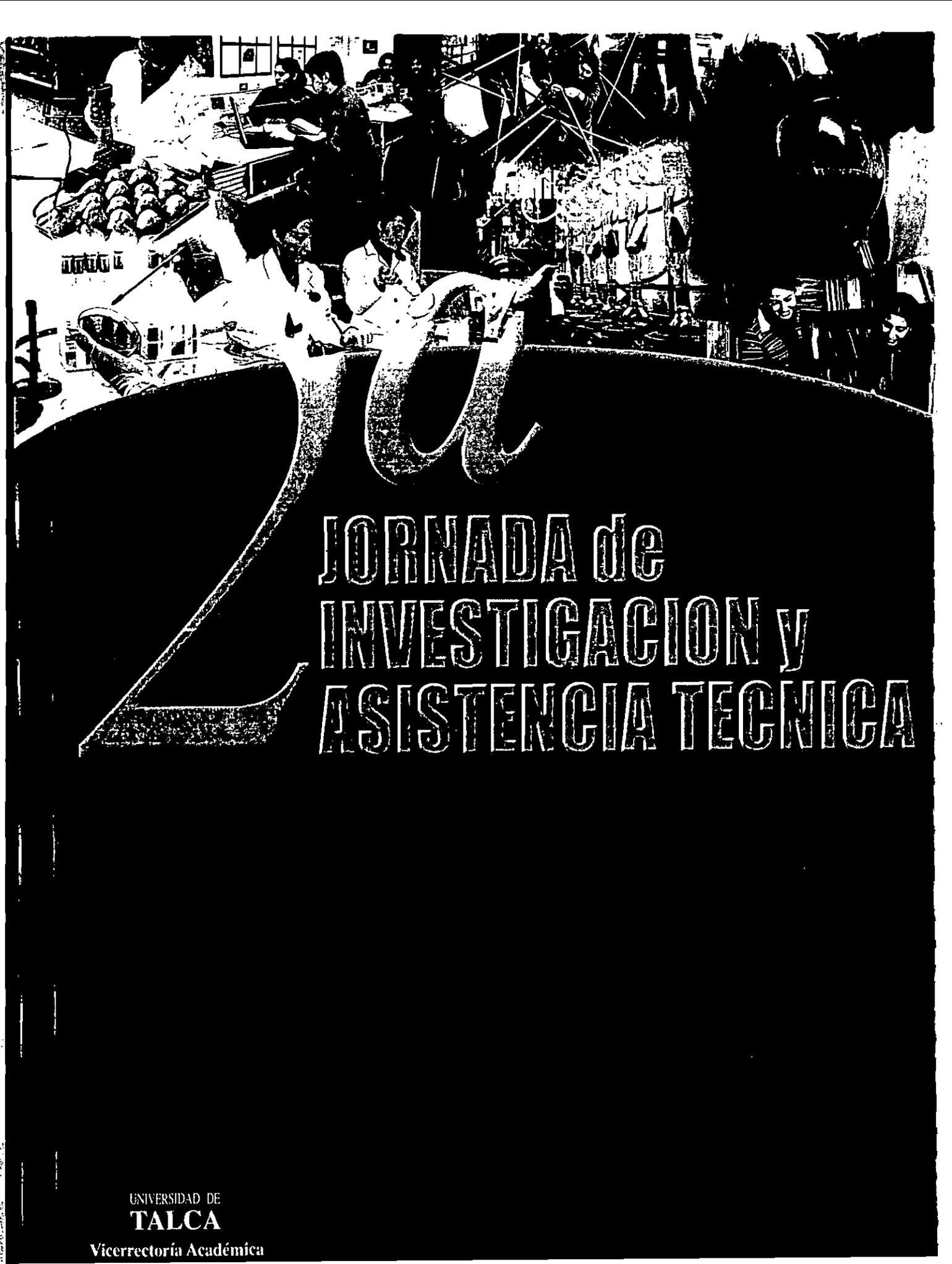
Loyola José Ignacio, Ahumada Díaz Iván, Ruiz Lara Simón. Lab. Biología Celular y Genética; Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca

La sequía corresponde a una condición climática que se caracteriza por la disminución en las precipitaciones de agua lluvia, esta condición tiene un efecto de deshidratación en las plantas, restringiendo su crecimiento, productividad y distribución. La falta de disponibilidad de agua, así como el exceso de luz, generan un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ERO) en los plastidios, siendo responsables de serios daños en las membranas celulares. Diversas especies son capaces de responder a través de mecanismos fisiológicos y genético moleculares a condiciones de estrés oxidativo provocados por la ausencia de agua.

Se evalúa en dos especies de *Lycopersicon*, *L. chilense* una especie de tomate silvestre, que habita en el desierto de Atacama y *L. esculentum*, especie de tomate cultivado, la expresión de genes de la vía metabólica de síntesis de compuestos isoprenoides y se correlacionan, con los niveles de producción de algunos metabolitos de esta vía, en condiciones de riego normal y bajo sequía.

El determinar el rol de estos genes en la tolerancia de este tipo de estrés, permitirán elaborar estrategias biotecnológicas en el mejoramiento de cultivos de importancia económica.

Financiamiento: Centro de Investigaciones en Biotecnología Silvoagrícola, DIAT - UTALCA.



JORNADA de
INVESTIGACION y
ASISTENCIA TECNICA

UNIVERSIDAD DE
TALCA

Vicerrectoría Académica



**Vicerrectoría Académica
Dirección de Investigación y Asistencia Técnica**

**Segunda Jornada de Investigación
y Asistencia Técnica**

Editor: Dr. Iván Palomo G.

Corrección de textos : María Cecilia Tapia C.
Fotografías : Bárbara Fuentes Yáñez
Diseño Gráfico e Impresión : Impresora Gutenberg®
4 Sur 1185 - Talca

Universidad de Talca
Dirección de Investigación y Asistencia Técnica
2 Norte 685, Talca, Chile
Casillas : 747 - 721
e-mail: diat@utalca.cl
Teléfono: (56-71) 200484; Fax: (56-71) 201563
Talca, Marzo de 2004

IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE DURANTE ESTRÉS SALINO EN LA ESPECIE *LYCOPERSICON CHILENSE*

Tapia Gerardo, Yáñez Mónica, Ruiz-Lara Simón.

Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca, Talca, Chile

La salinidad de los suelos es un problema que afecta seriamente la productividad de cultivos agrícolas en nuestro país y en todo el mundo. Esto es provocado por el uso de técnicas de irrigación inadecuadas y la indiscriminada utilización de fertilizantes.

Lycopersicon chilense es una especie silvestre de tomate endémica de Chile, y su distribución natural va desde la primera a la tercera región de nuestro país, desde los 100-3000 m de altitud. En su habitat natural *Lycopersicon chilense* se encuentra sometida a múltiples tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos.

Nuestro trabajo ha estado dirigido al aislamiento e identificación de genes expresados diferencialmente durante estrés salino en la especie *Lycopersicon chilense* mediante la técnica del differential display e hibridación substractiva. Utilizando estas técnicas se han obtenido una serie de genes, entre ellos genes codificantes para una proteína relacionada con patogénesis (PR10), una proteína de transferencia de lípidos (LTP), una tioredoxina y una subunidad de ATPasa cloroplástica. Para corroborar la expresión diferencial de estos genes se han realizado ensayos de hibridación Northern blot a distintos periodos de tiempo de estrés. Las secuencias señales relacionadas con la expresión diferencial de estos genes, así como el rol que cumplen éstos desde el punto de vista funcional se encuentran bajo estudio.

Financiamiento: Centro de investigación en biotecnología silvoagrícola. Programa de investigación en Biotecnología. DIAT-UTALCA FIA BIOT-01-A-065.

PR
Pete
1. In
Cien
La fr
que l
y cer
cual
ocur
A pa
dura
ducti
cial ti
de m
radic
tiene
cialm
tos ca
coste
gión)
3000/
parte
etc.),
para
época
lo que
El ma
tados
nos e
Sub-E
El me
bajo u
divers
chilen
o resis
En el j
Talca
frutilla
mante
calida
ternos
ochoci
manter
práctic
túneles
ra gene
de Chi

Saldo a favor

Satisfechos con los resultados obtenidos hasta el momento están los científicos de la Universidad de Talca involucrados en el proyecto que busca generar un banco de genes de tolerancia a estrés abiótico. Ya han aislado parte importante del material genético comprometido para esta etapa.

L*ycopersicon chilense* no es una planta de tomate común. A pesar de la escasez de agua, el suelo salino y las bajas temperaturas que debe enfrentar en su hábitat a tres mil metros de altura en el Desierto de Atacama, esta especie nativa sobrevive sin mayores sobresaltos gracias a su capacidad para tolerar condiciones abióticas extremas.

“Es una planta que está sometida a estrés en forma natural y no ha desarrollado ninguna estructura anatómica especial para tolerar estas duras condiciones. Si uno la compara con otra planta de tomate, no posee diferencias morfológicas visibles que permitan pensar que ellas son responsables de su tolerancia, lo cual sugiere que esta planta cuenta con mecanismos fisiológicos distintos y en los cuales podrían estar involucrados genes específicos de esta especie”, comenta el doctor Simón Ruiz, investigador del Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología de la Universidad de Talca, y director del proyecto que utiliza a esta planta como modelo de estudio, cuyo objetivo es generar un banco de genes que permita posteriormente el mejoramiento de los cultivos tradicionales chilenos mediante métodos de la biotecnología vegetal (publicado en Bioplanet N°16).

Los científicos intentan descubrir cuáles son los genes que se inducen o se reprimen en respuesta a condiciones de estrés hídrico, salino y por bajas temperaturas.

El proyecto, que comenzó en enero de este año y tiene como fecha de término el mes de octubre de 2005, se denomina “Generación de un banco de genes de tolerancia a estrés abiótico —obtenidos de plantas nati-



El doctor Simón Ruiz explica que la Lycopersicon chilense es una planta que está sometida a estrés en forma natural y no ha desarrollado ninguna estructura anatómica especial para tolerar estas duras condiciones.

vas-utilizables en programas de mejoramiento genético vía transgenosis de variedades cultivables”, es financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y la Universidad de Talca, y cuenta con Bioplanet como agente asociado.

Los científicos intentan descubrir cuáles son los genes que se inducen o se reprimen en respuesta a condiciones de estrés hídrico, salino y por bajas temperaturas. Según lo programado al inicio del proyecto, en la etapa que finaliza en diciembre de este año debían generarse las librerías de expresión y hacer las sustracciones correspondientes para poder aislar genes diferencialmente expresados en condiciones de estrés y en condiciones normales.

“Habíamos comprometido un número importante de cDNAs específicos para cada una de las condiciones de estrés estudiadas y hasta la fecha hemos superado la cantidad establecida para el estrés hídrico, estrés salino y el estrés por bajas temperaturas estamos muy cerca de lo comprometido. Los



cDNAs aislados han sido obtenidos mediante dos tipos de técnicas: Híbridas substractiva mediante la técnica de I Select, que es de un procedimiento bastante delicado, pero muy efectivo; y Difference Display, método bastante conocido y de rutina en muchos laboratorios, que requiere de adecuados controles para evitar al menos los falsos positivos”, explica el investigador.

La recolección de las plantas utilizadas en el estudio se realizó en la Primera Región tanto en el valle de Lluta como en una zona llamada Cactus Candelabros, lo que dio lugar a una importante observación. De acuerdo a la clasificación botánica las plantacogidas en ambos lugares son *Lycopersicon chilense*, sin embargo, luego de experimentar con ellas se descubrió que la variedad Lluta, que habita hasta mil doscientos metros de altura, es mucho más tolerante al estrés salino que las plantas cuyo hábitat

a tres mil metros de altura. Por otro lado, esta última población de plantas es mucho más tolerante al estrés hídrico y de bajas temperaturas que la "variedad" Lluta.

"Si bien estas plantas son morfológicamente muy parecidas, es probable que sean ecotipos distintos. Sin embargo, para asegurar esto es preciso realizar caracterizaciones de sus respectivos perfiles genéticos e identificar marcadores moleculares específicos. De ser ratificadas las observaciones fisiológicas con los resultados genéticos, podríamos estar en presencia de un proceso de generación de dos subespecies dentro de la *Lycopersicon chilense*. Por otra parte, llama la atención la variabilidad existente, ya que incluso hay grandes diferencias dentro de las mismas poblaciones. Por ejemplo, tenemos plantas de la "variedad" Lluta que toleran concentraciones salinas considerablemente más altas que otras de la misma población", detalla el director del proyecto. Basados en estos resultados han decidido utilizar a la «variedad» Lluta como fuente de los genes diferencialmente expresados en respuesta a estrés salino y la "variedad" Candelabro para aislar los genes involucrados en la tolerancia al estrés hídrico y a bajas temperaturas.

El proyecto no sólo permitiría la generación del banco de genes, sino un mejoramiento de la tecnología para poder evaluar la naturaleza de los productos importados por Chile.

El equipo de investigación está integrado por diez personas que trabajan a tiempo completo y que se dividen en tres grupos. El doctor Enrique González, es el subcoordinador de este proyecto y dirige el equipo que trabaja en el aislamiento y caracterización de los genes de tolerancia a bajas temperaturas; el doctor Iván Ahumada dirige la parte de estrés hídrico; mientras el doctor Simón Ruiz lidera el trabajo de estrés salino, tarea que comparte con la dirección del proyecto.

Apuesta genética

Según el doctor Ruiz la *Lycopersicon*

chilense es una planta glicófita (que no presenta características estructurales que le permitan resistir altas concentraciones salinas). Sin embargo, el alto nivel de tolerancia exhibido por esta especie, similar al de las plantas halófitas (resistentes a los ambientes salinos), sugiere que posee mecanismos fisiológicos particulares que son determinados genéticamente. Basado en esta consideración, aparece como más factible que los genes involucrados en la respuesta a estrés que se aislen de esta planta, puedan ser transferidos a plantas heterólogas (papa, tomate, etc.) confiriéndoles similares características de tolerancia a altas concentraciones salinas.

Lo anterior garantiza el cumplimiento de uno de los desafíos de este proyecto que es posibilitar la realización de programas de mejoramiento genético de variedades cultivables, mediante el uso de la transgénesis, técnica biotecnológica que el doctor Ruiz considera adecuada para mejorar características puntuales en una variedad de cultivo que ya ha sido ampliamente mejorada genéticamente por las técnicas de cruzamiento tradicional. Según explica, esta última metodología no es apropiada para los propósitos de este proyecto, por cuanto ella involucra la recombinación de un gran número de genes que podrían ir en detrimento de la calidad del producto ya mejorado. Sin embargo, "en los casos en que la manifestación de una característica fenotípica es fruto de la acción de múltiples genes, la estrategia más adecuada son los métodos de mejoramiento basados en los cruzamientos, ya que la transgenia hasta la fecha permite sólo la transferencia de un número limitado de genes", afirma.

Aunque en este momento no se podrían



El doctor Enrique González dirige el equipo que trabaja en genes de tolerancia a bajas temperaturas; mientras el doctor Simón Ruiz lidera el trabajo de estrés salino.

cultivar masivamente en Chile las semillas derivadas de esta tecnología, el investigador comenta que "no podemos asegurar que la política de no llevar plantas transgénicas a campo se mantenga a lo largo del tiempo, ya que otros países vecinos como Argentina y Brasil, efectúan esta práctica desde hace años, dejando a Chile en una situación desventajosa. Aún cuando nuestro país mantuviera su actual política, de alguna manera vamos a tener que evaluar la naturaleza transgénica de los productos que importamos. En ese sentido este proyecto no sólo permitiría la generación del banco de genes ya mencionado, sino un mejoramiento de la tecnología para poder desarrollar tales evaluaciones". Por otra parte -finaliza Simón Ruiz- disponer de estos genes capaces de otorgar resistencia a los distintos tipos de estrés aquí estudiados, podría ser de interés comercial para muchas de las empresas biotecnológicas internacionales.

El director del proyecto se muestra satisfecho con los resultados obtenidos en esta etapa. Señala que, tal como esperaban, la planta ha demostrado ser bastante tolerante al estrés abiótico y el proyecto se ha desarrollado de acuerdo a la planificación original. Bioplanet continuará informando acerca de los avances y desafíos de esta importante investigación biotecnológica.

Contacto

Simón Ruiz
sruiz@peñufocha.ufalca.cl



BIO PLANET

BIOTECNOLOGIA PARA SUS NEGOCIOS

Iberoamérica • Año 5 • N°28 • Marzo - Abril 2004

www.bioplanet.net

• PATRICIO VELASCO, DIRECTOR DE FONDECYT
"Hemos crecido significativamente"

• CENTRO DE ESTUDIOS AVANZADOS EN ECOLOGIA

Promotores de la generosa
Biodiversidad Nacional

Potenciando la tolerancia a la salinidad en Plantas

A través de una investigación realizada por el laboratorio de Biología Celular y Genética de la Universidad de Talca, encabezado por el doctor Simón Ruiz, se han lanzado a la identificación de los mecanismos que permiten a las plantas resistir altos grados de salinidad y a tratar de transferir esas propiedades a diferentes cultivos.

5 Editorial

Innovación y emprendimiento:
Tareas pendientes

12 Opinión

Felipe Barros
Entre Pitagoras y Baconianos

13 Desarrollo

Los Alcances de la neurociencia

19 Genética

Hormonas, aliadas de riesgo

26 Fundación Moisés Mellado

Una red de ingenieros solidarios

28 Política

Presidente Lagos dio inicio a Foro
Mundial de Biotecnología

29 Política

La labor de las empresas
biotecnológicas

30 Opinión

Sebastián Bernales Odino
Vida de científico

34 CMM

Matemáticas al servicio de la
Meteorología

38 Biocultura

Memorias borradas

6 Breves**8 Biotipos****36 Biografías**

PATRICIO VELASCO, DIRECTOR DE FONDECYT

"Hemos crecido significativamente"

Los desafíos para Fondecyt siempre están presentes, pues debe satisfacer las demandas de toda la base de investigadores nacionales, que consideran a esta entidad el pilar fundamental del sistema científico nacional. La tarea de Patricio Velasco es optimizar los recursos para que alcancen para más proyectos, y en pos de ese objetivo se ha lanzado a modernizar la gestión del fondo.

16

22

Potenclando la tolerancia a la salinidad en Plantas

A través de una investigación realizada por el laboratorio de Biología Celular y Genética de la Universidad de Talca, encabezado por el doctor Simón Ruiz, se han lanzado a la identificación de los mecanismos que permiten a las plantas resistir altos grados de salinidad y a tratar de transferir esas propiedades a diferentes cultivos.



30

CENTRO DE ESTUDIOS AVANZADOS EN ECOLOGIA

Promotores de la generosa Biodiversidad Nacional

Con una amplia gama de áreas de estudios, casi tan variada como la biodiversidad nacional, el Centro de Estudios Avanzados en Ecología e Investigación en Biodiversidad se plantea la investigación de los ecosistemas naturales desde la flora andina del desierto de Atacama hasta los indómitos bosques nativos en el sur, pero su afán científico no acaba allí, también es uno de sus propósitos mantener un estrecho vínculo con la sociedad.



Potenciando la tolerancia a la salinidad en Plantas

A través de una investigación realizada por el laboratorio de Biología Celular y Genética de la Universidad de Talca, encabezado por el doctor Simón Ruiz, se han lanzado a la identificación de los mecanismos que permiten a las plantas resistir altos grados de salinidad y a tratar de transferir esas propiedades a diferentes cultivos.

Dr. Simón Ruiz
Universidad de Talca

Aproximadamente el 20% de la superficie terrestre utilizada para el cultivo en el mundo se encuentra afectado por niveles de salinidad que superan la tolerancia de las especies de cultivos tradicionales. Este porcentaje va en aumento a una tasa del 0,5% anual, debido fundamentalmente a bajas precipitaciones, alta superficie de evaporación, irrigación con aguas salinas y por las prácticas tradicionales de cultivo que favorecen el incremento de la concentración de sales en el suelo. Este estrés salino afecta directamente el rendimiento de los cultivos, inhibe su óptimo desarrollo y en algunos casos puede conducir a la muerte de la planta. Una de las sales que causa mayor perjuicio es el cloruro de Sodio (NaCl).

En la línea de investigación dirigida a la identificación de genes de expresión diferencial ante el estrés salino, se han identificado una serie de genes cuyos productos actúan de forma directa o indirecta en respuesta a los efectos de la sal.

En los últimos años, el estrés salino en plantas provocado por NaCl ha sido un tema de estudio recurrente, tanto desde el punto de vista fisiológico, molecular y genético. Desde la perspectiva fisiológica el resultado de altos niveles de cloruro de sodio sobre las plantas considera dos componentes principales: un componente osmótico y uno

El primero se refiere a la privación del agua y constituye un factor común tanto para estrés salino como para estrés por sequía y frío. El segundo se relaciona con el efecto tóxico que provoca la disminución de la razón Potasio (K^+)/Sodio (Na^+) a nivel celular y es propio de este tipo de estrés. El aumento en los niveles de NaCl en el medio lleva consi-

go un incremento en el influjo de Na^+ a las raíces y su distribución por toda la planta. El ingreso sin control de iones Na^+ por transporte pasivo ocurre como resultado de la generación de un gradiente electroquímico muy elevado entre ambos lados de la membrana celular de las raíces. Los iones Na^+ ingresan al interior del citoplasma gracias a la presencia de canales y transportadores catiónicos en la membrana plasmática, los cuales son bastante inespecíficos frente a un alza en la razón Na^+/K^+ en el medio. La disminución en el contenido de iones K^+ en el citoplasma trae como consecuencia una desestabilización en el potencial de membrana, la inactivación de enzimas y un efecto perjudicial sobre una serie de procesos fisiológicos. El restablecimiento de la homeostasis iónica, no es un problema de fácil solución para las plantas, ya que a diferencia de las



La *Lycopersicon chilense* se distribuye entre los 100 y los tres mil metros de altitud en el desierto de Atacama, y subsiste en condiciones de alta salinidad del suelo y de escasez hídrica.

células animales, ellas carecen de transportadores de Sodio, tales como las Na^+ -ATPasas o las Na^+/K^+ -ATPasas, por lo que deben recurrir a las H^+ -ATPasas o H^+ -pirófosfatasa para generar un gradiente electroquímico de protones que permitan el intercambio de H^+ por Na^+ y también de otros iones y metabolitos.

Halófitas y Glicófitas

Las plantas pueden ser clasificadas en dos grupos, según su capacidad de tolerar la salinidad: Halófitas y Glicófitas. Las plantas halófitas, a diferencia de las glicófitas, se caracterizan por poseer una alta tolerancia a la salinidad, condición que en algunos casos esta dada por la presencia de estructuras especializadas, como glándulas excretoras o vesículas almidonadas salinas. Sin

**Los primeros avances
conducentes a la
generación de variedades
cultivables de una relativa
tolerancia a la salinidad,
vino desde la genética
clásica asociada a técnicas
de biología molecular que
permitieron la identificación
de QTLs (quantitative trait
loci) específicos de la
tolerancia a la sal, en
tomate y arroz.**

embargo, en la mayoría de los casos las diferencias entre halófitas y glicófitas esta determinada por la expresión diferencial de genes, que de forma coordinada provocan cambios en el metabolismo celular, protegiendo la planta de la acción osmótica y tóxica de la sal asegurando un adecuado nivel de división y expansión celular, durante el tiempo que perdure el estrés.

En la línea de investigación dirigida a la identificación de genes de expresión diferencial ante el estrés salino, se han identificado una serie de genes cuyos productos actúan de forma directa o indirecta en respuesta a los efectos de la sal. En la acción directa pueden considerarse los productos génicos que conforman proteínas antiporter de Na^+/H^+ de la membrana plasmática o del toplasto (membrana vacuolar), que movilizan al Na^+ fuera de la célula o bien lo acumulan en el interior de la vacuola. Dentro de este grupo, deben considerarse también el conjunto de productos génicos involucrados en la activación de dichas proteínas

intercambiadoras de Sodio. También, en la acción directa se encuentran los genes que codifican para los enzimas responsables de la síntesis de los llamados osmoprotectores, de gran importancia para la supervivencia de la planta bajo este tipo de estrés abiótico.

Otro importante grupo de genes son los encargados de la homeostasis de agua dentro

de la planta, entre ellos destacan los genes para acuaporinas y los que codifican para las proteínas encargadas de regular el cierre estomático, los cuales suelen ser los mismos genes que participan en el estrés por sequía y frío, ya que son inducidos por el efecto osmótico. En la acción indirecta, han sido identificados un importante número de genes cuyos productos son de eliminación de radicales libres y que actúan después de la formación de elementos reactivos de oxígeno (ROS), el cual es un efecto bastante común de diversos tipos de estrés abiótico. Estos productos génicos están participando activamente en la protección del efecto nocivo de los elementos ROS, en la membrana citoplasmática y en diversos organelos, tales como: mitocondrias y cloroplastos.

De acuerdo a los antecedentes previos la tolerancia al estrés salino aparece como un problema multifactorial y por lo tanto de difícil solución.



Transformación de Tomate

Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*



Las diferentes fases de la transformación de una planta de tomates.

mas aún cuando los grados de tolerancia a la salinidad de una planta puede ser muy distintos en los diferentes estados específicos de su ontogenia, tales como: germinación y emergencia, crecimiento y sobrevivencia de la plántula, y crecimiento vegetativo y reproductivo.

Los primeros avances conducentes a la generación de variedades cultivables de una relativa tolerancia a la salinidad, vino desde la genética clásica asociada a técnicas de biología molecular que permitieron la identificación de QTLs (quantitative trait loci) específicos de la tolerancia a la sal, en tomate y arroz. Sin embargo, los programas de mejoramiento genético de las especies cultivables, solo han podido lograr variedades moderadamente sensibles al estrés salino en todos los estados de desarrollo de la planta.

En contraposición a lo observado y descrito, el grupo de investigación del Dr. Eduardo Blumwald de la Universidad de California Davis, ha logrado aumentar la tolerancia a este tipo de estrés en plantas transgénicas de tomate, canola y *A. thaliana*, con la sobreexpresión de un único gen que codifica para un antiporte vacuolar de Na^+/H^+ . En estas plantas, el Sodio es acumulado en hojas, observándose además que los frutos

y las semillas no son afectadas en su calidad. Similares resultados, respecto del aumento de la tolerancia a salinidad, ha sido mostrada en *Arabidopsis thaliana*, cuando es sobreexpresado el gen *SOS1*, el cual corresponde a un antiporter Na^+/H^+ de la membrana plasmática, y también cuando se ha realizado la sobreexpresión del gen *AVP1*, el cual codifica para H^+ -pirofosfatasa vacuolar.

Estos resultados, sugieren que la forma más rápida de incrementar la tolerancia a la sal consiste en aumentar la razón K^+/Na^+ en el citosol de las células vegetales, lo cual se consigue mediante la extrusión del Sodio y/o por la acumulación de éste en las Vacuolas. Se ha sugerido que una estrategia alternativa consistiría en aumentar la proporción de transportadores más selectivos de K^+ en la raíz de la planta.

Aún cuando el efecto tóxico del Sodio pareciera ser en parte solucionable mediante los sistemas descritos anteriormente, es claro que el efecto osmótico producido por este ión requiere de una solución más integral. Esta situación que parece haber sido resuelto en aquellas plantas halófitas que carecen de estructuras especializadas.

sorbía el Sodio o bien gran parte de él era excluido por las raíces, ya que esta última posibilidad es una de las alternativas observadas en plantas halófitas. Nuestros resultados mostraron que efectivamente el Sodio era abundantemente absorbido y que mayoritariamente era acumulado en las hojas, lo cual sugería que esta planta desarrollaba mecanismos moleculares eficaces para contrarrestar el efecto osmótico y tóxico ocasionado por la sal.

***Lycopersicon chilense*, es una planta silvestre de tomate que se distribuye entre los cien y los tres mil metros de altitud en el desierto de Atacama, y que dadas las condiciones extremas de su hábitat, ha logrado subsistir en condiciones de alta salinidad del suelo y de escasez hídrica.**

Un modelo chileno

Lycopersicon chilense, es una planta silvestre de tomate que se distribuye entre los 100 y los tres mil metros de altitud en el desierto de Atacama, y que dadas las condiciones extremas de su hábitat, ha logrado subsistir en condiciones de alta salinidad del suelo y de escasez hídrica. Dadas las características de esta planta, en el laboratorio de Biología Celular y Genética de la Universidad de Talca, nos pareció un excelente modelo donde estudiar los genes de expresión diferencial que se estaban manifestando durante el estrés por NaCl.

En el año 2002 iniciamos esta investigación, cofinanciada por la Fundación de Innovación Agraria (FIA). Una de las primeras cuestiones a definir fue si esta planta ab-

Con estos antecedentes la pesquisa de genes diferencialmente expresados se realizó mediante las técnicas de *differential display* y PCR-Select. Así, se identificaron más 20 genes implicados en distintos procesos metabólicos y de regulación de estructuras celulares, seleccionándose aquellos que por las características funcionales de sus productos génicos aparecían como más interesantes por su implicancia en procesos y estructuras claves para el óptimo funcionamiento de la planta.

Entre los genes seleccionados, cabe mencionar los que se encuentran participando en el mantenimiento de la funcionalidad de la maquinaria fotosintética, la regulación del cierre estomático, la impermeabilización de la hoja, la regulación del gradiente electroquímico de protones y los de síntesis y acumulación de osmolitos compatibles. Algunos de ellos son también expresados cuando las plantas son sometidas a estrés por deshidratación, con lo cual parecen responder al efecto osmótico, pero también de ambos tipos de estrés. Su estudio y el aislamiento



de los genes resultó un poco más complejo de lo esperado, ya que la mayoría de ellos corresponden a familias multigénicas. En estas familias, hay genes que son regulados de manera tejido-específico, otros durante determinados estados del desarrollo de la planta y además, están los activados por el estrés que a su vez son expresados de manera tejido-específico.

El paso crucial en la investigación descrita, consiste en la determinación del rol que juegan los genes aislados en la tolerancia al estrés salino observado en esta planta silvestre. Uno de las estrategias más utilizada para tales efectos, es el silenciamiento de los genes en estudio, procedimiento que tradicionalmente se ha realizado utilizando los mismos genes pero con posición antisentido, de tal manera, que al transcribirse el gen en estudio, también se transcribe el antisentido, formándose un RNA duplex, formado por ambos RNAs mensajeros que no puede ser traducido por los ribosomas y termina siendo degradado por las RNAasas intracelulares (enzimas que hidrolizan RNA).

El paso crucial en nuestra investigación consiste en determinar del rol que juegan los genes aislados en la tolerancia al estrés salino observado en esta planta silvestre. Una de las estrategias más utilizada para tales efectos es el silenciamiento de los genes en estudio.



Dra. (c) Marcela Salazar, doctora Mariana Rodríguez, doctor (c) Gerardo Tapia, Licenciada Mónica Yañez, doctor Simón Ruiz, Jesica Valdés, técnico de laboratorio; Nilo Mejía, estudiante de doctorado; y doctor (c) José Loyola.

La otra forma de obtener silenciamiento es mediante los denominados RNA interferentes (siRNA), los cuales son pequeños RNAs de secuencia complementaria al RNA mensajero del gen en estudio, que a diferencia del anterior no se requiere la secuencia nucleotídica completa del cDNA (DNA complementario al RNA mensajero), el cual también impide su traducción y favorece su degradación. Con ambos métodos es posible silenciar toda una familia multigénica. Sin embargo, el problema se presenta cuando se pretende silenciar solo un gen de la familia, y no todos sus miembros ya que dicha situación podría ser letal para la planta.

La otra forma de estudiar el efecto de un gen en particular, es obtener su sobreexpresión en plantas transgénicas de su misma especie o en plantas heterólogas. Dicha sobreexpresión se obtiene, regularmente, colocando la región codificante del gen bajo el control de un promotor constitutivo como es el 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor. Sin embargo, no es el método más apropiado cuando se estudian genes de expresión tejido-específico, por lo que la transformación debe ser realizada con el propio gen, lo que implica una caracterización

acabada de su promotor y de los elementos en *cis* reguladores de su expresión. La otra posibilidad es colocar la región codificante del gen bajo la regulación de un promotor de otro gen que también se exprese en el mismo tejido y del cual se conozca como puede ser inducido exógenamente.

Varios de los genes aislados se encuentran en la fase de estudio de su rol en la tolerancia al estrés salino, por cuanto para su análisis se está utilizando algunas de las estrategias anteriormente mencionadas. Los resultados que aquí se obtengan servirán como base para comprender en parte como algunas plantas halófitas logran dar solución al problema de la salinidad del suelo, el conocimiento aquí generado lo podemos utilizar en función del incremento de la tolerancia al estrés salino de las plantas de importancia económica y así aumentar la actual superficie cultivable o al menos contrarrestar la pérdida anual de tierras aptas para cultivo. ●

Contacto

Simón Ruiz Lara
sruiz@utalca.cl



BIO PLANET

Biotecnología para sus negocios

Iberoamérica • Año 7 • N°39

www.bioplanet.net

- Austral Biologicals
Biotecnología chilena para el mundo
- Departamento de Ciencias
Biológicas de la UNAB
Nuevos espacios para la ciencia

Pedro Pablo Rosso

**“Hay que apurar el
paso en investigación”**

La necesidad de diferenciar el rol de las universidades de investigación, de potenciar la participación en las entidades de educación superior en los consorcios empresariales y proyectar la Pontificia Universidad Católica de Chile como una de las 100 mejores del mundo son algunas de las preocupaciones del rector de dicha casa de estudios.

Biotecnología de la tolerancia y adaptación a estrés en plantas



Dr. Enrique González Villanueva
Universidad de Talca
egonzale@utalca.cl

Diversos factores medioambientales de naturaleza biótica (patógenos y plagas) y abiótica (alta salinidad, sequía y baja temperatura), afectan el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales, incidiendo gravemente sobre la actividad agrícola. Las especies vegetales han desarrollado respuestas defensivas que les permite tolerar y adaptarse a condiciones medioambientales adversas. Los mecanismos moleculares involucrados tales respuestas no son cabalmente comprendidos, razón por la que su estudio es una de las principales áreas de investigación en biología vegetal. La información generada a través de tales análisis ha sido fundamental para el diseño de estrategias biotecnológicas orientadas al desarrollo de cultivares tolerantes a factores de estrés. Algunas de estas estrategias fueron presentadas en el simposio «Mecanismos moleculares de la respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico en plantas», realizado en la Universidad de Talca en el marco de las actividades del proyecto FIA BIOT-01-A-065, el cual contó con la participación de investigadores nacionales y extranjeros.

La diversidad de enfoques posibles para abordar la biotecnología del estrés en vegetales quedó de manifiesto en este simposium. Una primera estrategia está orientado a la búsqueda de resistencia natural a factores de estrés específicos. Ejemplo de ello es el análisis de la tolerancia a NaCl y boro en distintos patrones de portainjertos en cítricos, con el objetivo de seleccionar la variedad adecuada para iniciar un programa de transformación genética que permita incrementar la tolerancia a estrés salino en este especie (Dr. Patricio Arce, U. Católica de Chile). En esta misma línea, la búsqueda de genes de resistencia a virus y nematodos en un banco de germoplasma de papa mediante el uso de marcadores moleculares, es el punto de partida para un programa de mejoramiento genético de este cultivar (Dr. Boris Sagrado, INIA Remehue).

La segunda orientación estratégica se refiere a la manipulación de la expresión de factores de

transcripción (FTs) que participan de las vías de transducción de señales asociadas a la respuesta de plantas a factores de estrés. Ejemplo de esta estrategia es la línea de investigación de la Dra. Monserrat Pagés (CSIC-Barcelona, España), la que se ha enfocado hacia la participación de la vía de señalización de ácido abscísico (ABA) en la inducción de genes inducidos por estrés hídrico en maíz. Su análisis ha permitido identificar nuevos FTs asociados a la vía de señalización de ABA los cuales son activados, además, por estrés osmótico. La sobre-expresión de tales FTs en plantas transgénicas inducen la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés hídrico y ABA, ha sido realizado por el Dr. José Casaretto (Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, U. de Talca). Utilizando cebada como modelo, ha estudiado la regulación de la expresión de genes para proteínas LEA, inducidas durante el proceso de desecación de semillas y en respuesta a estrés hídrico. Complejos transcripcionales formados por FTs que median la señalización por ABA y diferentes isoformas de las proteínas regulatorias 14-3-3 aparecen involucrados en este evento. La manipulación de la expresión de FTs ha sido también la elección de la Dra. María Teresa Pino (INIA La Platina) para obtener plantas de papa resistentes a baja temperatura. Plantas transgénicas de *Solanum commersonii* que sobre-expresan CBF3, FT de *A. thaliana* responsable de la activación de genes de respuesta a frío, incrementaron su tolerancia a baja temperatura sin alteraciones morfológicas evidentes.

Un tercer camino se refiere a la manipulación de genes que actúan como efectores en la respuesta defensiva de plantas a estrés. El Dr. Eduardo Blumwald (University of California-Davis, USA), ha basado su estrategia en el anti-transportador vacuolar de Na^+/H^+ , proteína involucrada en la mantención de la homeostasis iónica de *A. thaliana*. La sobreexpresión del gen AtNHX1 que codifica esta proteína ha sido capaz de conferir tolerancia a salinidad a plantas sensibles. En esta línea se enmarca también el enfoque presentado por el Dr. Simón Ruiz (Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, U. de Talca y organizador del simposium), quien ha utilizado como

modelo a la planta nativa *Lycopersicon chilense* para analizar la expresión génica diferencial en respuesta a diversas condiciones de estrés abiótico que propician estrés oxidativo. Tal estudio ha permitido identificar y aislar genes asociados a la respuesta defensiva de la planta, los que han sido utilizados en la transformación de la especie de cultivo *Lycopersicon esculentum*, generando una variedad de líneas transgénicas cuya evaluación está en proceso. El estudio de la interacción *Botrytis cinerea* desarrollado por el Dr. Humberto Prieto (INIA La Platina), es otro ejemplo de esta estrategia. La aplicación de técnicas de la genómica funcional para la caracterización de la respuesta de dos cultivares de vides a este patógeno, ha permitido establecer el perfil de expresión génica asociado a esta interacción e identificar genes candidatos para iniciar un programa de transgenosis en vides.

La cuarta estrategia apunta al uso de genes de origen no vegetal para generar plantas transgénicas resistentes a factores de estrés determinados. Ejemplo de ello es la generación de plantas de arroz transgénicas resistentes a diversos fitopatógenos, por la transformación y expresión de genes que codifican para la proteína antifúngica AFP de *Aspergillus giganteus* o para cecropina, péptido antimicrobiano proveniente de insectos (Dra. Blanca San Segundo CSIC-Barcelona). En esta misma orientación se enmarca la línea de investigación desarrollada por el profesor Luis Meza (I. de Biología Vegetal y Biotecnología, U. de Talca), quien se ha enfocado en líneas de tomate transgénicas resistentes a la larva de la polilla del tomate. La sobre-expresión de genes para endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en cloroplastos de las plantas transgénicas y la co-expresión de genes de endotoxinas y de quitinasas, son las aproximaciones experimentales que se encuentran en evaluación.

Un análisis global de lo presentado en este simposio indica que una interesante actividad investigativa relacionada con la biotecnología de la tolerancia a estrés en cultivares relevantes para nuestra agricultura está siendo desarrollada en nuestro país. La calidad de estos estudios augura una excelente proyección para el desarrollo de esta área de la biotecnología vegetal.

ORGANIZADO POR INSTITUTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y BIOTECNOLOGÍA

Alta participación de expertos en simposio internacional

Cerca de 80 personas entre académicos, estudiantes de post-grados, pregrado, e invitados internacionales asistieron al simposio "Mecanismos moleculares de la respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico en plantas", organizado por el Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología de nuestra Universidad, con el apoyo de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).

La actividad se desarrolló en el Salón Diego Portales, en el Campus Lircay. La iniciativa se inserta en un proyecto que concluye du-

rante el primer semestre de este año, que se denomina "Generación de un banco de genes de tolerancia a estrés abiótico obtenidos de plantas nativas, utilizables en programas de mejoramiento genético vía transgenosis de variedades cultivables", que es financiado por FIA.

Según explicó el Dr. Simón Ruiz, organizador de la cita y responsable del proyecto en cuestión, la investigación apunta a determinar los genes que están involucrados en otorgar tolerancia a la salinidad, sequía y frío de

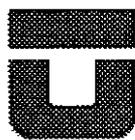
una planta de tomate chilena, ubicada en el Desierto de Atacama, que crece a tres mil metros de altura y en condiciones extremas desde un punto de vista ambiental. Añadió que a la fecha se han identificado un conjunto de genes los cuales están siendo evaluados en plantas de tomate sensibles a estas condiciones ambientales adversas, con el propósito de lograr traspasar dicha tolerancia y así poder ampliar las zonas de cultivo de estos y de otros cultivares de importancia agrícola. Al simposio asistieron, entre otras persona-



lidades, el Dr. Eduardo Blumwald, de la Universidad de California Davis, Estados Unidos; la Dra. Montserrat Pagés y la Dra. Blanca San

De izquierda a derecha: Dr. Simón Ruiz, responsable del proyecto FIA y organizador del Simposio; Dr. Eduardo Blumwald, académico de la Universidad de California Davis, Estados Unidos; José Casaretto, académico del Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología.

Segundo, ambas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España, entre otros destacados científicos nacionales.



UNIVERSIDAD DE TALCA
INSTITUTO DE BIOLOGIA VEGETAL Y BIOTECNOLOGÍA

Análisis de la expresión de genes involucrados en la tolerancia al estrés salino y sequía en *Lycopersicon chilense* y su relación con la regulación de los procesos fotosintéticos y el metabolismo de azúcares.

Candidato a Doctor : Gerardo Marcelo Vladimir Tapia San Martin

Fecha de Inicio de la Tesis : Septiembre del 2002

Fecha de Término de la Tesis: Diciembre del 2004

Profesor Guía

Dr. Simón Ruiz Lara
Universidad de Talca, Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología
2 norte 685, Casilla 747, Talca
sruiz@utalca.cl

Integrantes de la Comisión de Evaluación:

Firma

Dr. Hugo Campos de Quiroz

Dr. Leon Bravo Ramírez

Dr. Enrique González Villanueva

Dr. Luis Meza Basso

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL
UNIVERSIDAD DE TALCA

TÍTULO

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN *Lycopersicon
chilense* Y *Lycopersicon esculentum*, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS
ABIÓTICO.**

NOMBRE Y FIRMA DOCTORANTE

JOSE IGNACIO LOYOLA JARA

NOMBRE Y FIRMA DIRECTOR DE TESIS

DR. SIMÓN RUIZ LARA

NOMBRE Y FIRMA CODIRECTOR DE TESIS

DR. IVÁN AHUMADA DÍAZ

FECHA DE PRESENTACIÓN

15 de Marzo 2006

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
MENCION INGENIERIA GENETICA VEGETAL
UNIVERSIDAD DE TALCA**

TÍTULO

Análisis de la expresión de genes que codifican para proteínas de la superfamilia LHC y su relación con la tolerancia a estrés fotooxidativo en la especie nativa *Lycopersicon chilense*

NOMBRE Y FIRMA DOCTORANTE

Ricardo Javier Chilian

NOMBRE Y FIRMA DIRECTOR DE TESIS

Enrique González

FECHA DE PRESENTACIÓN

Elsevier Editorial System(tm) for Plant Physiology and Biochemistry

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Effect of salt stress in the adjustment of K⁺/Na⁺ ratio and photosynthesis rate and differential gene expression in *Lycopersicon chilense* Dun.

Article Type: Research Paper

Keywords: Salinity, ionic stress, *Lycopersicon chilense*, Lipid transfers proteins, pathogenic related protein, ATP synthase alfa subunit, 4-CL

Corresponding Author: Dr. Simon Ruiz-Lara, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidad de Talca

First Author: Gerardo Tapia, Licenciado

Order of Authors: Gerardo Tapia, Licenciado; Monica Yañez, Licenciada; Simon Ruiz-Lara, PhD

Abstract: Plants responses to stress are important for their adaptation to different environmental. They are often associated morphological and physiological adjustments and changes in gene expression. In order to investigate phenotypic adaptation to salt stress and their possible correlations with induced gene expression, we have studied the wild tomato *Lycopersicon chilense* subjected to a severe NaCl treatment. The concentration of sodium and potassium and the calculate K⁺/Na⁺ ratio determined in the young and old leaves, showed that this species has capability to performe osmotic adjustment. The net photosynthesis remained unchanged during the stress and the CO₂ diffution recuperated after 10 days, suggesting that *L.chilense* has the ability to ameliorate the negative effect by sodium accumulation. Under these phenotypic parameters this wild tomato can be classified as salt-tolerant relative of *L. esculentum*. To identify possible genes involved in this adaptative response, we used the differential display technique (DD-PCR). Four cDNAs showed up-regulated by salinity showed high similitude with a lipid transfer protein, a putative 4-coumarate-CoA ligase, a chloroplast ATP synthase α subunit and a pathogenic related protein. The role of these genes in both ionic and osmotic adjustment of *L. chilense* plants exposed to salt stress is discussed.

Effect to salt stress in *Lycopersicon chilense*...

Effect of salt stress in the adjustment of K^+/Na^+ ratio and photosynthesis rate and differential gene expression in *Lycopersicon chilense* Dun.

Gerardo Tapia, Mónica Yañez and Simón Ruiz-Lara.

Laboratorio de Biología Celular y Genética, Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca.

2 Norte 685, Talca, Chile.

Corresponding author

Simón Ruiz-Lara

Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Talca, Chile.

Fax: 56-71-200276

e-mail: sruiz@utalca.cl

A GDP dissociation inhibitor gene Rab-GDI is differentially ...

A GDP dissociation inhibitor gene Rab-GDI is differentially regulated by abiotic stress, ABA and ethylene in wild type tomato species (*Lycopersicon chilense*)

Ahumada, Iván, and Ruiz-Lara Simón*

Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca, 2 Norte 685 Talca, Chile

*Corresponding autor

Name: Simón Ruiz-Lara

Address: Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca
Casilla 747, Talca, Chile.

Fax: 56 71 200276

e-mail: sruiz@utalca.cl

Accession number: AY787206

ABSTRACT

By using the mRNA differential display approach to isolated genes induced by drought a cDNA fragment with high sequence homology to Rab-specific GDP dissociation inhibitors (GDIs) was identified in leaves of wild type tomato species (*Lycopersicon chilense*). Using RACE 5' technique over total RNA those plants, the full-length cDNA was obtained and designated as *LchGDI-1*, which encoding a polypeptide of 444 amino acids. The deduced amino acid sequences of the isolated cDNA exhibited substantial homology with Rab-GDIs from plants species of different genus. Northern analysis revealed that transcripts detected with 3'-gene-specific DNA probe not only accumulated to high level at 10 days after drought stress, if not also when the plants were exposed to salt stress and low temperatures. The *LchGDI-1* gene was also up-regulated in leaves of plants treatment with ABA and ethylene, but its not induced by salicylic acid; jasmonic acid and H₂O₂. Interestingly, the expression these gene was observed almost exclusively in stems from plants without an environmental stimuli. The possible role of *LchGDI-1* gene product in the response to abiotic stress in *L. chilense*, is discussed.

Keywords:

Abiotic stress, Rab-GDIs, GTPases, ABA, Ethylene, *Lycopersicon chilense*.

Abbreviations

ABA: Abscisic acid

bp: base pair

DDRT-PCR: Differential display from transcription reverse and Polymerase chain reaction

Comparative analysis of the response physiological to drought stress of some isoprenoids of the route plastid in two *Lycopersicon* species.

Introducción:

En muchas regiones geográficas del planeta, la disponibilidad de agua es una importante constante ambiental que limita la productividad de las plantas. Esto representa severas limitaciones económicas en la producción agrícola. Las plantas como organismos sésiles, han desarrollado un amplio espectro de adaptaciones para hacer frente a estas adversas condiciones ambientales. Sin embargo, bastante frecuentemente, estos mismos mecanismos adaptativos, afectan los parámetros de producción de los cultivos, los cuales terminan adecuándose a una producción de biomasa, dependiendo de una oferta ambiental.

Una de las primeras respuestas adaptativas de las plantas afectadas por un déficit hídrico, es cerrar sus estomas para evitar la pérdida de agua por evapotranspiración. Sin embargo, esta conducta provoca a una disminución en la incorporación de carbono a través de las hojas (*Chaves, 1991, Chaves et al. 2002*). La baja en la concentración neta de CO₂, en condiciones de sequía, es frecuentemente explicada por una baja interna de las concentraciones de CO₂, que se traduce en una disminución de la fotosíntesis, (*Stuhlfauth et al 1988, Cornic et al 1992*), y por una inhibición de enzimas fotosintéticas como la Rubisco (*Lawlor D.W.1995*) o ATP sintetasa (*Tezara et al. 1999*). La disminución de CO₂ y la inhibición enzimática, llevan a un descenso de la oxidación de NADPH en el ciclo de Calvin y por lo tanto, a una insuficiente disponibilidad del primer aceptor de electrones fotosintéticos, NADP⁺.

La activación de la clorofila en condiciones de saturación de luz y bajo un severo déficit de agua, puede causar un serio daño oxidativo, en aquellas plantas que no son capaces de disipar el exceso de energía de excitación (*Smirnov 1993; Osmond et al 1997*), especialmente en condiciones de campo. Este efecto oxidativo lleva a una degradación de clorofila y a la liperoxidación de lípidos de membrana, con el consecuente daño de los sistemas fotosintéticos. (*Foyer et 1994 b*)

Para evitar y/o mitigar este daño fotooxidativo, las plantas han desarrollado un eficiente sistema antioxidante compuesto por mecanismos de tipo enzimático y no enzimático. (*Asada K. 1999; Munné-Boch and Alegre 1999, Foyer et al. 1994 a, Munné-Bosch and Alegre 2000*). Dentro del sistema no enzimático se destacan una serie de compuestos de bajo peso molecular con alta capacidad antioxidante producidos principalmente en la vía plastídica de los compuestos isoprenoides.

En plantas superiores, se han descrito dos vías para la síntesis de unidades básicas de isoprenoides. La vía del mevalonato (VAM) que tiene lugar en el citoplasma, donde son producidos sesquiterpenos (C₁₅), triterpenos(C₃₀), como fitosteroles, dolicoles, y residuos de farnesil para la prenilación de proteínas.(*Bach et al., 1999; Lichtenthaler, 1999*). Por otro lado, la vía del l-D-eritrol - 4- fosfato (MEP), opera en los plastidios y produce IPP y DMAPP para la síntesis de isoprenoides, que como isopreno, carotenoides, plastoquinonas, conjugados de fitol (como clorofila y tocoferoles), y hormonas (giberalinas y ácido absicico) (*Schwender et al., 1996; Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999,*). A pesar de esta compartamentalización, existen evidencias de una cierta comunicación entre ambas vías (*Bick and Lange, 2003; Hemmerlin et al., 2003; Laule et al. 2003*). Sin embargo las implicancias biológicas de esta comunicación no están totalmente claras.(*Guevara – García, 2005 et al.*)

Los compuestos isoprenoides, derivados de la vía MEP, se han relacionados con importantes roles en la protección frente al riesgo oxidativo. La acción del isopreno se ha relacionado con un aumento en la termo tolerancia de las hojas de algunas especies de plantas. (*Singsas, et al. 1997*). El rol protector del isopentenil difosfato como genoprotector y atenuador del daño oxidativo del DNA a sido recientemente reportado (*Ling et al. 2004*), así como el efecto antioxidante del geranilgeranilpirofosfato (.....). La cantidad y composición de compuestos carotenoides, particularmente carotenos y xantofilas son incrementadas para destoxificar la planta de especies reactivas de oxígeno (ERO) causadas por alta luminosidad, eliminado el exceso de energía como calor (*Demmig- Adams, and Adams, 1996; Niyogi, et al. 1997*). Los tocoferoles, son importantes protectores del sistema fotosintético y de membranas, frente al estrés oxidativo provocado por déficit hídrico (*Munne-Boch and Alegre.....*). La hormona ABA que es sintetizada a partir de carotenoides, es acumulada en repuesta a estrés por déficit hídrico, frío y sal y es responsable del cierre de los estomas junto con la inducción de diversos genes (*Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinosaki, K. 1994*).

Las enzimas reguladoras de pasos claves y los genes que codifican para estas, han sido caracterizados y clonados. La 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfato sintetasa (**DXS**), limita el paso del precursor de la vía MEP, piruvato y gliceraldehído -3 fosfato a 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfato (DXP) (Rohmer et al., 1996; Lois et al. 1998), IPP isopentenil difosfato es el precursor común de todos los isoprenoides en ambas vías, la isopentenil isomerasa (**IPI**) cataliza la conversión de IPP a dimetilalil difosfato (DMAPP), la forma básica de 5 átomos de carbono (Agranoff et al. 1960). Geranylgeranyl difosfato sintetasa (**GGPPs**) cataliza la condensación consecutiva de tres moléculas de IPP con DMAPP para formar un compuesto de C₂₀ (GGPP), precursor de giberelinas, carotenoides, tocoferoles y clorofilas. (McGarvey and Croteau 1995; Luthra et al. 1999). Homogentisato fitiltransferasa (**HPT**) es una enzima unida a la membrana de cloroplastos que cataliza el paso hacia la biosíntesis de tocoferol, (Collakova and Dan DellaPenna 2003), por la condensación de la cola fitil difosfato con el homogentisato a la forma 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinol (MPBQ) (Collakova and Dan DellaPenna 2001, Savidge et al. 2002). Fitoenosintetasa (**PSY**) es la enzima que regula un paso limitante y es clave en la síntesis de los carotenoides (Burkhardt et al. 1997; Hirschberg, 2001), dimeriza dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato a fitonodifosfato, seguido luego de la conversión a fitoeno, una molécula hidrofóbica de C₄₀. (Dogbo et al. 1988). Desaturaciones consecutivas, isomerizaciones, ciclaciones y oxigenaciones, generan diferentes tipos de carotenoides. La hormona ABA es sintetizada a partir de precursores carotenoides. Evidencias bioquímicas (Parry et al., 1990) y genética (Koornneef et al., 1998) indican que la enzima 9-cis-epoxycarotenoides dioxygenasa (**NCED**) es clave en la síntesis de ABA, produciendo el corte de 9-cis-xantofilas, para dar un producto de C₂₅- apocarotenoides y xantoxina (Chernys, J. 2000).

La regulación e integración, de la transcripción de muchos de los genes de esta vía metabólica bajo condiciones de estrés, particularmente sequía, no están suficiente clarificadas. Actualmente los aspectos regulatorios que gobiernan la expresión y actividad de las enzimas son casi desconocidas en plantas superiores (Guevara-García et al. 2005). En consideración a esto último, y a la estrecha relación evidenciada entre los compuestos isoprenoides y la tolerancia al estrés de sequía en algunas plantas, nos hacemos la siguiente pregunta:

¿ La disponibilidad de agua en el medio, ejerce un efecto de regulación en la VPI, en las planta, que permita la tolerancia; a un estrés hídrico?, si es así ¿ especies con distinto grado de tolerancia a un estrés hídrico presentan una regulación distinta de la VPI?

Para responder esta pregunta, hemos planteado la siguiente hipótesis: “Un déficit hídrico en dos especies de *Lycopersicon*, ejerce un efecto regulador en la expresión de genes que codifican para enzimas limitantes de la VPI, para producir un aumento de compuestos finales, que otorgan un grado de tolerancia a este estrés ”

Para evaluar si la expresión de los genes que transcriben para estas enzimas, responden a condiciones de ambientales de sequía, se comparan los patrones de expresión, bajo condiciones de déficit hídrico, dos genotipos de plantas de tomates, uno silvestre como *Lycopersicon chilense*, distribuida desde el sur de Perú a Paposó en desierto de Atacama, Chile, desde la costa hasta los 3.000 m.s.n.m. (Warnock 1991), ambientes que se caracterizan una baja disponibilidad de agua del suelo, alta luminosidad y altas temperaturas diurnas. y bajas temperaturas nocturnas, con *Lycopersicon esculentum* una especie de tomate cultivado susceptible al déficit hídrico.



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA
INNOVACION AGRARIA

V. ANEXOS

Se adjuntan las fichas técnicas por año donde se incluyen todas las personas que han participado en el trabajo de este Proyecto

FICHA DE COMPETENCIAS Y FINANCIAMIENTO DEL EQUIPO TÉCNICO

PROYECTO :							
Nombre	Rut	Responsabilidad y/o competencia	Financiamiento anual AÑO 2002				Porcentaje dedicación
			TÉCNICO PROFESIONAL		Administrativos - Operarios		
			Aporte FIA	Contraparte	Aporte FIA	Contraparte	
Simón Ruiz Lara		Coordinador General	3000000	2.330.208			27,3
Enrique González Villanueva		Coordinador Alterno	2000000	1.941.840			22,7
Isabel Verdugo Bastias		Asesor Técnico		1.105.380			34
Fernando Poblete Cassanova		Asesor Técnico		736.920			22,7
Cristina Tehoduloz		Asesor Técnico		736.920			22,7
Mónica Yañez Chavez		Asesor Técnico	4.272.048				100
Andrea Moreno González		Secretaria				200.883	9,1
			9272048	6.851.268	0	200883	
		FIA	9.272.048				
		CONTRAPARTE	7.052.161				
		TOTAL	16.324.199				

FICHA DE COMPETENCIAS Y FINANCIAMIENTO DEL EQUIPO TÉCNICO

PROYECTO :							
Nombre	Rut	Responsabilidad y/o competencia	Financiamiento anual AÑO 2003				Porcentaje dedicación
			TÉCNICO PROFESIONAL		Administrativos - Operarios		
			Aporte FIA	Contraparte	Aporte FIA	Contraparte	
Simón Ruiz Lara		Coordinador General	3300000	2.520.353			27,3
Enrique González Villanueva		Coordinador Alterno	2300000	2.100.294			22,7
Isabel Verdugo Bastías		Asesor Técnico		1.195.579			34
Fernando Poblete Cassanova		Asesor Técnico		797.053			22,7
Iván Ahumada Díaz		Asesor Investigación		13.200.000			100
Mónica Yañez Chavez		Asesor Técnico	4.620.528				100
Andrea Moreno González		Secretaria				217.275	9,1
Górrido Tapia San Martín		Estudiante de Doctorado					
José Loyola Jara		Estudiante de Doctorado					
			10220528	19.813.279	0	217275	
		FIA	10.220.528				
		CONTRAPARTE	20.030.554				
		TOTAL	30.251.082				

FICHA DE COMPETENCIAS Y FINANCIAMIENTO DEL EQUIPO TÉCNICO

PROYECTO :							
Nombre	Rut	Responsabilidad y/o competencia	Financiamiento anual AÑO 2005				Porcentaje dedicación
			TÉCNICO PROFESIONAL		Administrativos - Operarios		
			Aporte FIA	Contraparte	Aporte FIA	Contraparte	
Simón Ruiz Lara		Coordinador General	2800000	2.110.664			27,3
Enrique González Villanueva		Coordinador Alterno	2000000	1.758.886			22,7
Isabel Verdugo Bastias		Asesor Técnico		1.001.208			34
Fernando Poblete Cassanova		Asesor Técnico		667.472			22,7
Marcela Salazar Viedma		Asesor Técnico	3.953.180				100
Andrea Moremo González		Secretaria				179.653	9,1
Gerardo Tapia San Martín		Estudiante de Doctorado					
José Loyola Jara		Estudiante de Doctorado					
Javier Chillán		Estudiante de Doctorado					
			8763180	6.538.230	0	179653	
		FIA	8.763.180				
		CONTRAPARTE	6.717.883				
		TOTAL	14.471.063				

FICHA DE COMPETENCIAS Y FINANCIAMIENTO DEL EQUIPO TÉCNICO

PROYECTO:							
Nombre	Rut	Responsabilidad y/o competencia	Financiamiento anual AÑO 2006				Porcentaje dedicación
			TÉCNICO PROFESIONAL		Administrativos - Operarios		
			Aporte FIA	Contraparte	Aporte FIA	Contraparte	
Simón Ruiz Lara		Coordinador General	0	2.110.664		27,3	
Enrique González Villanueva		Coordinador Alterno	0	1.758.886		22,7	
Isabel Verdugo Bastias		Asesor Técnico		1.001.208		34	
Fernando Poblete Cassanova		Asesor Técnico		667.472		22,7	
José Loyola Jara		Estudiante de Doctorado					
Javier Chilian		Estudiante de Doctorado					
			0	6.538.230	0	0	
		FIA		0			
		CONTRAPARTE		6.538.230			
		TOTAL		6.538.230			



VI. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

A continuación se señala la bibliografía más relevante utilizada en el transcurso del proyecto y la elaboración de este informe.

- **Alt-Mörbe J, Kühlmann H & Schröder J (1989)** Differences in induction of Ti plasmid virulence genes *virG* and *virD*, and continued control of *virD* expression by four external factors. *Molecular General genetics* 2: 301-308
- **Alt-Mörbe J, Neddermann P, von Litig J, Ewiler E & Schröder J (1988)** Temperature - sensitive step in Ti plasmid *vir* - region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacterium*. *Molecular general Genetics* 213: 1-8
- **Balmer Y, Koller A., del Val, G, Manieri, W, Schurmann P. and Buchanan B. (2002)** Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast hioredoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 370–375
- **Baudo, M., Meza-Zepeda, L., Paiva, E. y Heino, P. (1996)** Induction of homologous low temperatures and ABA responsive genes in frost resistant (*Solanum commersonii*) and frost sensitive (*Solanum tuberosum* cv, Bintje) potato species. *Plant Mol. Biol.* 30: 331-336.
- **Cardoso MG, Silveira FT, Campos W & Brommonschenkel SH (2000)** *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of tomato processing cultivars. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 12(2): 107- 118
- **Chyi Y-S & Phillips GC (1987)** High efficiency *Agrobacterium* - mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. *Plant Cell Rep* 6: 105-108
- **Cohen, S (1998):** A Guide to the polyamines. Oxford University Press, New York
- **Dillen W, De Clercq J, Kapilla J, Zambre M, van Montagu M & Angenon G (1997)** the effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens* - mediated gene transfer to plants. *Plant Journal*, 12: 1459 - 1463
- **Fillati JJ, Kiser J, Rose R & Comai L (1987)** Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Biotechnology* 5: 726-730
- **Fowler, S y Tomashow, M. (2002).** Cold transcriptomic profile indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimatation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14: 1675-1690.
- **Frary A & Earle ED (1996)** An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium* - mediated transformation from tomato. *Plant Cell Rep* 16: 235-240
- **Fullner KJ & Nester EW (1996)** Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 178: 1498 - 1504.
- **Hamza S & Chupeau Y (1993)** Re - evaluation of conditions of planta regeneration and *Agrobacterium* - mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Exp.Bot.* 44: 1837-1845
- **Hicks GS (1994)** Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective. *In Vitro Cell Dev Biol* 30: 10 - 15.
- **Hong-Xia Zhang and Eduardo Blumwald (2001).** Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature biotechnology* 19(8): 765-768.
- **Ingram, J. y Bartels., D. (1996)** The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377-403.
- **Konig J, Baier M, Horling F, Kahmann U, Harris G. Schurmann P. and Dietz K. (2002).** The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxinmediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(8): 5738–5743.
- **Krishnamurthy R, Bhagwat K A (1989):** Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. *Plant Physiol.* 91: 500-504
- **Ling H-O, Kriseleit D, Ganal MW (1998)** Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus grow and shoot regeration in *Agrobacterium* - mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell Re* 17: 843-847



- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Mass (1990). Crop salt tolerance. In: Agricultural Assessment and Management Manual. K.K. Tanji (ed.). ASCE, New York. pp. 262-304
- Mc Cormick S, Niedermeyer J, Fry J, Barnason A, Horsch R & Frary R (1986) Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep 5: 81-84
- Pozueta J, Houlné G, Cañas L, Schantz R & Chamarro J (2001) Enhanced regeneration of tomato pepper seedling explants for *Agrobacterium* - mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 67: 173 – 180
- Roy, M and Wu, R (2001) : Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Science* 160: 869-875.
- Schroeder HE, Schotz AH, Wardley - Ricardson T, Spencer D, Higgins TJV (1993) Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol* 101: 751-757
- Stanley, BA. (1995): Mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase regulation and processing. In R casero, ed, Polyamines: Regulation and Molecular Interaction. Vol 3 R.G. Landes company, pp 27-75
- Steven J. Clough and Andrew F. Bent (1998) TECHNICAL ADVANCE. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(6), 735-743.
- Tasseva, G Richard, L and Zvhowski, A. (2004). Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Lett.* 566: 115-120.
- Thomashow, M.F. (1999). **Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms**. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 50: 571-99.
- Tiburcio. A.F., Altabella, T., Borrel, A Masgrau, C. (1997): Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant* 100:664-674
- van Roekel JSC, Damm B, Melchers LS & Hoekema A (1993) Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Rep* 12: 644 – 647
- Zhang N, Portis AR Jr. (1999). Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(16):9438-43.
- Zimmerman TW (1995) Effect of timetin for controlling *Agrobacterium tumefaciens* following cocultivation on select plant species. *In vitro Cell Dev Biol* 31: 70A