FBT01-1-001

GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

CONTENIDO DEL INFORME TÉCNICO

PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre: Formación de profesionales en técnicas de genómica funcional

Código: *F01-1-BT-001*

Entidad Responsable Postulante Individual: Pontificia Universidad Católica de Chile

Coordinador: María Loreto Holuigue Barros

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad):
Perpignan. Francia (estadia1)
Gent. Bélgica (estadía 2)

Tipo o modalidad de Formación: pasantías de formación

Fecha de realización
21 Octubre 2001- 01 Marzo 2002
15 Octubre 2001- 01 Abril 2002

Participantes: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Nombre	Institución/Empresa	Cargo/Actividad	Tipo Productor
Paula Salinas Salvo	Pontificia Universidad Católica	Tesista de Doctorado	
Francisca Blanco Herrera	Pontificia Universidad Católica	Tesista de Pregrado	

PROGRAMA DE FORMACION
Recepcionado 30/5/02
Nº Ingreso 135

GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

INSTRUCTIVO PARA LA PREPARACIÓN DEL INFORME TÉCNICO

PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA AÑO 2001

La Fundación para la Innovación Agraria (FIA) del Ministerio de Agricultura tiene la función de fomentar y promover la transformación productiva de la agricultura y de la economía rural del país. Para el cumplimiento de esta función proporciona financiamiento, impulsa y coordina iniciativas, programas o proyectos orientados a incorporar innovación en los procesos productivos, de transformación industrial o de comercialización en las áreas agrícola, pecuaria, forestal y dulceacuícola. En el marco de estos objetivos, FIA desarrolla actualmente cuatro líneas de acción fundamentales: Financiamiento a Proyectos de Innovación, Programas de Giras Tecnológicas y Consultores Calificados e iniciativas de Formación para la Innovación.

El objetivo del Programa de Formación para la Innovación Agraria es impulsar acciones orientadas a mejorar el nivel de formación de productores, profesionales y técnicos, de manera de fortalecer el proceso de innovación en el sector agrario chileno.

Para el logro de este objetivo este programa opera mediante el apoyo financiero para:

- la **participación** de productores, profesionales y técnicos del sector, en cursos cortos, cursos de especialización o perfeccionamiento, pasantías, seminarios o congresos y ferias o eventos organizados por instituciones o empresas nacionales o extranjeras.

- la **realización** de eventos, pasantías y otros eventos técnicos que se consideren necesarios para el desarrollo de un determinado rubro, pero que no se estén realizando actualmente en el país. El diseño de los eventos, sus objetivos y las materias que se busque abordar corresponderán a aquellas en las cuales no exista actualmente oferta en el país.

Con la aprobación de las propuestas por parte de FIA, la Entidad Responsable de ésta adquiere entre otros los siguientes compromisos:

- Emitir un **Informe Técnico, Financiero y de Difusión** en un plazo de 30 días después de terminada la última actividad de transferencia.

- Proporcionar a esta Fundación una copia de todo el material o documentación recopilado durante la actividad de formación, incluyendo copia del material audiovisual.

Los informes deben ser presentados en disquete y en papel (tres copias) de acuerdo a los formatos establecidos por FIA y en la fecha indicada como plazo de entrega en el contrato firmado con la Entidad Responsable.

En la eventualidad de que los compromisos antes señalado no se cumplan, **FIA procederá a ejecutar la garantía respectiva y tanto la persona natural como la Entidad Responsable y**

el grupo participante, quedarán imposibilitados de participar en nuevas iniciativas apoyadas por los diferentes Programas e instrumentos de financiamiento de FIA.

A continuación se entregan las instrucciones para la preparación del Informe Técnico del Programa de Formación para la Innovación Agraria, con el propósito de guiar a la Entidad Responsable o persona natural sobre el contenido a desarrollar en el informe y el formato de presentación de la información.

Problema a Resolver: detallar brevemente el problema que se pretendía resolver con la participación en la actividad de formación, a nivel local, regional y/o nacional.

El ácido salicílico (SA) actúa en plantas como una hormona que es producida en respuesta a determinadas condiciones de estrés ambiental como son la infección por patógenos, el aumento del ozono ambiental y el aumento de la irradiación UV (Yalpani y cols., 1994; Durner y cols., 1997). El papel fundamental del SA en el estrés celular ha sido caracterizado en mayor profundidad en la reacción de defensa inducida por patógenos (Durner y cols., 1997). En esta reacción se ha descrito que el SA, en conjunto con las ROS, cumplen un papel fundamental en orquestar la defensa celular al estrés (Draper, 1997; Durner y cols., 1997; Van Camp y cols., 1998; Grant y Loake, 2000). En la reacción de defensa, se producen dos procesos fundamentales: **reacción de hipersensibilidad (HR)** (Greenberg, 1997),que es una muerte celular programada de las células infectadas por el patógeno orientada a circunscribir el patógeno a esa área y provocar posteriormente su muerte. Además de esta reacción local, el patógeno induce una reacción sistémica en la planta, denominada **resistencia sistémica adquirida (SAR)** (Hunt y cols., 1996). Esta reacción está orientada tanto a inmunizar a la planta contra una futura infección secundaria por el mismo u otro patógeno, como de protegerla del estrés oxidativo generado por el aumento de ROS (Hunt y cols., 1996; Alvarez y cols., 1998). A nivel molecular, esto se refleja en la activación transcripcional de genes con actividad antimicrobiana, como los **genes *PR*** que codifican para proteínas relacionadas con patogenicidad, y de genes con actividad antioxidante y detoxificante (Maleck y cols., 2000).

La línea de investigación en la cual se enmarca nuestro proyecto pretende dilucidar de qué forma el ácido salicílico (SA) contribuye a modular el estrés oxidativo generado por estímulos ambientales en células vegetales. En nuestro grupo estamos interesados en conocer el **mecanismo molecular por el cuál el Ácido Salicílico activa la transcripción de genes con actividad antioxidante y detoxificante.**

Como hipótesis general de trabajo postulamos que el SA activaría en forma temprana y transiente la transcripción de un grupo de genes en forma concertada. Dentro de este grupo se encontrarían, además de los genes *GST*, otros genes que cumplirían una función protectora contra el estrés oxidativo celular. La activación concertada se debería a que estos genes constituirían un regulón, lo que se reflejaría en la presencia de elementos comunes de respuesta a SA a nivel de sus secuencia promotoras. A su vez, el SA activaría la transcripción de estos genes a través de la generación de ROS, las que actuarían como señales para activar los elementos de respuesta.

Para evaluar nuestra hipótesis, proponemos como primer objetivo utilizar tecnología de ***microarrays*** de cDNAs de *Arabidopsis thaliana*, para obtener los perfiles de expresión de miles de genes en forma simultánea, luego del tratamiento inductor con SA. Como segundo objetivo nos proponemos identificar, dentro de las secuencias promotoras de los genes que se activan, los elementos de regulación comunes que sean responsables de la respuesta a SA. Para ello se combinará la utilización de ensayos funcionales de transcripción in vivo en plantas transgénicas y de unión DNA-proteína mediante ***footprinting in vivo*** y geles de retardo.

Objetivos de la Propuesta

2. Antecedentes Generales: describir si se lograron adquirir los conocimientos y/o experiencias en la actividad en la cual se participó (no más de 2 páginas).

Pasantía 1.Perpignan, Francia.

Footprinting in vivo es una técnica utilizada para el análisis de las secuencias reguladoras presente en los promotores de los genes que son activados luego de un determinado estímulo. La característica principal de esta técnica es que se puede analizar la interacción proteína-DNA lo mas cercano posible a la situación *in vivo*. En este contexto nos pareció interesante manejar esta técnica para poder analizar la unión de proteínas a las secuencia presentes en los genes que se activan tempranamente en respuesta a un alza de la concentración de SA . En la estadía en Perpignan se realizaron tres experimentos de *footprinting in vivo* para analizar la secuencia promotora del gen Glicosil transferasa (gen de activación temprana por SA). Estos experimentos se realizaron en forma conjunta con el doctor Jean Philippe Reichheld, especialista en este tipo de experimentos en el laboratorio de Perpignan. Si bien no pudimos obtener resultados concretos acerca de éste promotor, sí podemos decir que estandarizamos a cabalidad la técnica y en estos momentos estamos implementándola en nuestro laboratorio. Un hecho importante es que tuve la oportunidad de discutir acerca de las posibles dificultades que encontramos y que podríamos enfrentar en el futuro. Este hecho ha sido fundamental en la actualidad para la realización satisfactoria de esta técnica en nuestro laboratorio en Chile.

Pasantía 2. Gent. Bélgica

AFLP- TP es una versión mejorada del método cDNA-AFLP descrito por Bachem y colaboradores (Plant J. 9: 745-753, 1996) . AFLP- TP es una técnica de expresión del genoma completo en la cual se analizan todos los genes involucrados en un proceso biológico particular o expresados bajo cierta condición. En nuestro caso, esta condición es el tratamiento a tiempos tempranos con Acido Salicílico, lo cual imita la principal respuesta de la planta frente al ataque por patógenos y en el montaje de la respuesta de hipersensibilidad (HR) gatillada en la planta.

Esta técnica nos permitirá dilucidar los genes que están involucrados en esta vía y posteriormente caracterizar esta última con el complemento de la técnica aprendida en la pasantía 1, **footprinting** *in vivo*.

Brevemente, la técnica AFLP- TP consiste en el análisis mediante geles de poliacrilamida de fragmentos únicos derivados de la región 3' de genes expresados que son amplificados por PCR (polymerase chain reaction). La amplificación selectiva de un subpoblación de segmentos de transcritos seguido del fraccionamiento del pool inicial de fragmentos y la detección de fragmentos de baja abundancia. Debido a que es una técnica basada en PCRs y al fraccionamiento de la población inicial, la sensibilidad es significativamente mayor comparada a otras técnicas incluyendo Microarrays.

3. Itinerario Realizado: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Fecha	Actividad	Objetivo	Lugar
15-10-01	Montaje del protocolo de la técnica **AFLP-TP**	Análisis del transcriptoma de Arabidopsis en la vía de SA temprana	Universidad de Gent. Bélgica
21-10-01	Montaje del protocolo de la técnica **footprinting** *in vivo*	Análisis de un promotor modelo de un gen involucrado en la vía de SA temprana	Universidad de Perpignan. Francia

Señalar las razones por las cuales algunas de las actividades programadas no se realizaron o se modificaron.
La idea inicial de la pasantía 2, fue realizar análisis de Microarrays. Comenzada esta estadía se discutió acerca del costo- beneficio que nos ofrecía esta técnica y de su aplicabilidad a nivel nacional y se decidió montar el protocolo y llevar a cabo los experimentos utilizando una nueva técnica, AFLP-TP (amplified fragment length plymorphism based trancript profiling), que por sus características nos ofrecía mayor sensibilidad y accesibilidad versus la misma cantidad de información.
La decisión tomada fue la correcta y los resultados obtenidos con esta técnica han sido sumamente buenos y provechosos. AFLP-TP es una técnica de genómica funcional, pero más sensible que los análisis de Microarrays (esta técnica fue explicada en el item anterior)

4. Resultados Obtenidos: descripción detallada de los conocimientos adquiridos. Explicar el grado de cumplimiento de los objetivos propuestos, de acuerdo a los resultados obtenidos. Incorporar en este punto fotografías relevantes que contribuyan a describir las actividades realizadas.

Se realizaron tres experimentos de *footprinting in vivo* del promotor del gen de la enzima glicosil transferasa utilizando células en cultivo de *Arabidopsis thaliana*. En ninguno de los tres intentos de obtuvo resultados concretos acerca de las secuencias que estaban siendo protegidas por la unión de proteínas. Se discutieron estos resultados con la persona experta en este tipo de experimentos y la conclusión fue que la purificación del DNA de células era un punto esencial en los experimentos y que el diseño y la purificación de los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones por PCR de la técnica no eran los correctos. Por esta razón se diseñaron nuevos oligonucleotidos, se purificará el DNA por columnas de intercambio aniónico y se extremarán las condiciones que pudieran influir en la obtención de un buen resultado. Los experimentos con las modificaciones requeridas no fueron realizados en Francia por el escaso tiempo con el que contamos, por lo que se realizarán en nuestro laboratorio y manteniendo contacto por e-mail con el Dr. Reichheld en caso de cualquier problema que se presentase.

En primer lugar fue montado el protocolo de AFLP- TP en *Oryza sativa,* cereal de alto valor comercial en países de Asia y Sudamérica por lo que en Europa resulta de gran interés el conocer las vías reguladoras y los factores que afectan su crecimiento bajo condiciones de inundación. El tratamiento fue someter plantas de arroz de 15 días a submersión en probetas de vidrio por tiempos tempranos (15 min, 30 min., 1h, 4h, 24h y 48h). Se extrajo RNA y se realizó el protocolo de AFLP- TP (protocolo adjunto) y se obtuvieron 5 secuencias de cDNA que resultaron interesantes por su cinética de activación. El análisis de estas secuencias quedó en manos del grupo de la Dra. Dominique Van der Straeten.
Debido a que nuestro grupo trabaja en la vía temprana de SA, plantas de *Arabidopsis thaliana* de 15 días fueron sometidas a tratamientos de SA 0.5mM por tiempos cortos (15 min., 30 min., 1h, 2.5h y 5h) se extrajo el RNA y se realizó el protocolo de AFLP- TP, los resultados parciales de este experimento resultaron en la obtención de 12 secuencias que fueron comparadas con los bancos de datos del genoma de *Arabidopsis*. Esta búsqueda arrojo un total de 12 genes sumamente interesantes por sus patrones y cinéticas de expresión (la tabla de resultados se adjunta como material).
En estos momentos el sistema se reprodujo en nuestro laboratorio y esperamos obtener resultados sumamente interesantes a corto plazo.

5. Aplicabilidad: explicar la situación actual del rubro en Chile (región), compararla con la tendencias y perspectivas en el país (región) visitado y explicar la posible incorporación de los conocimientos adquiridos, en el corto, mediano o largo plazo, los procesos de adaptación necesarios, las zonas potenciales y los apoyos tanto técnicos como financieros necesarios para hacer posible su incorporación en nuestro país (región).

Con la masiva secuenciación de los genomas de distintos organismos y de especial interés para nuestro grupo de trabajo, el genoma de *Arabidopsis thaliana*, es de vital importancia e interés el aprendizaje de las técnicas de Genómica funcional para la comprensión e integración de los procesos biológicos y moleculares de distintos organismos.
En estos momentos la técnica de AFLP- TP ha cobrado gran relevancia en las investigaciones que se están llevando a cabo en la universidad de Gent, Bélgica (http://www.plantgenetics.rug.ac.be). A nivel regional, en Santiago, ningún grupo de investigación está trabajando con esta técnica lo cual nos ofrece una oportunidad única de difundir y enseñar esta técnica aprendida.
Los protocolos se están montando en estos minutos en nuestro grupo de trabajo en la Pontificia Universidad Católica y una vez demostrada la aplicabilidad de ésta a nuestra realidad, será factible que otros grupos de adhieran a la utilización de AFLP- TP ya que es una tecnología que nos permite el análisis cuantitativo de perfiles de expresión de fragmentos de restricción provenientes de cada cDNA de cualquier organismo vivo.

Con la identificación de distintos genes expresados en forma concertada es de gran interés para nosotros identificar los elementos reguladores presentes en los promotores que definen esta expresión, es así que la técnica de *footprintig in vivo* adquiere una gran relevancia. En estos momentos en Chile no se realiza esta técnica por no poseer los conocimientos necesarios para su implementación. Las publicaciones que hay al respecto en plantas son en el estudio de promotores de histonas y de otros factores de transcripción en células de tabaco y maíz y genes de expresión inducida por ácido absísico en maíz. En estos momentos en Perpignan, el doctor Reichheld realiza el estudio de promotores de tiorredoxinas inducidos ácido absísico en células de *Arabidopsis*. La información que esta técnica entrega es de gran importancia ya que conocer las secuencias que regulan la expresión de genes pueden proveernos de herramientas moleculares para realizar la modificación genética de plantas con genes que se expresen en un momento y lugar definido. Además, el aporte al conocimiento de los procesos moleculares de las células es invaluable. Por esta razón por lo que cada vez mas grupos de investigación están tratando de implementarla en sus laboratorios.
En este momento, con el conocimiento y los contactos obtenidos en Francia, se esta implementando en nuestro laboratorio la técnica de footprinting en vivo para el análisis de los promotores de los genes inducidos tempranamente por SA . Además se esta evaluando la utilización de esta técnica para el análisis de los promotores de las enzimas succinato deshidrogenasa en plantas de *Arabidopsis*, línea de investigación del doctor Xavier Jordana.

El financiamiento de este tipo de experimentos se esta realizando con fondos del proyecto FONDECYT en líneas complementarias número 8980005 de la Dra. Loreto Holuigue, Dr. Xavier Jordana y Dr. Patricio Arce y el proyecto de ayuda para la realización de la tesis doctoral de Paula Salinas. Además, el grupo de biología molecular de plantas de nuestra Universidad obtuvo el financiamiento para realizar un proyecto de genómica funcional en vides que lleva por título "Estudios genómicos y de expresión genética en vides: Respuesta a la infección viral y desarrollo de sistemas de diagnosis", financiado por el PROGRAMA GENOMA CHILE CONICYT. En este proyecto serán de gran utilidad las técnicas de footprinting in vivo y principalmente la técnica de AFLP-TP para el estudio de patrones de expresión génica en vides.

Con estos proyectos de investigación y la implementación técnica que posee el laboratorio de bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Chile, ambas técnicas podrán ser implementadas a un corto plazo y los resultados en cuanto a publicaciones científicas a un mediano plazo.

6. Contactos Establecidos: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Institución/Empresa	Persona de Contacto	Cargo/ Actividad	Fono/Fax	Dirección	E-mail
Universidad de Gent	Dominique Van der Straeten	Profesor titular	32 (0)9 264 51 85 Fax: +32 (0)9 264 53 33	K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium	Dostr@gengenp.rug.ac.be
Universidad de Perpignan	Manuel Echeverría	Profesor titular	Tel: (33) 04 68 66 21 32 Fax: (33) 04 68 66 84 99	Laboratoire Génome et Dévellopement des Plantes UMR CNRS 5096 Université de Perpignan 66860 Perpignan Cedex	manuel@univ-perp.fr
Universidad de Perpignan	Jean Philippe Reichheld	PhD. investigador C.N.R.S	Fax: (33) 04 68 66 84 99	Laboratoire Génome et Dévellopement des Plantes UMR CNRS 5096 Université de Perpignan 66860 PerpignanCedex	jpr@univ-perp.fr

7. Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar: señalar aquellas iniciativas detectadas en la actividad de formación, que significan un aporte para el rubro en el marco de los objetivos de la propuesta, como por ejemplo la posibilidad de realizar nuevos cursos, participar en ferias y establecer posibles contactos o convenios. Indicar además, en función de los resultados obtenidos, los aspectos y vacíos tecnológicos que aún quedan por abordar para la modernización del rubro.

La posibilidad de regresar al laboratorio de genética molecular de plantas en la Universidad de Gent, quedó abierta debido al buen contacto que significa la Dra. Dominique Van der Straeten (ver curriculum en la página web de la universidad adjunta anteriormente). Resultaría interesante realizar los análisis estadísticos de los resultados que se obtendrán y de los ya obtenidos con la técnica de AFLP- TP además de complementar y compartir información con otras vías de señalización dadas por otras hormonas (Etileno) en plantas que en estos minutos están siendo estudiados por grupos de Gent y por supuesto la posibilidad de publicaciones en conjunto. En cuanto al laboratorio en Francia quedó abierta la posibilidad de estadías no solo con el Dr. Echeverría sino que también con el Dr. Yves Meyer y Jean Philippe Reichheld en trabajos con estrés oxidativo. En estos momentos se esta postulando a nuevos fondos para una estadía en el laboratorio del Dr. Echeverría para realizar experimentos de localización subcelular en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. En resumen podemos decir que se

ha establecido una buena relación con un grupo importante en el área de Biología molecular de Plantas a nivel mundial, aporte esencial para nuestro laboratorio.

Con respecto a el apoyo tecnológico que existe en Chile, el principal problema que se ha encontrado hasta el momentos es la adquisición de los reactivos que se utilizan en los experimentos, especialmente en cuanto a la disponibilidad de estos en Chile y la dificultad para la compra en el extranjero, ya que algunos reactivos como el DMS y Piperidina son altamente tóxicos. Este problema existe no solo para la realización de estos experimentos sino que los científicos en Chile estamos sujetos a largas esperas para obtener un reactivo específico que no es de uso común. Sin embargo, ya se ha superado este inconveniente y en estos momentos estamos esperando la llegada de los últimos reactivos necesarios para empezar con los experimentos.

8. Resultados adicionales: capacidades adquiridas por el grupo o entidad responsable, como por ejemplo, formación de una organización, incorporación (compra) de alguna maquinaria, desarrollo de un proyecto, firma de un convenio, etc.

Ambas estadías establecieron contactos importantes que podrían llevar a la realización de nuevos proyectos en conjunto en los cuales se pueden desarrollar nuevas actividades que permitirán la modernización de la ciencia en Chile.
En cuanto a material biológico , el laboratorio de Perpignan compró dos líneas de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Estas plantas poseen mutaciones por T-DNA en el gen de la subunidad alfa de CK2. Estas líneas fueron donadas a Paula Salinas para la realización de su tesis de doctorado.

9. Material Recopilado: junto con el informe técnico se debe entregar un set de todo el material recopilado durante la actividad de formación (escrito y audiovisual) ordenado de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación (deben señalarse aquí las fotografías incorporadas en el punto 4):

Tipo de Material	Nº Correlativo (si es necesario)	Caracterización (título)
Protocolo	1	Protocolo footprinting in vivo
Protocolo	2	Protocolo de transfección de células
Foto	3	*timing* de expresión por northern blot de la glicosil transferasa en células de *Arabidopsis thaliana* con distintos (SA, 2,4D). foto de footprinting , resultados fallidos
artículo	4	"Multiregulation of histone gene expression during the cell cycle in tobacco cells" Jean Philippe Reichheld, Claude Gigot and Nicole Chaubet-Gigot
Protocolo	5	Protocolo AFLP- TP
Foto	6	Geles de acrilamida con 4

		combinaciones de primers distintas Mse- Bst. Los tratamientos son 11 (especificados en la fotografía).
artículo	7	"Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development"

10. Aspectos Administrativos

10.1. Organización previa a la actividad de formación

a. Conformación del grupo

_____ muy dificultosa __X__ sin problemas _____ algunas dificultades

(Indicar los motivos en caso de dificultades)

b. Apoyo de la Entidad Responsable

_X__ bueno _____ regular _____ malo

(Justificar)

c. Información recibida durante la actividad de formación

__X__ amplia y detallada _____ aceptable _____ deficiente

d. Trámites de viaje (visa, pasajes, otros)

__X__ bueno _____ regular _____ malo

e. Recomendaciones (señalar aquellas recomendaciones que puedan aportar a mejorar los aspectos administrativos antes indicados)

10.2. Organización durante la actividad (indicar con cruces)

Ítem	Bueno	Regular	Malo
Recepción en país o región de destino	X		
Transporte aeropuerto/hotel y viceversa	X		
Reserva en hoteles	X		
Cumplimiento del programa y horarios	X		

En caso de existir un ítem Malo o Regular, señalar los problemas enfrentados durante el desarrollo de la actividad de formación, la forma como fueron abordados y las sugerencias que puedan aportar a mejorar los aspectos organizacionales de las actividades de formación a futuro.

GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

11. Conclusiones Finales

11. **Conclusiones Individuales**: anexar las conclusiones individuales de cada uno de los participantes de la actividad de formación, incluyendo el nivel de satisfacción de los objetivos personales (no más de 1 página y media por participante).

Estadía 1:
Paula Salinas
Perpignan, Francia

Esta estadía en Francia tuvo muchos aspectos positivos para mi. Por un lado se logró el objetivo principal que fue aprender la técnica de footprinting in vivo, , aunque no se logró el resultado esperado, contamos con que el análisis del promotor de la enzima glicosil transferasa se realizará a corto tiempo en nuestro laboratorio en Chile, en este sentido, estamos comenzando con el análisis de éste promotor y de otros promotores de genes de inducción temprana, que es uno de los objetivos de la tesis de doctorado de Carolina Uquillas. Por lo tanto, se esta cumpliendo el objetivo de difusión de la experiencia adquirida en Francia a otros alumnos que trabajan en nuestro laboratorio. Además se logró gran interés en esta técnica de parte de mis compañeros de laboratorio y de los doctores jefes de grupos de investigación, lo cual asegura que el *footprinting in vivo* se utilizará como herramienta de trabajo para el estudio de otros procesos biológicos que ocurren en plantas.

Por otro lado, en forma paralela a los estudios de footprinting logré realizar experimentos de mutagénesis sitio dirigida de la subunidad catalítica de la Proteína Quinasa CK2, proteínas de fusión entre las distintas subunidades de esta proteína con la proteína fluorescente verde (GFP) y con la enzima bacteriana β glucuronidasa (GUS), para realizar experimentos de localización subcelular, parte de los objetivos de mi tesis de doctorado. El laboratorio de Perpignan también adquirió dos líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* en la subunidad catalítica de CK2, las cuales serán de gran utilidad para realizar estudios de funcionalidad de CK2 en la respuesta de defensa en las plantas.

Otro aspecto gratificante fue la experiencia de trabajar en un laboratorio extranjero, poder discutir acerca de resultados obtenidos con personas experta en biología molecular de plantas, contar con toda la infraestructura necesaria para realiza cualquier experimento, y además contar con el apoyo técnico de personas que desarrollan estas técnicas de punta de manera rutinaria es un aporte a mi formación como futuro científico.

Estadía 2:
Francisca Blanco
Gent, Bélgica

La presente estadía de formación fue de gran utilidad y beneficio tanto como para el actual proyecto que se tienen en el laboratorio como para los futuros, debido a que es una técnica aplicable a cualquier organismo vivo y si se tienen los controles necesarios es una herramienta que realmente ofrece mucha información a quien la practique. Muchas modificaciones han sido realizadas hasta la fecha desde que esta técnica fue desarrollada y el protocolo adjunto pertenece a la última versión hecha por el grupo de genética molecular de la universidad de Gent.

Aún cuando no se realizó específicamente la actividad descrita en un principio, ensayos de Microarrays (problemática antes descrita) se aprendió y montó esta tecnología de AFLP-TP cuyas ventajas sobre otras técnicas de genómica son considerables ya que es basado en la utilización de PCR de alta estrictez lo que permite la amplificación de fragmentos selectivos de RNAs mensajeros que específicamente se afectan bajo el tratamiento de SA 0.5mM a cortos tiempos lo que estaría imitando la respuesta de defensa temprana gatillada en la planta por el ataque de un patógeno.

Hasta este momento se tienen secuenciados e identificados 12 genes que estarían involucrados en este proceso biológico por ejemplo, Glicosil transferasa, que ha resultado sumamente interesante tanto como por la función biológica como por su cinética de expresión que se correlaciona perfecto con la upregulation de un gen GST6 de *Arabidopsis thaliana* que utilizamos como gen marcador de la cinética temprana de la vía de Salicilato. La tabla resumen de los genes secuenciados hasta este minuto y las combinaciones de primer con las que se obtuvo cada uno se especifican en la tabla que se adjunta en el material de apoyo.

En este minuto se están realizando el resto de las 114 combinaciones de as cuales ya se han realizado 16. En el transcurso de los siguientes dos meses se pretende dilucidar el transcriptoma de *Arabidopsis* gatillado por SA y así los componentes de la Vía temprana de SA.

Fecha: 29/5/02

Nombre y Firma coordinador de la ejecución: _____