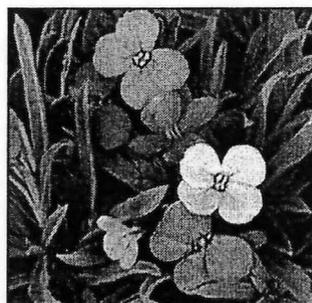


GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

ACTIVIDAD DE FORMACIÓN

“Comparación de la expresión de genes durante la senescencia de hojas y pétalos de *Erysimum linifolium*”

Desarrollada en la Universidad de Cardiff, Gales - Reino Unido



CHARLA DE DIFUSIÓN

Ing. Agr. Danilo Fernando Aros Orellana

Facultad de Ciencias Agronómicas - Universidad de Chile

- Santiago, 10 de mayo de 2006 -

INTRODUCCIÓN

La senescencia podría definirse como un estado final de desarrollo, donde la fotosíntesis se detiene. Clorofila, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos son catabolizados, removidos y reutilizados por otros órganos. La senescencia podría definirse también como un proceso activo de diferenciación y deterioro, altamente controlado de manera endógena y programado genéticamente para generar cambios estructurales, fisiológicos, bioquímicos y moleculares.

Hojas y pétalos tienen un período de vida determinado y, considerando que ambos son órganos de las plantas, podríamos esperar un mecanismo similar durante este proceso. Existe una removilización de recursos y esto se ve reflejado en el tipo de genes involucrados en este proceso, entre ellos, genes que codifican para proteasas, nucleasas y enzimas encargadas del metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Aún cuando factores ambientales pueden afectar la longevidad de la flor, la senescencia es irreversible y está determinada por la especie. Por otra parte, la longevidad de las hojas está fuertemente influenciada, además de las condiciones ambientales, por niveles de nutrientes.

La especie *Erysimum linifolium*, es un cultivo ornamental de relativa importancia para el mercado europeo y se comercializa como planta de maceta. Pertenece a la familia *Brassicaceae* y se ha determinado que está estrechamente relacionada con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Además de las características ya mencionadas, presenta como ventaja para su estudio el poseer pétalos grandes y pigmentados.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

- General:

- Introducir el uso de herramientas biotecnológicas para conocer los mecanismos básicos y los genes involucrados durante la poscosecha de plantas ornamentales.

- Específicos:

- Adquirir una base metodológica en genómica funcional en plantas ornamentales.
- Desarrollar acuerdos de cooperación con el grupo "Molecular Cell Biology" de Cardiff University y con otros centros de Investigación.

- Difundir la experiencia obtenida en el medio, para su implementación y desarrollo en el país.

OBJETIVOS DE LA ACTIVIDAD

- General:

- Identificar genes relacionados con la senescencia de hojas y pétalos de *Erysimum linifolium*.

- Específicos:

- Extraer RNA y luego obtener cDNA desde distintos estados de desarrollo de hojas y pétalos de *Erysimum linifolium*.
- Optimizar condiciones de PCR en función de primarios que amplifiquen para genes específicos descritos previamente en *Arabidopsis thaliana*.
- Identificar la presencia en el genoma Wallflower de algunos genes descritos previamente en *Arabidopsis thaliana*.
- Conocer en detalle los patrones de expresión de genes seleccionados, durante la senescencia de Wallflower.

SECUENCIACIÓN

Previamente se realizó una hibridación mediante supresión sustractiva (SSH), que consiste en sustraer aquellos genes que son expresados durante todos los estados de desarrollo, para dejar sólo aquellos expresados durante la senescencia.

- **MATERIALES Y MÉTODOS**

Fueron seleccionados 192 clones que permanecían almacenados en glicerol, mantenidos a -80°C e insertos en el genoma de bacterias (*E.coli*).

Estos clones fueron amplificados por PCR para aislar el clon del genoma de la bacteria y luego se cargaron los fragmentos amplificados en un "stretch gel", que permite cargar 96 muestras al mismo tiempo. Luego, los geles fueron fotografiados y analizados.

• RESULTADOS

De los 192 clones utilizados, 28 clones no presentaron amplificación, 25 clones presentaron dos bandas y 139 clones amplificaron correctamente.

- Para los clones no amplificados, la solución planteada fue hacer proliferar las bacterias en un medio de cultivo. Como resultado, se obtuvo 11 clones que proliferaron con éxito y de éstos, 8 amplificaron apropiadamente en la repetición del PCR.

- Para los clones que presentaron dos bandas, la solución sugerida fue disminuir el número de ciclos en el programa del PCR (de 40 a 35). Con esta modificación, 10 clones amplificaron correctamente con una sola banda.

- De los 139 clones amplificados correctamente, se seleccionaron 96 para ser secuenciados. Fueron previamente purificados con un sistema al vacío y luego enviados a un centro de investigación ubicado en Warwick (Horticulture Research International, Warwick).

- De los 61 clones restantes, se escogieron 10 para ser secuenciados en Cardiff University. Estos fueron purificados individualmente con un kit de purificación.

Se utilizó una base de datos disponible en internet (NCBI) para establecer la identidad de cada uno de los clones secuenciados.

Clon	Función
L2 D9	Beta-glucosidase-like protein [Arabidopsis thaliana].
L3 G5	Hypothetical protein [Arabidopsis thaliana].
P1 F7	Putative senescence-specific cysteine protease SAG12 [Arabidopsis thaliana].
P2 D2	Putative senescence-specific cysteine protease SAG12 [Arabidopsis thaliana].
P2 D7	Putative cytochrome P450 [Arabidopsis thaliana].
P3 B1	No hits found.
P4 B9	Glutathione S-transferase 3 [Brassica juncea].
P5 H3	Proton-dependent oligopeptide transporter (POT) [Arabidopsis thaliana].
PL F10	F22G5.2 [Arabidopsis thaliana].
PL H7	Unknown protein [Arabidopsis thaliana].

Tabla 1. Resumen de los 10 clones secuenciados en Cardiff University.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

- **MATERIALES Y MÉTODOS**

En base a características morfológicas y contenido de clorofila para el caso de hojas, fueron definidos 7 diferentes estados de desarrollo en hojas (L1, L2, L3, L4, L5, L6 y L7) y 8 estados para pétalos (-2, -1, 0, +1, +2, +3, +4 y +5).

Para la extracción de ARN, las muestras fueron maceradas con N líquido y se utilizó el Método "TRI REAGENT". Luego, para detectar la presencia de ARN en las extracciones se realizó una electroforesis horizontal en geles de agarosa y luego, para determinar la concentración de ARN se realizó una espectrofotometría.

Posteriormente se siguieron protocolos para eliminar el DNA restante de las muestras y luego se realizó un RT-PCR para generar el cDNA de cada estado de desarrollo de pétalos y hojas.

Se diseñaron partidores específicos (P1F4, LPH9, SAG12 y WGST) para amplificar aquellos genes involucrados en la senescencia de hojas y pétalos identificados previamente en *Arabidopsis thaliana* y homologados para *Erysimum linifolium*.

Para optimizar las condiciones de PCR, se estableció la temperatura de *annealing* específica para cada partidor. Además, se hicieron pruebas de amplificación con 3 concentraciones distintas de cDNA (100%, 50% y 25%) con el objeto de llegar a una función lineal al graficar concentración v/s intensidad de bandas en la electroforesis.

También se optimizó a partir del número de ciclos del PCR, para luego graficar esto como una curva sigmoidea. El óptimo se estableció en el lugar donde la función alcanza su máxima pendiente y no precisamente en el máximo de la curva que sólo representa el mayor nivel de producto amplificado.

Luego de la optimización, se realizó la amplificación final a través de PCR de cada muestra de cDNA de Hoja y Pétalos con cada uno de los partidores.

Para el análisis de la amplificación, se tomaron tres exposiciones de luz para cada gel y se realizaron tres repeticiones para cada caso.

Luego se procedió a la construcción de gráficos, definida por la intensidad de las bandas asociadas a cada estado de desarrollo. Esto indica el nivel de expresión de este gen en particular en cada uno de los distintos estados.

La información de la intensidad de cada banda primero fue "normalizada", básicamente para silenciar las diferencias en las concentraciones de ARN presentadas entre las muestras y estos valores fueron luego expresados como % respecto al máximo nivel de intensidad obtenido.

Se calcularon los errores estándar para cada caso.

- **RESULTADOS**

	LP H9	P1 F4	SAG 12	WGST
HOJAS	Rogers, '05	Aros, '06	Aros, '06	Aros, '06
PÉTALOS	Aros, '06	Price, '04	Price, '04	Aros, '06

Tabla 2. Detalle de los autores para la amplificación de cada partidor en hojas y pétalos.

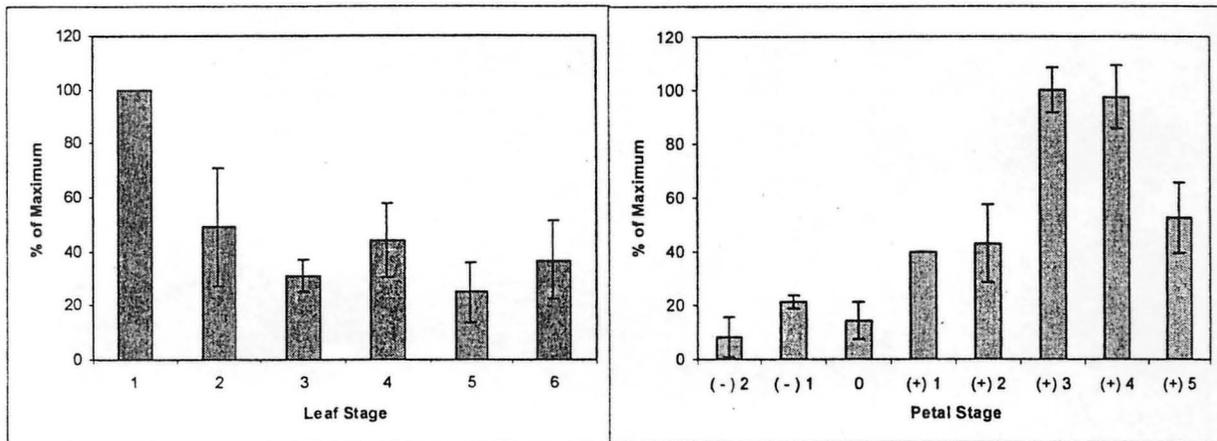
LPH9

CLASE FUNCIONAL: Factor Transcripcional.

CARACTERÍSTICAS: Esta familia de proteínas actúan como represores transcripcionales y además tienen actividad como ARNasa. Su homólogo en *Arabidopsis spp* está asociada a la regulación del etileno.

ANTECEDENTES: En *Arabidopsis spp* aumenta durante la senescencia de hojas, no así en pétalos

RESULTADOS: En Wallflower aumenta sólo en pétalos (Fig.1), a diferencia de *Arabidopsis spp.* Esto sugiere un rol más significativo durante la senescencia de pétalos en Wallflower (Fig. 2).



Figuras 1 y 2. Gráficos de expresión génica para hojas (izq) y pétalos (der) del gen LPH9, durante la senescencia de Wallflower.

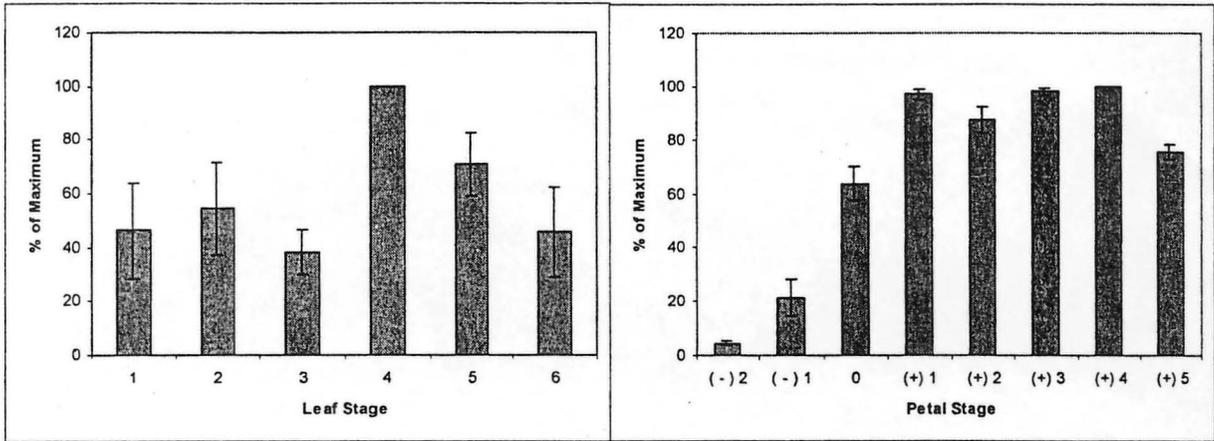
P1F4

CLASE FUNCIONAL: Transportador de péptidos.

CARACTERÍSTICAS: Este gen pertenece a una familia de proteínas encargadas del transporte de oligopéptidos "protón dependientes" (POT). Considerando que la removilización de nutrientes es una importante característica relacionada a la senescencia, este gen probablemente estaría asociado a la removilización de péptidos desde proteínas degradadas.

ANTECEDENTES: En *Arabidopsis spp* la expresión de este gen aumenta durante la senescencia de hojas, pero no hay reportes en pétalos. Se ha detectado también una alta expresión de este gen en raíces.

RESULTADOS: Aumenta en hojas y pétalos (Figs. 3 y 4). Esto sugiere un rol general de removilización durante senescencia.



Figuras 3 y 4. Gráficos de expresión génica para hojas (izq) y pétalos (der) del gen P1F4, durante la senescencia de Wallflower.

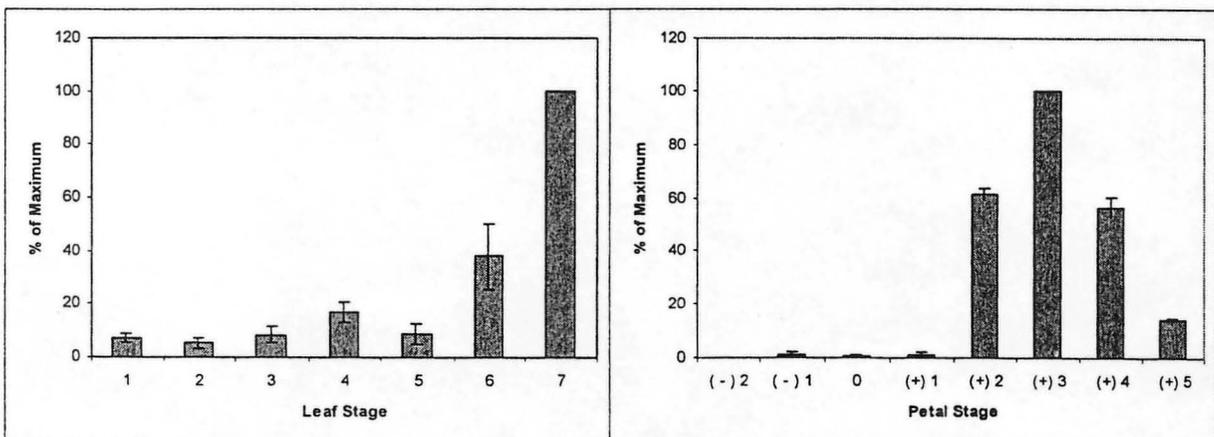
SAG 12

CLASE FUNCIONAL: Cysteine Protease.

CARACTERÍSTICAS: Gen relacionado con la senescencia (Senescence associated Gene). Sólo encontrado en *Arabidopsis spp* y otras *Brassicaceae*.

ANTECEDENTE: Aumenta en hojas senescentes.

RESULTADO: Aumentó expresión en hojas y pétalos durante senescencia (Figs. 5 y 6).



Figuras 5 y 6. Gráficos de expresión génica para hojas (izq) y pétalos (der) del gen SAG12, durante la senescencia de Wallflower.

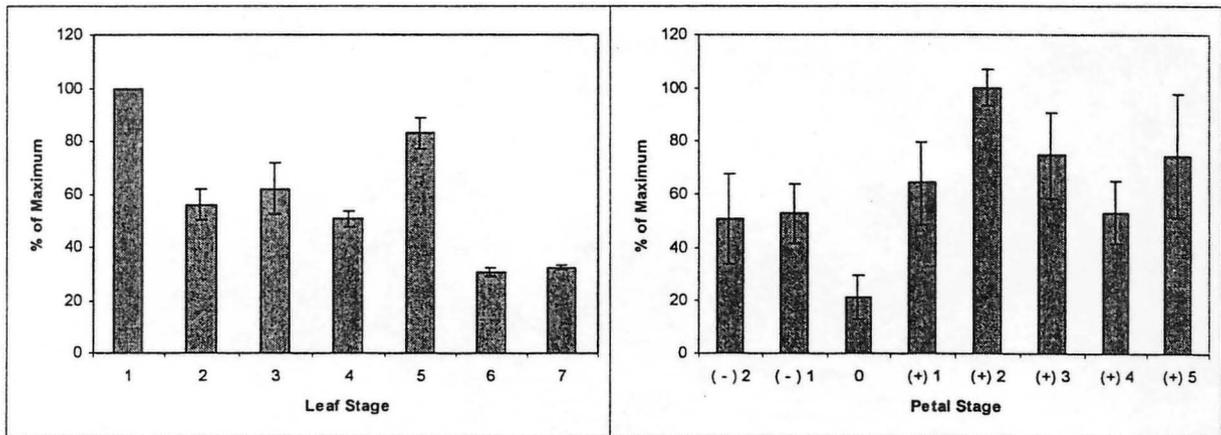
WGST

CLASE FUNCIONAL: Glutathione S-transferase (GST)

CARACTERÍSTICAS: Corresponde a una superfamilia de enzimas. Su principal rol se ha identificado en la detoxificación de la célula agregando Glutathionina a un sustrato electrofílico. El producto es luego transportado a las vacuolas. Distintos GSTs tienen diferentes sustratos específicos, comúnmente desconocidos.

ANTECEDENTES: Aumentan durante la senescencia de hojas y pétalos.

RESULTADOS: Aumenta su expresión en pétalos (Fig. 7), pero disminuyen en hojas (Fig. 8). Esto sugiere un rol específico de este gen durante la senescencia de pétalos, quizás como detoxificación por ejemplo, de algunos pigmentos.



Figuras 7 y 8. Gráficos de expresión génica para hojas (izq) y pétalos (der) del gen WGST, durante la senescencia de Wallflower.

CONCLUSIONES

La senescencia es un proceso que comienza en estados tempranos de desarrollo, antes de que puedan observarse cambios morfológicos significativos.

Aún cuando los mecanismos de senescencia son similares en hojas y pétalos, existen diferencias en la expresión de los genes involucrados durante este proceso.

PERSPECTIVAS

Las investigaciones desarrolladas en este tema, permiten conocer los mecanismos que actúan durante la senescencia de hojas y pétalos, esto, se presenta como una interesante herramienta que podría solucionar el gran desafío que implica para la industria nacional recorrer grandes distancias para llevar sus productos a los centros de consumo ubicados en el hemisferio norte.

En este sentido, quizás más que en ningún otro producto de exportación, la poscosecha en flores es un punto crítico e importantísimo que podría solucionarse a partir de estudios como estos, a través de programas de mejoramiento genético basados en una selección asistida con marcadores moleculares que permitan identificar en estados tempranos de desarrollo aquellos genotipos con un desempeño superior durante la poscosecha.

Otra aplicación interesante, sería identificar algún gen que actúe sobre la senescencia, disminuyendo su efecto negativo sobre hojas y flores, para luego mediante transgenia, insertarlo en el genoma de algún otro cultivo ornamental.

Finalmente, es importante fomentar estudios de este tipo, que permitan desarrollar una base científica técnica, necesaria para la posterior generación de iniciativas tecnológicas de mayor envergadura, que solucionen los problemas de la industria.



“Comparación de la expresión de genes durante la senescencia de hojas y pétalos de *Erysimum linifolium*”

DANILO FERNANDO AROS ORELLANA

INTRODUCCIÓN



• REINO UNIDO



• GALES

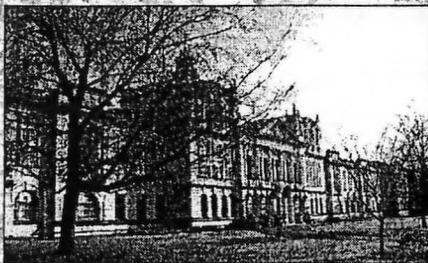


• CARDIFF



INTRODUCCIÓN

Cardiff University - School of Biosciences



INTRODUCCIÓN

SENESCENCIA

- Estado final de desarrollo
- La fotosíntesis se detiene
- Clorofila, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos son catabolizados, removidos y reutilizados
- Proceso activo de diferenciación y deterioro
- Controlado de manera endógena
- Programado genéticamente
- Cambios estructurales, fisiológicos, bioquímicos y moleculares

INTRODUCCIÓN

• Mecanismo de senescencia en Hojas y Pétalos

• Factores que afectan la senescencia

Pétalos: factores ambientales y determinada por la especie.

Hojas: condiciones ambientales y niveles de nutrientes

INTRODUCCIÓN

• Removilización de recursos durante la senescencia

— Genes que codifican para proteasas, nucleasas y enzimas encargadas del metabolismo de lípidos y carbohidratos



INTRODUCCIÓN

- Wallflower: *Erysimum linifolium*
- Familia *Brassicaceae*
- Cercana a *Arabidopsis thaliana*
- Importancia económica
- Pétalos grandes y pigmentados



ANTECEDENTES

“Gene expression patterns to define stages of post-harvest senescence in *Alstroemeria* petals”

Emily Breeze¹, Carol Wagstaff², Elizabeth Harrison¹, Irene Bramke¹, Hilary Rogers², Anthony Stead³, Brian Thomas¹, and Vicky Buchanan-Walston¹

¹Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick

²Cardiff School of Biosciences, Main Building, Cardiff

³School of Biological Sciences, Royal Holloway, U. of London

ANTECEDENTES

“Senescence or ageing in wallflower petals?”

Anna Marie Price, 2004

“Gene expression during floral senescence in wallflowers (*Erysimum linifolium*)”

Rosemary Acock, 2005

OBJETIVOS PROYECTO

• OBJETIVO GENERAL

- ✓ Introducir el uso de herramientas biotecnológicas para conocer los mecanismos básicos y los genes involucrados durante la poscosecha de plantas ornamentales.

OBJETIVOS PROYECTO

• OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Adquirir una base metodológica en genómica funcional en plantas ornamentales.
- ✓ Desarrollar acuerdos de cooperación con el grupo Molecular Cell Biology de Cardiff University y con otros centros de Investigación.
- ✓ Difundir la experiencia obtenida en el medio, para su implementación y desarrollo en el país.

OBJETIVOS ACTIVIDAD

• OBJETIVO GENERAL

- ✓ Identificar genes relacionados con la senescencia de hojas y pétalos de *Erysimum linifolium*.

OBJETIVOS ACTIVIDAD

• OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extraer RNA y luego obtener cDNA desde distintos estados de desarrollo de hojas y pétalos de *Erysimum linifolium*
- ✓ Optimizar condiciones de PCR en función de partidores que amplifiquen para genes específicos descritos previamente en *Arabidopsis thaliana*
- ✓ Identificar la presencia en el genoma Wallflower de algunos genes descritos previamente en *Arabidopsis spp.*
- ✓ Conocer en detalle los patrones de expresión de genes seleccionados, durante la senescencia de "Wallflower"

ACTIVIDAD

✓ SECUENCIACIÓN

✓ PCR - EXPRESIÓN GÉNICA

SECUENCIACIÓN Antecedentes

- Hibridación mediante supresión substractiva
Suppression Subtractive Hybridization (SSH)
- Microarray

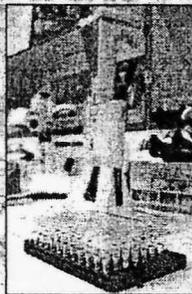
	Petal down ↓	Petal flat —	Petal up ↑
Leaf down ↓	pd ld	pf ld	pu ld
Leaf flat —	pd lf	pf lf	pu lf
Leaf up ↑	pd lu	pf lu	pu lu

SECUENCIACIÓN Materiales y métodos

- 192 clones seleccionados :
 - Petal up / Leaf up (pu lu) 126
 - Petal up / Leaf flat (pu lf) 50
 - Petal up / Leaf down (pu ld) 2
 - Petal flat / Leaf up (pf lu) 13
 - Petal flat / Leaf flat (pf lf) 1
- Stocks de glicerol (-80 C)
- Insertos en bacterias (*E. coli*)

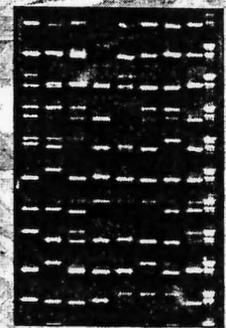
SECUENCIACIÓN Materiales y métodos

- Condiciones de PCR
 - 95 °C 10 min
 - 95 °C 1 min
 - 56 °C 1 min
 - 72 °C 3 min
 - 72 °C 10 min
 } 40 ciclos
- Partidores: M13 F y M13 R
- 100 ul volumen final



SECUENCIACIÓN Materiales y métodos

- "Stretch" Gel
(Agarosa 2%)
- Fotografía
- Análisis



SECUENCIACIÓN Resultados

3. P1 F7 (pu lu)



• Putative senescence-specific cysteine protease SAG12 [Arabidopsis thaliana]

• 346 aa

• 3e-47

4. P2 D2 (pu lu)

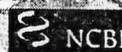
• Putative senescence-specific cysteine protease SAG12 [Arabidopsis thaliana]

• 346 aa

• 1e-88

SECUENCIACIÓN Resultados

5. P2 D 7 (pu lu)



• Putative cytochrome P450 [Arabidopsis thaliana]

• 512 aa

• 3e-32

6. P3 B1 (pu lu)

• No hits found

SECUENCIACIÓN Resultados

7. P4 B9 (pu lu)



• Glutathione S-transferase 3 [Brassica juncea]

• 213 aa

• 6e-58

8. P5 H3 (pu lu)

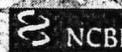
• Proton-dependent oligopeptide transporter [Arabidopsis thaliana]

• 614 aa

• 4e-46

SECUENCIACIÓN Resultados

9. PL F10 (pu lu)



• F22G5.2 [Arabidopsis thaliana]

• 110 aa

• 5e-10

10. PL H7 (pu lu)

• Unknown protein [Arabidopsis thaliana]

• 187 aa

• 1e-19

ACTIVIDAD

✓ SECUENCIACIÓN

✓ PCR - EXPRESIÓN GÉNICA

MATERIALES y MÉTODOS Material Vegetal

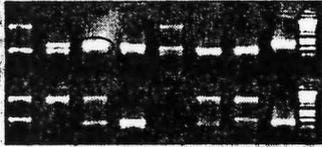
7 Estados de desarrollo en Hojas
- L1, L2, L3, L4, L5, L6 y L7

8 Estados de desarrollo en Pétalos
- 2, 10, +1, +2, +3, +4 y +5

Price (2004)

SECUENCIACIÓN Resultados

- Clones NO amplificados: 28
- Clones amplificados con DOS bandas: 25
- Clones amplificados CORRECTAMENTE: 139



SECUENCIACIÓN Resultados

- Clones NO amplificados: 28

- ✓ Solución: Bacterial growth
- ✓ 3 ml LB medium + 3 ul antibiotic [50mg/ml] ampicillin

➤ Resultados

- 11 Clones crecieron con éxito
- 8 Clones amplificaron



SECUENCIACIÓN Resultados

- Clones amplificados con DOS bandas: 25

- ✓ Solución : Disminuir el número de ciclos
- ✓ 40 a 35 ciclos

➤ Resultados : 10 Clones amplificados



SECUENCIACIÓN Resultados

- Clones amplificados CORRECTAMENTE: 139

- 96 clones seleccionados para secuenciamento

- 48 pu lu
- 39 pu lf
- 9 pf lu

- Purificados por vacío (Cleaned by Vacuum)

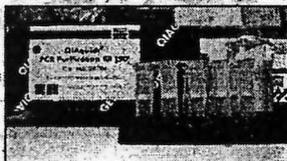
- Enviados a Warwick

SECUENCIACIÓN Resultados

- Clones amplificados restantes : 61

- 10 clones seleccionados para secuenciamento en Cardiff University

- Purificados individualmente (QIAquick PCR purification kit)



SECUENCIACIÓN Resultados

- NCBI Sequence Viewer v2.0



1. L2 D9 (pu lu)

- Beta-glucosidase-like protein [Arabidopsis thaliana]

• 577 aa

• 2e-39

2. L3 G5 (pf lu)

- Hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]

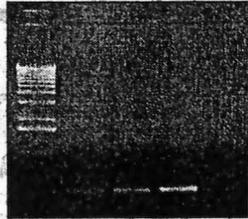
• 336 aa

• 2e-43

MATERIALES y MÉTODOS

Optimización de PCR

Concentración de cDNA

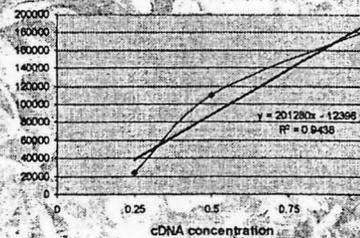


Petal Mix amplified with PUV primer

MATERIALES y MÉTODOS

Optimización de PCR

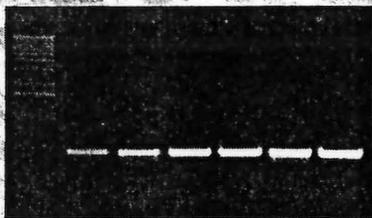
Concentración de cDNA



MATERIALES y MÉTODOS

Optimización de PCR

Número de ciclos

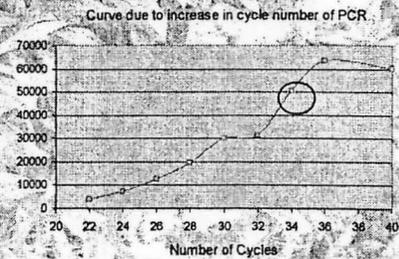


Petal Mix amplified with PUV primer

MATERIALES y MÉTODOS

Optimización de PCR

Número de ciclos



MATERIALES y MÉTODOS

Amplificación

Hojas (cDNA)
L1, L2, L3, L4, L5, L6 y L7

Pétalos (cDNA)
- 2-, 10-, +1-, +2-, +3-, +4 y +5

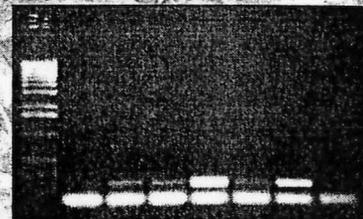
X

LP H9
P1 F4
SAG 12
WGST

MATERIALES y MÉTODOS

Análisis de la Amplificación

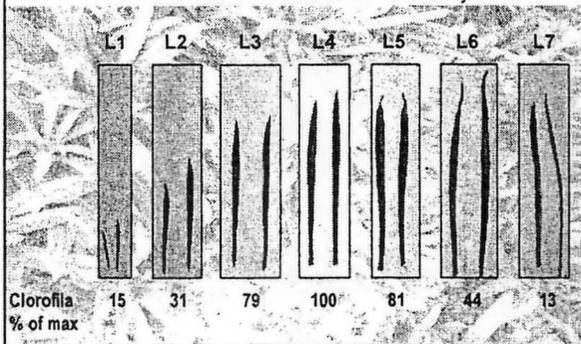
3 exposiciones de luz para cada gel



7 leaf stages with P1.F4 primer

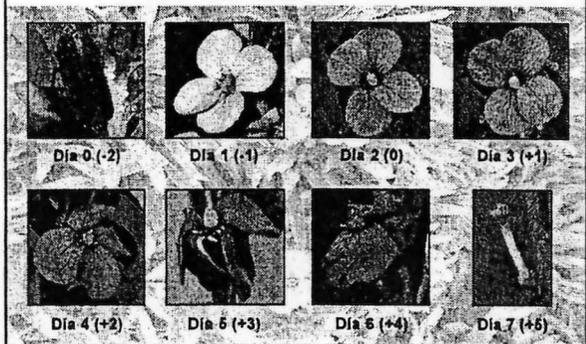
MATERIALES y MÉTODOS

7 estados de desarrollo en Hojas



MATERIALES y MÉTODOS

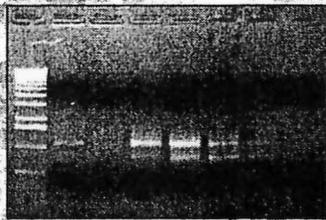
8 estados de desarrollo en Pétalos



MATERIALES y MÉTODOS

Extracción de ARN

- Método "TRI REAGENT"
- Electroforesis y Espectrofotometría



MATERIALES y MÉTODOS

DNase y Síntesis de cDNA

- | | | |
|------------------|---|------------------------------|
| RNA | } | Tratamiento DNase |
| RQ1 DNase Buffer | | |
| RQ1 DNase | | |
| RNA | } | RT - PCR
Síntesis de cDNA |
| M-MLV Buffer | | |
| M-MLV Enzima | | |
| Otros ... | | |

MATERIALES y MÉTODOS

Elección de partidores

- LP H9
- P1 F4
- SAG 12
- WGST

Genes involucrados en la senescencia de hojas y pétalos identificados previamente en *Arabidopsis thaliana* y homologados para *Erysimum linifolium*.

MATERIALES y MÉTODOS

Optimización de PCR

- Temperatura de Annealing

Ej: P1 F4 F: 60 °C / P1 F4 R: 56 °C

55 °C



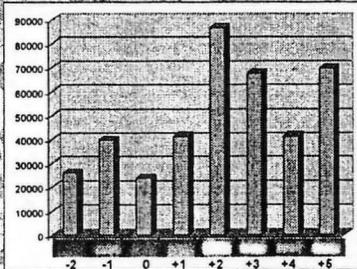
58 °C



MATERIALES y MÉTODOS

Análisis de Datos

Construcción de Gráficos



MATERIALES y MÉTODOS

Análisis de Datos

"Normalizado" con PUV

Expresado como % respecto al máximo

Ej: SAG 12 en Hojas (R 1)

Rawval	Sample	DV	PUV (max)	Result	% MAX
15342	L1	5806	1.83	4005.55	9.97
18870	L2	7374	3.00	7374.00	8.25
37896	L3	8450	1.42	11983.24	13.41
46485	L4	18849	1.21	20555.80	23.01
37928	L5	8392	1.59	13369.02	14.98
63727	L6	34191	1.60	51445.17	57.68
110318	L7	80778	1.11	89339.49	100.00
29538	(-)	0			

MATERIALES y MÉTODOS

Análisis de Datos

3 Repeticiones para cada partidor

Barras de error estándar

Ej: WGST en Pétalos (R 1, R2 and R3)

Sample	R 1	R 2	R 3	Average	STDEV	SE
(-) 2	22.84	50.70	70.11	50.70	23.87	16.89
(-) 1	32.65	63.90	53.25	52.77	15.77	11.65
0	102.0	32.75	17.02	21.23	11.53	8.15
(+) 1	85.48	43.59	52.35	64.12	22.09	15.62
(+) 2	100.00	100.00	82.84	100.00	9.85	8.97
(+) 3	87.81	94.44	49.01	74.67	22.83	16.14
(+) 4	33.49	49.61	66.92	53.02	18.72	11.82
(+) 5	35.47	75.06	100.00	74.41	32.54	21.01

RESULTADOS

Partidores Amplificados: RESUMEN

	LP H9	P1 F4	SAG 12	WGST
HOJAS	Rogers, '05	Aros, '06	Aros, '06	Aros, '06
PETALOS	Aros, '06	Price, '04	Price, '04	Aros, '06

RESULTADOS

LP H9

CLASE FUNCIONAL: Factor Transcripcional

CARACTERÍSTICAS:

- Familia de proteínas que actúan como represores transcripcionales
- Además tienen actividad como RNAsa
- En *Arabidopsis spp* está asociada a la regulación del etileno

ANTECEDENTES:

- En *Arabidopsis spp* aumenta durante senescencia de hojas

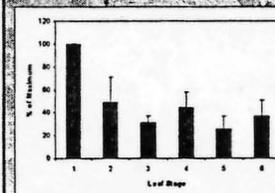
RESULTADOS:

- Aumenta sólo en pétalos (Gráfico)
- Sugiere un rol más significativo durante la senescencia de pétalos

RESULTADOS

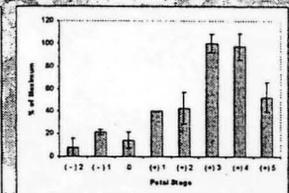
LP H9

HOJAS



(Rogers, 2005)

PÉTALOS



(Aros, 2006)

RESULTADOS P1 F4

CLASE FUNCIONAL: Transportador de péptidos

CARACTERÍSTICAS:

- Proteínas encargadas del transporte de oligopéptidos "proton dependientes" (POT)
- Removilización de péptidos desde proteínas degradadas

ANTECEDENTES:

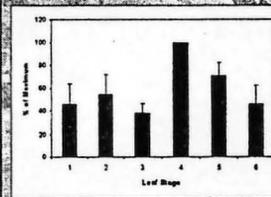
- En *Arabidopsis* spp aumenta su expresión durante senescencia de hojas. Alta expresión en raíces

RESULTADOS:

- Aumenta en hojas y pétalos
- Sugiere un rol general de removilización durante senescencia

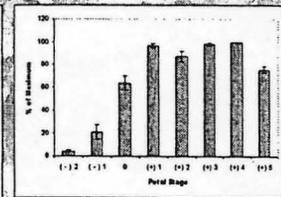
RESULTADOS P1 F4

HOJAS



(Aros, 2006)

PÉTALOS



(Price, 2004)

RESULTADOS SAG 12

CLASE FUNCIONAL:

- Cysteine Protease

CARACTERÍSTICAS:

- Sólo encontrada en *Arabidopsis* spp y otras Brassicaceae

ANTECEDENTE:

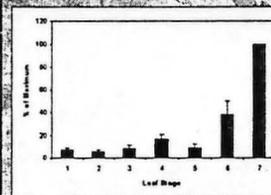
- Aumenta en hojas senescentes

RESULTADOS:

- Aumentó en hojas y pétalos durante senescencia

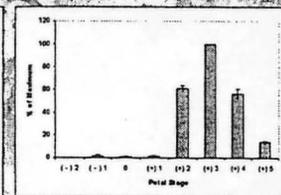
RESULTADOS SAG 12

HOJAS



(Aros, 2006)

PÉTALOS



(Price, 2004)

RESULTADOS WGST

CLASE FUNCIONAL: Glutathione S-transferase (GST)

CARACTERÍSTICAS:

- Corresponde a una superfamilia de enzimas
- Detoxificar a la célula agregando Glutathionina a un sustrato electrofilico. El producto es luego transportado a las vacuolas.
- Distintos GSTs tienen diferentes sustratos específicos, comúnmente desconocidos

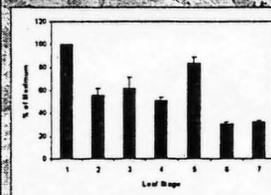
ANTECEDENTES: Aumentan durante la senescencia de hojas y pétalos

RESULTADOS:

- Aumentan en pétalos pero disminuyen en hojas (Gráfico)
- Sugiere un rol específico durante la senescencia de pétalos, quizás como detoxificación por ej. de pigmentos

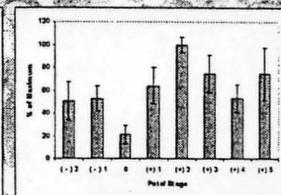
RESULTADOS WGST

HOJAS



(Aros, 2006)

PÉTALOS



(Aros, 2006)

CONCLUSIONES

Preliminares

❑ La senescencia es un proceso que comienza en estados tempranos de desarrollo, antes de que puedan observarse cambios morfológicos significativos

❑ Aún cuando los mecanismos de senescencia son similares en hojas y pétalos, existen diferencias en la expresión de los genes involucrados durante este proceso

OTROS

Resultados

❑ Contacto con Centros de Investigación

• Dr. Hilary Rogers

Cardiff University - School of Biosciences



• Dr. Vicky Buchanan-Wollaston

Horticulture Research International, Warwick



• Dr. Anthony Stead

Royal Holloway University of London



OTROS

Resultados

A comparison of leaf and petal senescence in wallflowers (*Erysimum linifolium*) reveals common and distinct patterns of gene expression and physiology.

A.M. Price¹, V. Buchanan-Wollaston², A. D. Stead³, D. F. Aros Orellana¹, R. Stevens¹, R. Accock¹ and H.J. Rogers^{1*}

¹Cardiff School of Biosciences, Main Building, Park Place, Cardiff CF10 3TL

²Warwick HRI (Wellesbourne), Wellesbourne, Warwick, Warwickshire, CV35 9EF

³School of Biological Sciences Royal Holloway, University of London Egham, Surrey, TW20 0EX

PERSPECTIVAS

✓ Postcosecha: Desafío para la industria nacional

✓ Mejoramiento Genético

✓ Otros atributos: Ej. Aroma, etc.



GRACIAS

