

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DEL PROMOTOR DEL GEN CBF-1 DE
Eucalyptus globulus EN LA RESPUESTA A ESTRÉS POR FRÍO**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,
MENCIÓN QUÍMICA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

MÓNICA DEL CARMEN GUZMÁN REYES

PROFESOR GUIA

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

BARBARA ANDREWS FARROW

CLAUDIA STANGE KLEIN

ERWIN KRAUSKOPF POBLETE

SANTIAGO DE CHILE

2009

RESUMEN

En Chile, *Eucalyptus globulus* es una de las especies forestales de mayor importancia, debido a su rápido crecimiento y a la calidad de su madera. Estas características hacen que sea una especie de alto rendimiento y de principal interés para la industria de la celulosa. Sin embargo, la especie resulta extremadamente sensible a las bajas temperaturas, por lo que ocurren grandes pérdidas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus*. En este contexto, la biotecnología forestal se perfila como una herramienta eficaz para comprender y proponer soluciones a éste y a otros problemas.

En el plano de la investigación científica, se han realizado importantes avances en la determinación de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta a estrés por frío en *Eucalyptus globulus*. Entre ellos, el aislamiento y secuenciación de una serie de genes involucrados en este proceso, como el gen EgCBF-1. Este gen codifica para un factor de transcripción que es activado por frío y que es capaz de activar numerosos genes de respuesta a estrés abiótico.

En esta tesis se realizó un análisis estratégico que incluyó un recuento del panorama actual de la industria forestal chilena y los principales avances biotecnológicos atingentes. A través del análisis de la cadena de valor, se propuso un plan de negocios para la introducción de una variedad de *Eucalyptus globulus* tolerante a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena. Se determinó que las principales ventajas para el desarrollo de este proyecto son las políticas gubernamentales favorables que incentivan el desarrollo biotecnológico del sector forestal y la consistencia de la industria forestal chilena. Se determinó que las principales desventajas son la carencia de una metodología para la transformación de especies de eucaliptos y la escasez de información a nivel social y legislación relativa al uso de organismos genéticamente modificados.

La parte experimental de este trabajo de tesis se orientó al análisis funcional y estructural del promotor del gen EgCBF-1 en respuesta al estrés por frío. Se aisló y secuenció el promotor EgCBF-1 y se desarrollaron construcciones para estudios de funcionalidad. Se obtuvo una secuencia de 776 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen CBF-1 de *Eucalyptus globulus*, correspondiente a un segmento del promotor de dicho gen. En cuanto al análisis estructural, se confirmó la presencia de una serie de elementos de respuesta a estrés, entre ellos, cinco sitios de unión para el factor de transcripción EgICE-1, cuyo rol es clave en la respuesta al estrés provocado por las bajas temperaturas. Se determinó además, que éste y otros elementos de respuesta, están también presentes en promotores de genes ortólogos al promotor EgCBF-1.

Se utilizaron dos estrategias para evaluar la funcionalidad del promotor: ensayos de funcionalidad mediante transformación transitoria en *Nicotiana benthamiana* y ensayos en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. En ambos casos se utilizó el gen reportero GUS bajo el control del promotor en estudio.

Los ensayos de funcionalidad mediante expresión transitoria en plantas de *Nicotiana benthamiana*, no fueron concluyentes, debido a la aparente expresión constitutiva del gen reportero GUS controlado por el promotor EgCBF-1.

Los ensayos de funcionalidad en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* incluyeron evaluación histoquímica GUS y ensayos de expresión del gen GUS mediante RT-PCR. No fue posible evaluar la funcionalidad del promotor EgCBF-1 mediante reacción histoquímica GUS en plantas transgénicas, ya que en ningún caso fue posible observar actividad del reportero. Sin embargo, el análisis de expresión del gen GUS mediante RT-PCR confirmó la presencia de transcritos para el gen GUS, selectivamente en condiciones de estrés. Estos resultados permitieron corroborar la hipótesis propuesta.

El nivel de expresión del reportero en las tres líneas transgénicas evaluadas fue variable, tanto para los ensayos en frío como de exposición a ABA. Una de las causas que podría explicar este fenómeno es la inserción de la construcción en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, en distinto número de copias. Esto se corroboró mediante *Southern blot* y se determinó que la línea transgénica 1 posee al menos cuatro copias, la línea transgénica 2 al menos cinco copias y la línea transgénica 3 al menos tres copias.

La presencia de transcritos para el gen reportero GUS, la ausencia de actividad proteica del mismo reportero y el alto número de copias de inserción en las líneas transgénicas de *A. thaliana* evaluadas, permiten sugerir que podría haberse detonado un mecanismo de silenciamiento génico a nivel post transcripcional.

AGRADECIMIENTOS

Después de muchos años de trabajo, esta importante etapa de mi vida llega a su fin. Son muchas las personas que me han permitido llegar a buen término y no puedo dejar pasar esta oportunidad para agradecerles su incondicional apoyo.

En primer lugar, a la Fundación Ciencia para la Vida, por permitirme realizar este trabajo de tesis. Con especial respeto al Dr. Pablo Valenzuela y al Dr. Mario Roseblatt. A todos mis compañeros de laboratorio y en especial, al Dr. Erwin Krauskopf por el apoyo y la confianza.

En segundo lugar a mi familia, especialmente a mi mamá, a mi nanina y a mi hermana. Muchas gracias por su todo su amor, por acompañarme siempre, tanto en momentos difíciles como en los buenos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | 2 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | 5 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 10 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 13 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 14 |
| I. INTRODUCCIÓN | 16 |
| 1.1 ANTECEDENTES GENERALES..... | 16 |
| 1.1.1 <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i> Y EL SECTOR FORESTAL CHILENO | 16 |
| 1.1.2 ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS..... | 18 |
| 1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS | 18 |
| 1.2.1 EFECTOS DEL ESTRÉS POR FRÍO EN PLANTAS | 18 |
| 1.2.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA ACLIMATACIÓN AL FRÍO EN PLANTAS..... | 19 |
| 1.2.3 USO DE PROMOTORES REGULADOS EN EL DESARROLLO DE VARIEDADES VEGETALES TOLERANTES A LAS BAJAS TEMPERATURAS..... | 24 |
| 1.3 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO Y JUSTIFICACIÓN..... | 25 |
| 1.4 HIPÓTESIS..... | 25 |
| 1.5 OBJETIVOS | 26 |
| 1.5.1 OBJETIVO PRINCIPAL | 26 |
| 1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| II. METODOLOGÍA | 27 |
| 2.1 ESTRATEGIA DE TRABAJO | 27 |
| 2.2 METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS ESTRATÉGICO | 28 |
| 2.3 MATERIALES | 28 |
| 2.3.1 REACTIVOS GENERALES | 28 |
| 2.3.2 EQUIPOS..... | 29 |
| 2.3.3 ENZIMAS | 29 |
| 2.3.4 KIT COMERCIALES | 30 |
| 2.3.5 VECTORES DE CLONAMIENTO | 30 |
| 2.3.6 MEDIOS DE CULTIVO | 31 |
| 2.3.7 ANTIBIÓTICOS..... | 31 |
| 2.4 CEPAS BACTERIANAS..... | 31 |
| 2.4.1 MANTENCIÓN Y CRECIMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS | 32 |
| 2.5 MATERIAL VEGETAL | 32 |
| 2.5.1 DESINFECCIÓN, GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CULTIVO DE <i>A. THALIANA</i> | 32 |
| 2.5.2 MEZCLA DE TIERRA PARA EL CULTIVO DE PLANTAS | 33 |
| 2.5.3 CULTIVO DE PLANTAS | 33 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.6 | AMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE INTERÉS MEDIANTE REACCIÓN DE PCR | 33 |
| 2.6.1 | DISEÑO DE PARTIDORES | 33 |
| 2.6.2 | ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA ... | 35 |
| 2.7 | AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DEL PROMOTOR EgCBF-1 | 35 |
| 2.7.1 | GENOME WALKER | 35 |
| 2.7.2 | PREPARACIÓN DE DNA GENÓMICO DE <i>E. GLOBULUS</i> | 37 |
| 2.7.3 | EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS DESDE GELES DE AGAROSA..... | 37 |
| 2.7.4 | LIGACIÓN AL VECTOR pGEMT-EASY | 37 |
| 2.7.5 | EXTRACCIÓN DE DNAP | 38 |
| 2.7.6 | ANÁLISIS DE SECUENCIAS | 38 |
| 2.8 | ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL PROMOTOR EgCBF-1..... | 38 |
| 2.8.1 | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL PROMOTOR DEL GEN EgCBF-1 | 38 |
| 2.8.2 | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE PROMOTORES DE GENES ORTÓLOGOS AL PROMOTOR EgCBF-1 | 39 |
| 2.9 | DESARROLLO DE CONSTRUCCIONES MOLECULARES PARA ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD..... | 39 |
| 2.9.1 | AMPLIFICACIÓN DEL PROMOTOR EgCBF-1 | 39 |
| 2.9.2 | LIGACIÓN DEL PROMOTOR EgCBF-1 AL VECTOR TOPO | 39 |
| 2.9.3 | TRANSFORMACIÓN DE CEPA MACH 1 DE <i>E. COLI</i> | 40 |
| 2.9.4 | RECOMBINACIÓN DEL PROMOTOR EgCBF-1 DESDE EL VECTOR DE ENTRADA TOPO AL VECTOR DE DESTINO pGWB3 | 40 |
| 2.9.5 | TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA GV3101 DE <i>A. TUMEFACIENS</i> | 41 |
| 2.10 | TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> | 41 |
| 2.10.1 | CULTIVO DE <i>A. TUMEFACIENS</i> TRANSFORMADAS | 41 |
| 2.10.2 | INFILTRACIÓN DE PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> | 41 |
| 2.11 | TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE PLANTAS DE <i>A. THALIANA</i> | 42 |
| 2.11.1 | TÉCNICA DE TRANSFORMACIÓN MEDIANTE INMERSIÓN FLORAL | 42 |
| 2.11.2 | SELECCIÓN DE SEMILLAS TRANSFORMADAS | 42 |
| 2.12 | ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR EgCBF-1 | 43 |
| 2.12.1 | ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR EgCBF-1 MEDIANTE TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> | 43 |
| 2.12.2 | ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR EgCBF-1 MEDIANTE TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE <i>A. THALIANA</i> | 43 |
| 2.12.3 | ENSAYO DE DETECCIÓN GUS MEDIANTE REACCIÓN HISTOQUÍMICA | 44 |
| 2.13 | ENSAYOS DE EXPRESIÓN MEDIANTE RT-PCR EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> | 45 |
| 2.13.1 | EXTRACCIÓN DE RNA CON TRIZOL | 45 |
| 2.13.2 | TRATAMIENTO CON DNAsa | 46 |
| 2.13.3 | CUANTIFICACIÓN DE RNA | 46 |
| 2.13.4 | TRANSCRIPCIÓN REVERSA | 46 |
| 2.14 | ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DE INSERCIÓN DEL PROMOTOR EgCBF-1::GUS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> MEDIANTE <i>SOUTHERN BLOT</i> | 47 |

| | | |
|------------------------------|--|-----------|
| 2.14.1 | SÍNTESIS DE UNA SONDA NO RADIOACTIVA..... | 47 |
| 2.14.2 | DIGESTIÓN DE DNA GENÓMICO Y DEPURINACIÓN | 47 |
| 2.14.3 | TRANSFERENCIA A UNA MEMBRANA DE NYLON | 48 |
| 2.14.4 | HIBRIDACIÓN | 48 |
| 2.14.5 | DETECCIÓN Y REVELADO | 48 |
| III. RESULTADOS | | 50 |
| 3.1 | ANÁLISIS ESTRATÉGICO PARA LA INTRODUCCIÓN DE <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i> TOLERANTES A LAS BAJAS TEMPERATURAS EN LA INDUSTRIA FORESTAL CHILENA ... | 50 |
| 3.1.1 | SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR FORESTAL..... | 51 |
| 3.1.1.1 | CHILE EN EL MARCO MUNDIAL DE LOS PRODUCTOS FORESTALES | 51 |
| 3.1.1.2 | PARTICIPANTES DE LA INDUSTRIA FORESTAL CHILENA..... | 53 |
| 3.1.1.3 | RECURSOS FORESTALES Y PLANTACIONES DE BOSQUE..... | 54 |
| 3.1.1.4 | <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i> | 56 |
| 3.1.2 | BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR FORESTAL..... | 57 |
| 3.1.2.1 | MARCO GENERAL | 57 |
| 3.1.2.2 | NORMAS CHILENAS E INTERNACIONALES RESPECTO A ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS | 58 |
| 3.1.2.3 | BIOTECNOLOGÍA FORESTAL EN ESPECIES DE EUCALIPTO..... | 60 |
| 3.1.3 | ANÁLISIS DE FACTORES INTERNOS | 61 |
| 3.1.3.1 | CADENA DE VALOR | 61 |
| 3.1.4 | ANÁLISIS DE FACTORES EXTERNOS..... | 67 |
| 3.1.4.1 | ANÁLISIS DE LAS FUERZAS DE PORTER | 67 |
| 3.1.4.2 | ANÁLISIS FODA | 70 |
| 3.1.5 | CONCLUSIONES DEL ANÁLISIS ESTRATÉGICO | 75 |
| 3.2 | AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL PROMOTOR EgCBF-1 | 75 |
| 3.2.1 | GENOME WALKER | 76 |
| 3.2.2 | AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN EgCBF-1 | 77 |
| 3.2.3 | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL PROMOTOR DEL GEN EgCBF-1 | 78 |
| 3.2.4 | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE PROMOTORES DE GENES ORTÓLOGOS AL PROMOTOR DEL GEN EgCBF-1 | 79 |
| 3.3 | CONSTRUCCIONES MOLECULARES PARA ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR EgCBF-1 | 80 |
| 3.3.1 | CONTROLES | 80 |
| 3.3.2 | AMPLIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN DE PCR DEL PROMOTOR EgCBF-1 Y CLONAMIENTO EN EL VECTOR DE ENTRADA TOPO..... | 80 |
| 3.3.3 | CLONACIÓN DEL PROMOTOR EgCBF-1 EN EL VECTOR DE DESTINO PGWB3 MEDIANTE RECOMBINACIÓN..... | 82 |
| 3.3.4 | TRANSFORMACIÓN DE <i>A. TUMEFACIENS</i> | 83 |
| 3.4 | ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR EgCBF-1 MEDIANTE TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA EN PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> | 83 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3.4.1 | ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD EN HOJAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> | 83 |
| 3.4.2 | ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD EN PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> CON HOJAS COMPLETAS Y ESTÍMULOS COMBINADOS | 85 |
| 3.5 | ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> | 86 |
| 3.6 | ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR EgCBF-1 EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> MEDIANTE REACCIÓN HISTOQUÍMICA GUS | 87 |
| 3.6.1 | ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> SOMETIDAS A FRÍO | 87 |
| 3.6.2 | ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR EgCBF-1 EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> TRATADAS CON ABA | 90 |
| 3.7 | ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN GUS MEDIANTE RT-PCR EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> | 91 |
| 3.7.1 | ENSAYO DE EXPRESIÓN DEL GEN GUS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> SOMETIDAS A FRÍO | 92 |
| 3.7.2 | ENSAYO DE EXPRESIÓN DEL GEN GUS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> SOMETIDAS A ABA | 96 |
| 3.8 | ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DE INSERCIÓN DEL PROMOTOR Eg-CBF1::GUS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> MEDIANTE <i>SOUTHERN BLOT</i> | 100 |
| 3.8.1 | SÍNTESIS DE LA SONDA NO RADIOACTIVA..... | 100 |
| 3.8.2 | EXTRACCIÓN Y DIGESTIONES DE DNAG | 101 |
| 3.8.3 | DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE LA CONSTRUCCIÓN PROMOTOR EgCBF-1::GUS EN LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> | 102 |
| IV. | DISCUSIÓN..... | 103 |
| 4.1 | ANÁLISIS ESTRATÉGICO PARA LA INTRODUCCIÓN DE <i>E. GLOBULUS</i> TOLERANTES A LAS BAJAS TEMPERATURAS EN LA INDUSTRIA FORESTAL CHILENA | 104 |
| 4.2 | AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL PROMOTOR EgCBF-1 | 105 |
| 4.3 | ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR EgCBF-1 | 106 |
| 4.3.1 | CLONAMIENTO DEL GEN REPORTERO GUS BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR EgCBF-1 EN EL VECTOR BINARIO PGWB3 | 106 |
| 4.3.2 | ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR EgCBF-1 MEDIANTE TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA EN PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> | 106 |
| 4.3.3 | ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR EgCBF-1 EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> | 108 |
| 4.3.4 | ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DEL GEN GUS MEDIANTE RT-PCR EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> | 109 |
| 4.3.5 | DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE LA CONSTRUCCIÓN PROMOTOR EgCBF-1::GUS EN LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i> MEDIANTE <i>SOUTHERN BLOT</i> | 111 |
| VI. | CONCLUSIONES..... | 112 |
| VII. | ANEXOS | 113 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| A. | PROTOCOLOS ADICIONALES | 113 |
| A.1 | PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i> | 113 |
| A.2 | PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>A. TUMEFACIENS</i> | 113 |
| A.3 | TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i> | 113 |
| B. | ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LAS PROTEÍNAS GUSPLUS-HIS 6 Y GUSA 114 | |
| C. | ANÁLISIS DE DOMINIOS CONSERVADOS EN PROTEÍNAS GUSPLUS-HIS 6 Y GUSA..... | 118 |
| VIII. | BIBLIOGRAFÍA..... | 119 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Efectos del frío en plantaciones jóvenes de <i>E. globulus</i> | 17 |
| Figura 2: Diagrama de la regulación transcripcional de la ruta activada por frío en <i>E. globulus</i> | 24 |
| Figura 3: Diagrama del procedimiento GenomeWalker | 36 |
| Figura 4: Reacción a través de la cual la enzima β -glucuronidasa degrada el sustrato X-gluc | 44 |
| Figura 5: Principales mercados para los productos forestales chilenos (Fuente: INFOR, 2008)..... | 52 |
| Figura 6: Exportaciones mundiales de Celulosa (Fuente: CORMA, 2004)..... | 53 |
| Figura 7: Principales empresas exportadoras de productos forestales chilenos (Fuente: INFOR, 2008) | 54 |
| Figura 8: Plantaciones forestales totales (Fuente: VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal, 2007)..... | 55 |
| Figura 9: Plantaciones de <i>E. globulus</i> y <i>E. nitens</i> por regiones (Fuente: VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal, 2007)..... | 57 |
| Figura 10: Cadena de Valor para la introducción de <i>E. globulus</i> tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena..... | 62 |
| Figura 11: Diagrama productivo para la identificación de genes y promotores candidatos que otorgarían tolerancia al frío a <i>E. globulus</i> | 65 |
| Figura 12: Esquema de las fuerzas de Porter para la Introducción de <i>E. globulus</i> tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena..... | 69 |
| Figura 13: DNAG de <i>E. globulus</i> y digestión con enzimas de restricción | 76 |
| Figura 14: Productos amplificados mediante reacciones de PCR para el Genome Walker..... | 77 |
| Figura 15: Digestión del vector pGEM-T Easy que contiene el promotor EgCBF-1 | 78 |
| Figura 16: Elementos de respuesta a estrés identificados en el promotor EgCBF-1 (PLACE)..... | 78 |
| Figura 17: Elementos de respuesta a estrés identificados en promotores de genes ortólogos al promotor EgCBF-1 (PLACE)..... | 79 |
| Figura 18: Amplificación mediante reacción de PCR del promotor EgCBF-1 | 81 |
| Figura 19: Análisis de restricción y digestión de DNAG del vector TOPO, en el que se ha clonado el promotor de EgCBF-1 | 81 |
| Figura 20: Verificación de la presencia del promotor EgCBF-1 en el vector pGWB3 | 82 |
| Figura 21: Amplificación mediante reacción de PCR del promotor EgCBF-1 desde DNAG de <i>A. tumefaciens</i> ... | 83 |

| | |
|---|----|
| Figura 22: Ensayo de funcionalidad en hojas completas de una misma planta de <i>N. bentamiana</i> bajo tratamiento de frío y a temperatura ambiente | 84 |
| Figura 23: Ensayo de funcionalidad en hojas completas de <i>N. bentamiana</i> bajo tratamientos combinados de frío y temperatura ambiente en luz y oscuridad..... | 85 |
| Figura 24: DNAg y amplificación mediante PCR de las construcciones de interés usando como templado DNAg de plantas resistentes a Kan | 86 |
| Figura 25: Ensayo de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> sometidas a estímulos combinados de frío/temperatura ambiente y luz/oscuridad | 88 |
| Figura 26: Ensayo de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> sometidas a frío y luz a distintos intervalos de tiempo..... | 89 |
| Figura 27: Ensayo de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> a T° ambiente y luz a distintos intervalos de tiempo..... | 89 |
| Figura 28: Ensayo de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> sometidas distintos intervalos de tiempo de tratamiento con ABA | 90 |
| Figura 29: Ensayo de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> sometidas a distintos intervalos de tiempo de tratamiento con etanol | 91 |
| Figura 30: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de <i>A. thaliana</i> de la línea transgénica uno del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a frío..... | 92 |
| Figura 31: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de la línea transgénica dos del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a frío..... | 93 |
| Figura 32: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de <i>A. thaliana</i> de la línea transgénica tres del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a frío..... | 93 |
| Figura 33: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas controles de <i>A.thaliana</i> sometidas a frío..... | 95 |
| Figura 34: Controles de las reacciones de PCR para los ensayos de expresión en plantas de <i>A. thaliana</i> sometidas a frío..... | 96 |
| Figura 35: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de <i>A. thaliana</i> de la línea transgénica uno del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a ABA | 97 |
| Figura 36: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de <i>A. thaliana</i> de la línea transgénica dos del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a ABA | 97 |
| Figura 37: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de <i>A. thaliana</i> de la línea transgénica tres del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a ABA | 98 |
| Figura 38: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas controles de <i>A.thaliana</i> sometidas a ABA | 99 |

| | |
|--|-----|
| Figura 39: Controles de las reacciones de PCR para los ensayos de expresión en plantas de <i>A. thaliana</i> sometidas a ABA..... | 100 |
| Figura 40: Sonda no-radioactiva para detectar un fragmento del gen GUS | 100 |
| Figura 41: DNAg extraído desde las distintas líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> | 101 |
| Figura 42: Determinación del número de copias de inserción del promotor EgCBF-1 en líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> mediante <i>Southern blot</i> | 103 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1: Elementos reguladores en <i>cis</i> y factores de transcripción involucrados en la expresión de genes de respuesta a estrés por frío | 22 |
| Tabla 2: Reactivos generales | 28 |
| Tabla 3: Equipos..... | 29 |
| Tabla 4: Enzimas de restricción | 29 |
| Tabla 5: Kits Comerciales | 30 |
| Tabla 6: Medios de cultivo usados en este trabajo | 31 |
| Tabla 7: Partidores utilizados en este trabajo | 34 |
| Tabla 8: Tamaños de amplificadores esperados para las distintas parejas de partidores..... | 34 |
| Tabla 9: Bases de datos utilizadas en el análisis bioinformático | 38 |
| Tabla 10: Participación chilena en el mercado forestal mundial (Fuente: CORMA, 2004)..... | 52 |
| Tabla 11: Plantaciones forestales por regiones (Fuente: VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal, 2007).... | 55 |
| Tabla 12: Eficiencia de transformación estable de <i>A. thaliana</i> realizada mediante inmersión floral | 87 |
| Tabla 13: Análisis de regiones conservadas en proteínas GUS..... | 118 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| ABA | Ácido abscísico |
| Amp | Ampicilina |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNAp | DNA plasmidial |
| DNAg | DNA genómico |
| AtCBF-3 | Gen CBF-3 de <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| <i>A. tumefaciens</i> | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| <i>A. thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| BrEt | Bromuro de Etidio |
| β-ME | Beta Mercaptoetanol |
| dNTPs | Deoxiribonucleótidos trifosfato |
| DO | Densidad óptica |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| <i>E. globulus</i> | <i>Eucalyptus globulus</i> |
| EDTA | Etilen diamino tetra acetato |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| °C | Grados Celsius |
| EgCBF-1 | Gen CBF-1 de <i>Eucalyptus globulus</i> |
| g | Fuerza de gravedad |
| gr | Gramo |
| h | Hora |
| ha | Hectárea |
| IPTG | Isopropil tio-β-D-galactósido |

| | |
|-----------------------|---|
| LB | Medio Luria-Bertani |
| M | Molar |
| mg | Miligramos |
| min | Minutos |
| ml | Militros |
| mM | Milimolar |
| μl | Microlitros |
| <i>N. benthamiana</i> | <i>Nicotiana benthamiana</i> |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pH | Potencial hidrógeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNasa | Ribonucleasa |
| RT | Transcripción reversa |
| s | Segundo |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| Tris | Tris-(hidroximetil)-aminoetano |
| UV | Ultravioleta |
| CaMV | Virus del mosaico del coliflor |
| V | Voltio |
| X-GAL | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido |
| X-GLUC | ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucurónico |

I. INTRODUCCIÓN

Una de las aristas más importantes en la investigación relacionada a la biotecnología forestal, ha sido la identificación y caracterización de factores importantes en la respuesta a diversos tipos de estrés abiótico en especies de importancia para la industria de la celulosa. En particular, uno de los principales problemas de importancia económica en nuestro país, es el nefasto efecto de las bajas temperaturas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus globulus*.

Resulta de gran interés conocer en profundidad el mecanismo de aclimatación y de respuesta a estrés por frío en dicha especie, tanto por su importancia para la industria forestal nacional, como por tratarse de una especie que presenta bajos niveles de tolerancia al frío.

En este contexto, trabajos anteriores permitieron elaborar una biblioteca de cDNA con plantas jóvenes de *Eucalyptus globulus* crecidas a 4 °C, a partir de la cual se aisló y secuenció una serie de genes involucrados en la respuesta a estrés por frío. Entre ellos, se obtuvo el primer gen tipo CBF (C-Repeat Binding Factor) descrito en la especie, factor de transcripción que juega un rol estratégico en la respuesta a estrés por frío¹.

A continuación se presenta un acercamiento global al tema, para comprender cuál es el rol de este factor de transcripción en la vía de señalización activada por frío, y cuáles son los mecanismos regulatorios involucrados en la tolerancia a las bajas temperaturas.

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 *Eucalyptus globulus* y el sector forestal chileno

Entre las múltiples especies que constituyen el bosque chileno, existe un gran número de especies introducidas. Algunas de ellas son muy relevantes para la industria forestal nacional y de gran valor económico. Entre ellas, *E. globulus* es una de las especies forestales más importantes, debido principalmente a su rápido crecimiento y a la calidad de su madera, características que le otorgan ventajas comparativas en la fabricación de pulpa con respecto a otras especies forestales. En la actualidad representa la segunda especie más plantada en el país, totalizando en conjunto con otros eucaliptos 376.786 hectáreas².

El mercado generado alrededor de la producción de eucaliptos, se ha incrementado en los últimos años y sigue aumentando. Se ha establecido que los requerimientos de madera pulpable aumentarán radicalmente desde 4,6 millones de metros cúbicos en el año 2003 a 7,4 millones de metros cúbicos para el año 2010, correspondiendo 4,4 millones solamente a *E. globulus*².

Aún así, la competencia mundial a la cual está sometido el sector forestal chileno hace necesario desarrollar nuevas tecnologías, que permitan maximizar la productividad de las plantaciones. De esta manera, el mejoramiento genético se perfila como una herramienta eficaz para agregar creciente valor a este recurso.

E. globulus posee la capacidad de adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales. Sin embargo, existen extensas superficies que exhiben restricciones que limitan su desarrollo. El problema radica en la baja resistencia al frío de la especie, lo que restringe su desarrollo y limita su crecimiento y área de cultivo. Además, las especies alternativas sugeridas para las zonas de frío, como *Eucalyptus nitens*, poseen restricciones que las limitan como sustitutas de *E. globulus* en la industria de la celulosa³.

El daño producido por frío en plantaciones jóvenes de *E. globulus* incluye cambio de color del follaje externo, borde de hojas necrosados, muerte apical de la copa, rajaduras de la corteza en la base del tallo o de la corteza de ramas, necrosis de tejidos de la corteza interna, cambium y madera, entre otros (Figura 1).



Figura 1: Efectos del frío en plantaciones jóvenes de *E. globulus*

A1, rajaduras de la corteza en la base del tallo; B2, cambio de color del follaje externo; B3, borde de hojas necrosados

Como consecuencia, dentro de los efectos del estrés por frío en plantaciones jóvenes, se tienen menores tasas de crecimiento debido a una reducción del área foliar y muerte de brotes apicales, lo que provoca deformaciones e incluso la muerte del árbol⁴.

1.1.2 Estrés abiótico en plantas

Las limitaciones ambientales son, en su gran mayoría, los factores que determinan y limitan tanto la distribución espacial de las plantaciones, como la productividad agraria. Además del estrés biótico causado por patógenos de plantas, existe un conjunto de parámetros medioambientales anormales que se han denominado colectivamente como “estrés abiótico”. Entre ellos se tiene la disponibilidad de agua (sequías, inundaciones), las temperaturas extremas (frío, congelamiento, calor), la salinidad, los metales pesados (toxicidad de iones), la irradiación de fotones (UV-B), la disponibilidad de nutrientes y la estructura del suelo⁵.

Como consecuencia de esto, se producen día a día pérdidas importantes en diversos cultivos de interés industrial. Estas pérdidas se deben a que el estrés provocado por los distintos factores abióticos, afecta negativamente el crecimiento y desarrollo de diversas especies vegetales.

Aunque hay diferentes tipos de estrés abiótico, el daño que causan a las plantas es básicamente el mismo. Es así como, sequía, exceso de sal y frío disminuyen el potencial de agua disponible para la célula vegetal, siendo éste el causante del daño fisiológico que sufre la planta y llegando a causar la muerte de los cultivos en casos extremos de estrés abiótico. Al ser las plantas inmóviles es fundamental la forma en que responden a los cambios medioambientales, los cuales generalmente son desfavorables para ellas; es así como los procesos de adaptación que desarrollan las plantas son muy importantes para su supervivencia⁶.

1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.2.1 Efectos del estrés por frío en plantas

Muchas plantas incrementan su tolerancia al frío en respuesta a estímulos medioambientales como las bajas temperaturas, fenómeno conocido como aclimatación al frío⁷. Como resultado, se genera una combinación de cambios metabólicos y fisiológicos producto de modificaciones transcripcionales. Las plantas son capaces de aclimatarse rápidamente en respuesta a bajas temperaturas. Pero como la aclimatación al frío contrarresta el crecimiento, las plantas son capaces a su vez, de des-aclimatarse rápidamente una vez que las temperaturas comienzan a subir.

Este tipo de aclimatación al frío se ha estudiado extensamente en la planta modelo *A. thaliana*, especie en la cual se han caracterizado algunos mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno⁸.

Fisiología de la aclimatación al frío en plantas

Durante el proceso natural de aclimatación al frío, se ha observado una disminución del contenido de agua y del potencial osmótico e hídrico en tejidos vegetales como yemas y hojas⁹. Esta deshidratación programada contribuye a la aclimatación al frío, evitando la formación de hielo y aminorando los efectos del congelamiento celular inducido por deshidratación. Entre estos efectos se han observado alteraciones en la estructura de las membranas, denaturación de proteínas y aumento en niveles de solutos tóxicos, tales como las especies reactivas de oxígeno¹⁰.

La disminución observada en el contenido de agua es, en gran medida, el resultado de un aumento en la acumulación de materia seca, entre las que se incluyen proteínas de almacenamiento¹¹, azúcares y almidón¹². La función de los azúcares durante la aclimatación al frío no ha sido completamente dilucidada, pero su alta abundancia en plantas aclimatadas al frío sugiere un papel en la osmorregulación, en la crioprotección, o como moléculas de señalización¹³.

Consecuentemente con esto, la inducción de genes relacionados con el control de la estabilidad de las membranas, biosíntesis de proteínas chaperonas, mecanismos antioxidativos y acumulación de azúcares y solutos compatibles, forma parte de la protección de las células vegetales frente al estrés provocado por el frío.

Control hormonal en la aclimatación al frío en plantas

El mecanismo por el cual las plantas perciben cambios medioambientales y utilizan esta información para activar la maquinaria celular y desencadenan respuestas de adaptación, es mediado por varias vías de transducción de señales. Se ha demostrado que las hormonas vegetales, especialmente el ácido abscísico, juegan un rol esencial en las rutas de señalización activadas por estrés¹⁴. La señalización hormonal involucra tanto cambios en los niveles de hormonas, como en la modulación del número de receptores de hormonas activos. De esta manera, la percepción celular de las señales hormonales juega un rol importante en la regulación de genes de respuesta al estrés, promoviendo de esta forma respuestas fisiológicas¹⁵.

Existe fuerte evidencia que correlaciona los niveles de ABA con el incremento en la tolerancia al frío. Se ha observado un incremento en los niveles de ABA en plantas bajo condiciones de frío¹⁶ y a su vez, que el suministro de ABA exógeno incrementa la tolerancia a las bajas temperaturas¹⁷.

1.2.2 Regulación de la expresión génica en la aclimatación al frío en plantas

Las células vegetales son capaces de sensar el estrés por frío de diversas formas, principalmente, detectando cambios en la fluidez de las membranas celulares, ya que las bajas temperaturas actúan

incrementando la rigidez de éstas. Se ha demostrado que las plantas utilizan este sistema para desencadenar una cadena de señalización en respuesta a las bajas temperaturas¹⁸. Al aumento en la rigidez de las membranas se acopla un incremento en los niveles de Ca^{2+} citoplasmático. Este incremento se debe a la activación de canales de Ca^{2+} mediante ligandos específicos. A su vez, la señal activada por calcio es amplificada mediante un mecanismo que estaría asociado a fosfolípidos y MAP kinasas¹⁹. Las vías de señalización secundarias, como las asociadas a ABA²⁰ y a especies reactivas de oxígeno²¹, pueden inducir también señales de Ca^{2+} , impactando en la vía de señalización activada por frío.

En conclusión, como el estrés por frío afecta el equilibrio osmótico y de nutrientes, alteraciones en la fluidez de las membranas y la conformación de las proteínas, entre otros, impacta fuertemente el metabolismo celular, reduciendo drásticamente la velocidad de reacciones bioquímicas y provocando una reprogramación de la expresión génica²².

En general, los genes de respuesta a estrés se pueden dividir en dos grandes grupos. En primer lugar, genes cuyos productos participan directamente en la protección de las células bajo condiciones de estrés y en segundo lugar, genes que codifican para componentes de las rutas de transducción de señales y que regulan la expresión génica en respuesta a estrés²³.

Dadas las características del presente trabajo, fundamental interés presentan los genes que participan en las rutas de transducción de señales y que codifican para factores de transcripción en la ruta activada por frío. En particular, se abordará la temática asociada a la cascada transcripcional de los genes *CBF*.

Cascada transcripcional ICE1-CBF

Muchos genes tales como *RD* (responsive to dehydration), *COR* (cold regulated), *LTI* (low-temperature induced) y *KIN* (cold inducible) se inducen por bajas temperaturas y sequía²⁴.

Se ha establecido además, que un importante componente en la aclimatización al frío en *A. thaliana* es la cascada de eventos regulada por los genes CBF/DREB (C-repeat-binding factor / dehydration-responsive element-binding protein). Estos genes son inducidos dentro de la primera hora de exposición al frío. En el genoma de *A. thaliana* se han descrito cuatro genes CBF/DRE, siendo la expresión de tres de ellos (*CBF1*, *CBF2* y *CBF3*) inducida por bajas temperaturas mientras que la expresión de *CBF4* es inducida por la falta de agua pero no por frío²⁵. A su vez, se ha demostrado que la expresión de estos genes activa rápidamente el “regulón CBF” (aproximadamente 2 horas), un conjunto de genes que son inducidos en respuesta a la activación transcripcional de los CBF, otorgando tolerancia al frío y a la sequía a las plantas²⁶.

Los genes CBF regulan la expresión de genes involucrados con la biosíntesis de osmolitos, detoxificación de especies reactivas de oxígeno, transporte de membrana, metabolismo de hormonas, entre otros, de lo que se desprende que cumplen funciones de protección en la célula²⁷.

Por otra parte, en *A. thaliana*, el gen *ICE1* (Inducer of CBF Expression 1), que es un factor de transcripción tipo MYC (hélice-vuelta-hélice básico), es capaz de unirse selectivamente a regiones específicas de los promotores de los genes CBF. *ICE1* es expresado constitutivamente, localizándose en el núcleo. Es capaz de activar a los factores de transcripción CBF sólo en condiciones de frío, lo que indica que el estrés por frío induce modificaciones post transcripcionales en la proteína ICE1 que son esenciales para activar genes río abajo²⁸.

El estrés provocado por las bajas temperaturas induce la sumoilación de la proteína ICE1, que es crítica para lograr la activación de los genes CBF y la represión de los genes *MYB15*. La proteína SUMO *SIZ1* disminuye la poliubiquitinación de *ICE1*, facilitando la respuesta a bajas temperaturas²⁹. Por otro lado, *HOS1* (High expresión of Osmotically responsive gene 1) media la ubiquitinación de la proteína activa ICE1 en condiciones de frío y a través de ella promueve la degradación de ICE1, regulando negativamente a los genes CBF³⁰ (Figura 2).

Elementos reguladores cis en promotores de genes de respuesta a estrés en plantas

Los elementos regulatorios *cis* actúan como interruptores moleculares y son importantes en la regulación transcripcional de múltiples procesos biológicos, tales como respuesta a estrés abiótico, respuesta a hormonas y procesos del desarrollo. Muchos factores de transcripción interactúan con elementos regulatorios tipo *cis*, presentes en las regiones promotoras de ciertos genes. Mediante esta interacción es posible que se forme un complejo de iniciación de la transcripción, de manera tal que la RNA polimerasa comienza la transcripción del gen.

Existen dos elementos reguladores *cis* que son protagonistas en la respuesta frente a estrés por frío. Uno de ellos se conoce como ABRE (ABA Responsive Element) y el otro como DRE/CRT (Dehydration Responsive Element /C-Repeat).

El elemento regulador ABRE es el elemento regulador por excelencia en los promotores de los genes inducibles por ABA. A su vez, el elemento de respuesta G-box³¹ (CACGTGGC) se encuentra también presente en genes inducibles por ABA.

En general, estas unidades reguladoras requieren al menos un elemento de respuesta adicional acoplado al elemento ABRE o G-box para ser activos, es decir, un solo elemento ABRE o G-box es insuficiente para desencadenar la transcripción del gen. Por ejemplo, en *Hordeum vulgare*, el elemento ABRE forma un complejo de activación con los elementos CE1 y CE3 para lograr la expresión de los genes *HVA1* y *HVA22* respectivamente. Por esta razón, se piensa que estos elementos ABRE podrían

estar involucrados en el acoplamiento de otros elementos para lograr la activación transcripcional. Es más, muchos de los elementos de acople conocidos son similares a ABRE y contienen el motivo A/GCGT³².

Las proteínas capaces de reconocer los elementos ABRE, poseen el dominio básico cierre de leucina (bZIP) y han sido denominadas AREB (ABRE Binding Proteins) o ABFs (ABRE Binding Factors). Se ha demostrado que estas proteínas de unión a los elementos ABRE requieren fosforilación para ser activas y reconocerlos³³.

Existen muchos otros elementos de respuesta asociados a las vías activadas por ABA, pero que están presentes en promotores que no son directamente inducibles por ABA. Por ejemplo, MYCR y MYBR son los elementos *cis* a los que se unen los factores de transcripción MYC y MYB, respectivamente. Estos dos factores de transcripción son sintetizados después de la acumulación de ABA endógeno, indicando que cumplen un rol en etapas tardías de la respuesta a estrés.

Por otra parte, los elementos de respuesta DRE/CRT (Dehydration Responsive Element /C-Repeat) están presentes también en los promotores de genes inducibles por bajas temperaturas. Estos elementos de respuesta son reconocidos por factores de transcripción del tipo AP2/ERF, grupo al que pertenecen todos los genes CBF.

Se ha observado que una copia única de este elemento de respuesta en el promotor, es suficiente para desencadenar la expresión del gen. Esto indica que los factores de transcripción que se unen a este elemento regulador, no requieren el acoplamiento de otros factores de transcripción para gatillar la expresión del gen, a diferencia de lo que ocurre con el elemento ABRE³⁴.

En cuanto al factor de transcripción ICE, existen dos posibles elementos *cis* que la proteína sería capaz de reconocer. El más importante ha sido denominado ICeR1 y contiene la secuencia CACATG, que incluye la secuencia consenso que son capaces de reconocer las proteínas del tipo bHLH, CANNTG³⁵.

En la Tabla 1 se presenta un resumen de los elementos *cis* importantes en la cascada de señalización activada por frío.

Tabla 1: Elementos reguladores en *cis* y factores de transcripción involucrados en la expresión de genes de respuesta a estrés por frío

| Elemento <i>cis</i> | Secuencia de reconocimiento | Tipo de factor de transcripción que se une al elemento <i>cis</i> | Gen | Condición de estrés | Ref |
|---------------------|-----------------------------|---|---------------------|------------------------------|-----|
| ABRE | ACGTGGC, ACGTGTC | bZIP | Em, RAB16, RD29B | Deficiencia de agua, ABA | 36 |
| CE1 | TGCCACCGG | ERF/AP2 | HVA1 | ABA | 37 |
| CE3 | ACGCGTGCCTC | Desconocido | HVA22 | ABA | 37 |
| MYBR | TGGTTAG | MYB | RD22 | Deficiencia de agua, ABA | 38 |
| MYCR | CACATG | bHLH | RD22 | Deficiencia de agua, ABA | 38 |
| DRE | TACCGACAT | ERF/AP2 | RD29A | Deficiencia de agua, Frío | 39 |
| CRT | GGCCGACAT | ERF/AP2 | Cor15A | Frío | 40 |
| LTRE | GGCCGACGT | ERF/AP2 | BN115 | Frío | 41 |
| ICEr1 | GGACACATGTCAGA | Desconocido | CBF2/DREB1C | Frío | 42 |
| ICEr2 | ACTCCG | Desconocido | CBF2/DREB1C | Frío | 42 |

Existen otros elementos de respuesta tipo *cis* que podrían jugar roles importantes en la activación de los promotores CBF, principal interés de este trabajo. Sin embargo, sólo se han abordado los más importantes.

El desarrollo de este trabajo de tesis permitirá completar la información disponible hasta el momento y aportar nueva evidencia que ayude a dilucidar profundamente el complejo mecanismo de transducción de señales involucrado en el proceso de aclimatación al frío en *E. globulus*.

La información recolectada hasta la fecha, en base a los genes inducidos en respuesta a frío obtenidos desde una biblioteca de cDNA a 4 °C, ha permitido proponer en la Figura 2 un diagrama completo de la cascada regulatoria activada por frío en *E. globulus*, en base a los antecedentes conocidos en *A. thaliana*⁴³.

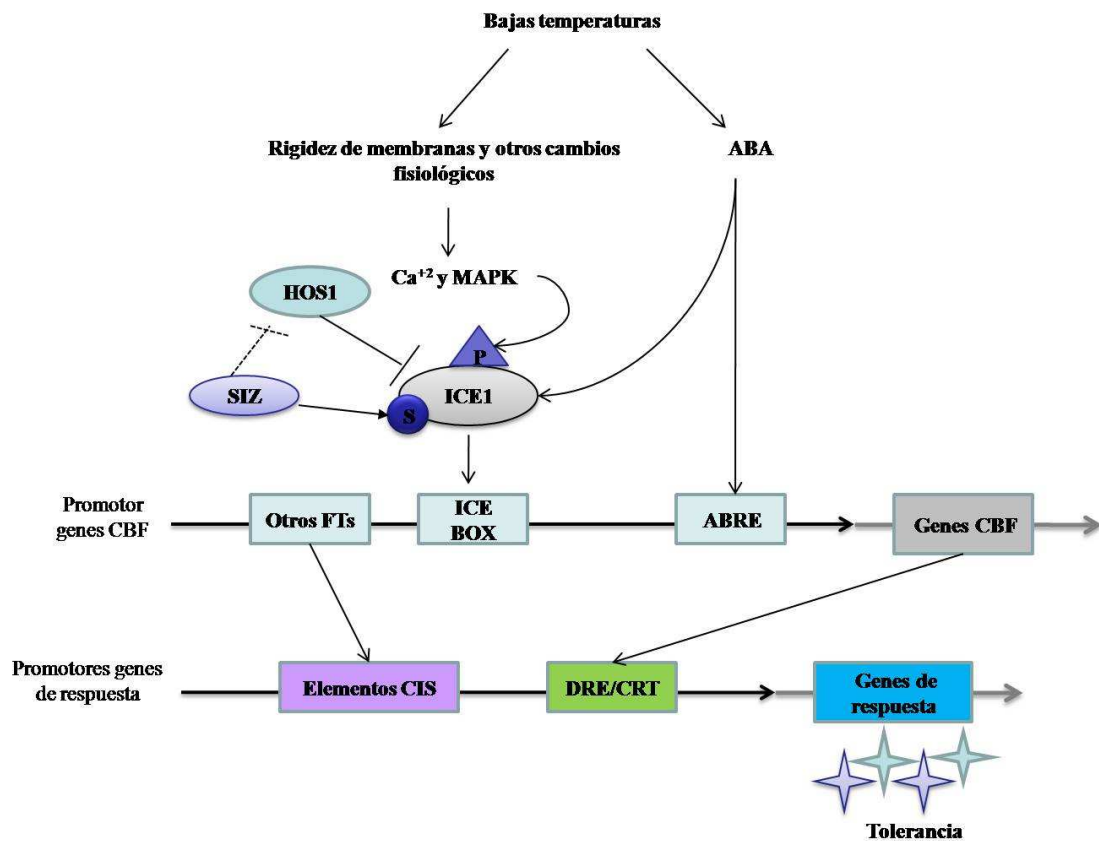


Figura 2: Diagrama de la regulación transcripcional de la ruta activada por frío en *E. globulus*
 Diagrama adaptado a partir de la ruta regulatoria de *A. thaliana*.

1.2.3 Uso de promotores regulados en el desarrollo de variedades vegetales tolerantes a las bajas temperaturas

Uno de los mecanismos más utilizados para evaluar un gen que potencialmente otorgue tolerancia al frío a alguna especie vegetal, es la sobreexpresión de ese gen en un sistema heterólogo. A su vez, una de las estrategias más utilizadas para otorgarle tolerancia a las bajas temperaturas a especies que no la presentan, ha sido sobreexpresar genes ya caracterizados en organismos modelos, como *A. thaliana*.

Se ha descrito que la sobreexpresión de genes tipo CBF de *A. thaliana* en variedades transgénicas de colza⁴⁴ (*Brassica napus*), papa⁴⁵ (*Solanum tuberosum*) y tomate⁴⁶ (*Lycopersicon esculentum*), ha logrado incrementar significativamente la tolerancia al frío de estas especies. Sin embargo, se ha observado también que estas variedades transgénicas presentan fenotipos negativos bajo condiciones normales de crecimiento. Entre estos fenotipos negativos se tienen hojas de menor tamaño, retardo en el crecimiento y retraso en la floración, entre otros.

En este contexto, la utilización de promotores inducibles por bajas temperaturas ha logrado también incrementar la tolerancia a las bajas temperaturas, pero disminuyendo significativamente los

efectos negativos de la sobreexpresión. Por ejemplo, la expresión de los genes AtCBF1 y AtCBF3 regulada por el promotor inducible por frío rd29A en plantas transgénicas de papa, han logrado un incremento similar en la tolerancia al frío que al utilizar el promotor constitutivo CaMV 35S, pero aminorando significativamente los fenotipos negativos asociados a la sobreexpresión⁴⁷.

La utilización de promotores inducibles se considera, entonces, indispensable en el desarrollo de variedades transgénicas tolerantes a las bajas temperaturas. Esto porque dichas variedades transgénicas, además de mejorar su tolerancia al frío, deben presentar características de crecimiento comparables a las de las especies silvestres, que aseguren buenos rendimientos agrarios y plantaciones económicamente rentables.

1.3 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO Y JUSTIFICACIÓN

Este trabajo de tesis se enmarca en un proyecto global, el cual tiene como objetivo determinar los actores genéticos relevantes en la respuesta a estrés por frío en *E. globulus* y evaluar su potencial uso para conferir a la especie mayor tolerancia al frío.

Dado que la sobreexpresión genética provoca un aumento del metabolismo celular que puede resultar dañino para la célula, es necesario estudiar promotores inducibles por frío. De esta manera el promotor regularía la expresión de un posible gen que le otorgaría tolerancia al frío a la especie, induciéndolo selectivamente sólo bajo condiciones de frío.

Por esta razón, se analiza funcional y estructuralmente el promotor del gen *CBF1* de *E. globulus*, de manera tal que la nueva información permita evaluar la capacidad del promotor de responder adecuadamente al estímulo de frío y ser utilizado en el marco del proyecto global.

Adicionalmente, a través del análisis estratégico para la introducción de *Eucalyptus globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena, se pretende justificar de mejor forma el proyecto suponiendo que se cuenta con árboles genéticamente modificados.

1.4 HIPÓTESIS

La regulación de la expresión del gen EgCBF-1 es mediada por la capacidad de activación del promotor del gen EgCBF-1 en condiciones de frío.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Principal

Realizar un análisis funcional y estructural del promotor del gen EgCBF-1, de manera tal que sea posible esclarecer bajo qué condiciones se produce la expresión del gen EgCBF-1.

1.5.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar el contexto económico asociado a la introducción de *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena.
- ✓ Aislar el promotor del gen CBF-1 de *E. globulus*.
- ✓ Determinar las regiones conservadas del promotor del gen EgCBF-1 que son importantes en la respuesta a estrés por frío.
- ✓ Determinar la homología entre promotores ortólogos al promotor del gen CBF-1 de *E. globulus*.
- ✓ Estudiar el efecto de las bajas temperaturas en la activación del promotor EgCBF-1.

II. METODOLOGÍA

2.1 ESTRATEGIA DE TRABAJO

En primer lugar, se realizó una recopilación acabada del estado actual de la industria forestal chilena, sus principales productos, mercados y expectativas de crecimiento. En segundo lugar, se realizó un acercamiento a la biotecnología forestal, haciendo énfasis en factibilidad técnica de obtener una variedad de *E. globulus* tolerante a las bajas temperaturas. Para esto se recopiló información de los avances realizados a la fecha en la materia, tanto en Chile como en el mundo.

La metodología para el análisis estratégico propiamente tal, se basó en los análisis de las fuerzas de Porter, FODA y de la cadena de valor. Primero se identificaron los factores externos que afectan a la industria forestal chilena y luego se analizaron los posibles alcances en estos factores si la industria forestal contara con una variedad de *E. globulus* tolerante a las bajas temperaturas. El análisis externo captó los factores estructurales que definen las perspectivas de rentabilidad a largo plazo y el atractivo del uso de la biotecnología en la industria forestal.

Por otra parte, a partir de la secuencia conocida del gen EgCBF-1, se diseñaron partidores reversos en el extremo 5' del gen. Se realizó una serie de reacciones de PCR y utilizando el kit GenomeWalker, se aisló y secuenció el promotor de dicho gen. Se clonaron y secuenciaron todas las bandas generadas mediante PCR utilizando el kit, encontrándose que una de ellas corresponde al promotor de interés.

Con la secuencia del promotor clonado, se prosiguió a realizar un análisis bioinformático. De esta manera se determinaron los motivos de respuesta a estrés existentes. Se realizó así mismo, una búsqueda y análisis de promotores de genes ortólogos al gen EgCBF-1, con motivo de establecer la similitud entre el promotor en estudio y los de otras especies vegetales.

Se amplificó mediante PCR el promotor de interés. Luego se clonó en el vector TOPO (Invitrogen), desde el cual se recombinó al vector binario del sistema GateWay pGWB3. Después de la recombinación, el promotor en estudio regula la expresión del gen reportero GUS. Con esta construcción, se transformaron células competentes de *A. tumefaciens*. Por otra parte, se utilizó también el vector comercial pCAMBIA1305.1 y el vector pGWB3 vacío para transformar *A. tumefaciens*. Estos vectores se utilizaron posteriormente como control positivo y negativo, respectivamente, en los ensayos GUS.

Con las construcciones en *A. tumefaciens* se realizó la transformación transitoria de plantas de *N. benthamiana* y la transformación estable de *A. thaliana*. En el caso de la infiltración transitoria, los ensayos experimentales se realizaron a las 48 h de la infiltración, mientras que en caso de la transformación estable, se confirmó en primer lugar líneas transgénicas estables para las distintas construcciones.

Posteriormente se realizaron los distintos ensayos experimentales, para evaluar a través de la actividad GUS, bajo qué condiciones se activa el promotor del gen EgCBF-1 y qué regiones de éste son fundamentales para su actividad. Estos ensayos incluyeron evaluación histoquímica de la actividad GUS tanto en plantas transgénicas estables como transitorias, y ensayos de expresión del gen GUS mediante RT-PCR. Se determinó además, el número de copias de la construcción que se insertaron en el genoma de las distintas líneas transgénicas de *A. thaliana*, mediante *Southern blot*.

2.2 METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS ESTRATÉGICO

Para la recopilación del estado actual de la industria forestal chilena, se utilizaron datos y estadísticas de los principales organismos de gobierno y privados relacionados con la industria forestal. Entre ellos se encuentra en Instituto Forestal (INFOR) y la Corporación Chilena de la Madera (CORMA). INFOR es una institución tecnológica del Estado de Chile adscrito al Ministerio de Agricultura, mientras que CORMA es una asociación gremial que reúne a empresas y profesionales relacionados con el sector forestal privado de Chile. En cuanto a los datos estadísticos de plantaciones de especies de interés forestal en Chile, los datos se obtuvieron del VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal. Este censo se realizó durante el año 2007 y estuvo a cargo del Instituto Nacional de Estadísticas (INE).

En cuanto a la recopilación del estado actual de la biotecnología forestal, se compiló información de empresas privadas dedicadas al desarrollo de especies forestales genéticamente mejoradas, tales como Arborgen y Bioforest. Por otra parte, se recopiló información de universidades y centros de investigación dedicados al tema, tales como el Consorcio de Genómica Forestal dependiente de la Universidad de Concepción y el INFOR.

El análisis estratégico se basó las siguientes herramientas: análisis de las fuerzas de Porter, FODA y análisis de la cadena de valor.

2.3 MATERIALES

2.3.1 Reactivos Generales

Los reactivos generales utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 2, agrupados de acuerdo al laboratorio que los comercializa.

Tabla 2: Reactivos generales

| Laboratorio | Reactivos |
|---------------------|--|
| Invitrogen (CA-USA) | Agarosa, TRIS, Glicerol, SDS, estándares de tamaño molecular DNA λ (DNA/ <i>Hind</i> III), Φ X 174 RF (DNA/ <i>Hae</i> III) y 1kb |

| | |
|-----------------|---|
| Sigma (MO-USA) | X-Gal, IPTG, Ampicilina, Espectinomicina, Tween-20 |
| Difco | Bactotripton, Extracto de levadura |
| Merck | Agar, Cloruro de Calcio, Cloruro de Sodio, Tritón X-100, Hidróxido de Sodio, Fosfato de sodio, Cloroformo, Alcohol isoamílico, Formaldehído, Ácido acético y Etanol |
| Gibco BRL | EDTA, BrEt |
| Phytotechnology | Medio MS, Mio inositol, Rifampicina, Kanamicina, X-Gluc, ÁBA |
| Roche | Digoxigenina y anticuerpo anti-digoxigenina |

2.3.2 Equipos

En la Tabla 3 se presentan los diversos equipos utilizados en este trabajo, incluyendo la marca y el modelo de cada uno.

Tabla 3: Equipos

| Equipo | Marca y modelo |
|--------------------------------|---|
| Termociclador | PTC-100 Peltier, MJ Research |
| Centrífuga refrigerada | 3-18K, Sigma |
| Centrífuga | Mini Spin, Eppendorf |
| Campana de flujo | Purifier Class II Biosafety Cabinet, Labconco |
| Cámara de cultivo | P+L Electrónica, Bioref |
| Equipo para PCR en tiempo real | Mx300P Quantitative PCR System, Stratagene |
| Bomba de vacío | Thomas 1636 A |

2.3.3 Enzimas

Las enzimas utilizadas en este trabajo corresponden a: DNA polimerasa GoTaq (Green Master Mix, Promega), DNasa TURBO (Ambion Inc), transcriptasa reversa MMLV (Promega) y RNasa Out (Invitrogen), inhibidor de RNasa. Se utilizó además: ligasa T4, clonasa LR, proteinasa K y enzimas de restricción, todas de Invitrogen. En la Tabla 4 se especifica la información referente a las enzimas de restricción.

Tabla 4: Enzimas de restricción

| Enzima | Sitio de reconocimiento (5'→3') | Tipo de corte | Temperatura °C |
|--------------|---------------------------------|---------------|----------------|
| <i>ApaI</i> | GGGCC- C | Cohesivo | 30 |
| <i>BglII</i> | A-GATCT | Cohesivo | 37 |
| <i>DraI</i> | TTT-AAA | Romo | 37 |
| <i>EcoRI</i> | G-AATTC | Cohesivo | 37 |

| | | | |
|----------------|---------|----------|----|
| <i>EcoRV</i> | GAT-ATC | Romo | 37 |
| <i>HindIII</i> | A-AGCTT | Cohesivo | 37 |
| <i>NcoI</i> | C-CATGG | Romo | 37 |
| <i>PvuI</i> | CGAT-CG | Romo | 37 |
| <i>SstI</i> | GAGCT-C | Cohesivo | 37 |
| <i>StuI</i> | AGG-CCT | Romo | 37 |

2.3.4 Kit Comerciales

En la Tabla 5 se detallan los kits comerciales utilizados durante el desarrollo de este trabajo.

Tabla 5: Kits Comerciales

| Kit | Laboratorio | Descripción |
|----------------------------------|-----------------------------|--|
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Quiagen | Extracción de DNA plasmidial |
| E.Z.N.A Cycle –Pure Kit | Omega Bio-tek | Purificación de productos de PCR |
| E.Z.N.A Gel Extraction Kit | Omega Bio-tek | Extracción de ácidos nucleicos desde geles de agarosa |
| Wizard Genomic | Promega | Extracción de DNA genómico de <i>A. thaliana</i> |
| GenomeWalker Universal Kit | Clontech Laboratories, Inc. | Amplificación de extremo 5' desconocido río arriba de fragmento de DNA de secuencia conocida |
| Quant-iT RNA Assay Kit | Invitrogen | Cuantificación de RNA |
| AP Chemiluminescent Blotting Kit | KPL | Kit para detección de quimio luminiscencia, usado para <i>Southern blot</i> |

2.3.5 Vectores de Clonamiento

Se utilizó el vector pGEM-T Easy (Promega, 3018 pb) para el clonamiento de las bandas generadas mediante PCR en el GenomeWalker y el vector TOPO (Invitrogen, 3900 pb) como vector de entrada en el clonamiento de promotores amplificados mediante PCR. Se utilizó el vector binario pGWB3 (GateWay, 18275 pb, GenBank número de acceso AB289766) como vector de destino, tal que los promotores de interés controlen la expresión del gen reportero GusA.

Es importante señalar que tanto el vector pGEM-T Easy, como el vector TOPO permiten obtener un alto número de copias de fragmentos de DNA. Además, se caracterizan por poseer una serie de timinas en el extremo 3' de cada una de las hebras en el sitio de inserción, lo que permite la ligación de segmentos de DNA obtenidos por PCR que tienen una adenina en el extremo 3' de cada hebra debido a la acción de la *Taq* DNA polimerasa.

Por otra parte, se utilizó el vector comercial pCAMBIA1305.1 (Cambia, 11846 pb, GenBank número de acceso AF254045) como control positivo para los ensayos de reacción histoquímica GUS. Se trata de un vector que posee la construcción 35S-GUSplus, donde GUSplus corresponde al gen que codifica para la enzima β -glucoronidasa.

Cabe señalar que la proteína GUS codificada por el vector binario pGWB3 corresponde a la enzima GusA (GenBank número de acceso BAF44957.1), mientras que el control positivo codifica para otra isoforma de la enzima GUS, denominada GusPlus-His6 (GenBank número de acceso AAK2946.1), que a diferencia de la enzima GusA posee un intrón y cola de histidina, entre otras diferencias.

2.3.6 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 6. El medio LB, tanto en su forma sólida como líquida, fue utilizado para el crecimiento de las distintas cepas bacterianas. En cuanto al medio SOC, fue utilizado durante los protocolos de transformación de cepas de *E. coli*. El medio MS se utilizó en forma líquida para realizar la inmersión floral y en forma sólida para selección de semillas transformadas.

Tabla 6: Medios de cultivo usados en este trabajo

| Medio | Composición |
|-------|---|
| LB | Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l. Para medio sólido se adiciona agar 15 g/l. |
| SOC | Bactotripton 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l; NaCl 0,5 g/l, glucosa 1M y MgCl ₂ 0,1M |
| MS | Sales MS (macroelementos, microelementos y quelatos de hierro) 4,3 g/l, mioinositol 0,1 g/l, sacarosa 50 g/l. Para medio sólido se usa sacarosa 30 g/l y agar-agar 7 g/l. |

2.3.7 Antibióticos

Las soluciones de antibióticos se prepararon en agua desionizada bidestilada y se esterilizaron por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm de diámetro de porosidad (Millipore). Los antibióticos se prepararon en las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp, 100 mg/ml), gentamicina (Gen, 100 mg/ml), kanamicina (Kan, 50 mg/ml) y espectinomicina (Spec, 100 µg/ml).

En el caso particular de la rifampicina (Rif), se preparó en una concentración de 100 mg/ml en DMSO.

2.4 CEPAS BACTERIANAS

Se utilizó la cepa de *E. coli* Mach 1 (Invitrogen, genotipo F⁻ φ80(*lacZ*)ΔM15 Δ*lacX74* *hsdR* (rK-mK+ Δ*recA1398* *endA1* *tonA*) para la mantención y multiplicación de los vectores recombinantes.

La cepa GV3101 de *A. tumefaciens* (donado por la Universidad Católica de Chile) fue utilizada para la transformación de plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana*.

La cepa de *E. coli* NovaBlue (Novagen, genotipo *endA1 hsdR17(rK12- mK12+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac tonAF'[proA+B+ lacI qZΔM15::Tn10]* (TetR)), fue utilizada para clonar bandas obtenidas durante el proceso de aislamiento del promotor del gen EgCBF-1.

2.4.1 Mantención y crecimiento de cepas bacterianas

E. coli se creció a 37 °C con agitación constante durante 16 h en medio LB líquido suplementado con el antibiótico apropiado. A partir de estos cultivos se tomaron inóculos con los que se prepararon *stocks* en glicerol al 20 % (v/v) de glicerol los que se almacenaron a -80 °C. Las células competentes de *E. coli* cepa NovaBlue se prepararon según lo detallado en el Anexo A.1. Células competentes de la cepa Mach1 de *E. coli* se adquirieron a Invitrogen.

La cepa GV3101 de *A. tumefaciens* se creció a 28 °C en medio líquido con agitación constante o placas con LB suplementado con Gen (100 µg/ml), Kan (100 µg/ml) y Rif (10 µg/ml), durante 48 h. El método de almacenaje fue similar al anterior. Células competentes de la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* se prepararon según lo detallado en el Anexo A.2.

2.5 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia cultivadas en el laboratorio. Semillas de *N. benthamiana* fueron donadas por la Universidad Católica de Chile y cultivadas en el laboratorio. Plantas de *E. globulus* se cultivaron en el laboratorio a partir de semillas adquiridas en el vivero Antumapu de la Universidad de Chile.

2.5.1 Desinfección, germinación de semillas y cultivo de *A. thaliana*

Las semillas se desinfectaron lavándolas con 1 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 20 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril.

Posteriormente se depositaron las semillas en placas con medio MS, en una densidad aproximada de 30 semillas por placa. Todo el procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar.

Las placas con semillas se mantuvieron a 4 °C en completa oscuridad durante 2 días para sincronizar la germinación de ellas. Luego las placas se transfirieron a una cámara de cultivo con un

fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad y un rango de temperatura entre 20-25 °C. Las semillas germinadas se transfirieron luego a tierra.

2.5.2 Mezcla de tierra para el cultivo de plantas

La mezcla de tierra utilizada consistió en 4 partes de tierra orgánica desinfectada (ANASAC), 1 parte de vermiculita (World Minerals), 1 parte de perlita (World Minerals) y ½ parte de turba (ANASAC).

2.5.3 Cultivo de plantas

Las plantas de *A. thaliana* germinadas *in vitro* se traspasaron a macetas con la mezcla de tierra descrita previamente, con la precaución de eliminar el medio de cultivo remanente en las raíces. Las macetas se mantuvieron cubiertas con plástico durante la primera semana con el objetivo de mantener la humedad, siendo regadas con agua potable 2 veces a la semana. Las condiciones de crecimiento son las mismas descritas en la sección 2.5.1.

Para la obtención de las semillas, las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero hasta la formación de vainas con semillas (2 meses aproximadamente), momento en el cual son envueltas en bolsas de papel para facilitar su recolección. Luego se disminuye el riego para obtener las vainas con semillas secas; éstas se terminan de secar y se almacenan a temperatura ambiente.

En el caso de *N. benthamiana*, y *E. globulus*, las semillas se pusieron directamente sobre una maceta con tierra, siendo regadas con agua potable dos veces a la semana. Las condiciones de crecimiento son similares a las descritas para *A. thaliana* en la sección 2.5.1.

2.6 AMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE INTERÉS MEDIANTE REACCIÓN DE PCR

2.6.1 Diseño de partidores

Diversos fragmentos de interés se amplificaron mediante reacción de PCR utilizando partidores específicos. Los partidores se diseñaron y analizaron mediante el programa computacional OLIGO⁴⁸, y se mandaron a sintetizar a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. La temperatura de hibridación (T_m), de cada partidador se calculó en base a la fórmula:

$$T_m = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

La secuencia de los partidores utilizados para la amplificación de cada uno de los fragmentos de interés se detalla en la Tabla 7. Además, en la Tabla 8 se detallan los tamaños de los fragmentos amplificados para las distintas parejas de partidores.

Tabla 7: Partidores utilizados en este trabajo

| Partidores | Secuencia 5' → 3' | T _m °C |
|-------------|--------------------------|-------------------|
| GW1-R | GTGGGACAGCAGCAACGAGAAAG | 72 |
| GW2-R | AAGGAGTTGGGGTGGGAGATATAA | 70 |
| proEgCBF1-F | TGATTACTATAGGGCACGC | 56 |
| proEgCBF1-R | GGGAGATATAAGAGGAAGAGTT | 62 |
| gus-F | CCGATGTCACGCCGTATG | 58 |
| gus-R | TGTTGATCCGCATCACGC | 56 |
| gus-R2 | GGGGTTTCTACAGGACGT | 56 |
| Gusp-F | GTGAAGATAGTGGAAAAGGAA | 58 |
| Gusp-R | TTCTGTAACATCATCATCAT | 62 |
| Gus2-F | ACGTCCTGTAGAAACCCCA | 58 |
| Gus2-R | GAAGCGGGTAGATATCACACT | 62 |
| Actina-F | GTTGGGATGAACCAGAAGGA | 60 |
| Actina-R | GAACCACCGATCCAGACAC | 62 |

Tabla 8: Tamaños de amplificados esperados para las distintas parejas de partidores

| Partidor F | Partidor R | Tamaño fragmento amplificado esperado (pb) |
|-------------|-------------|--|
| proEgCBF1-F | proEgCBF1-R | 825 |
| proEgCBF1-F | gus-R | 1565 |
| proEgCBF1-F | gus-R2 | 920 |
| gus-F | gus-R | 319 |
| 35Sgw-F | 35Sgw-R | 835 |
| 35sgp-F | 35sgp-R | 584 |
| Gus2-F | Gus2-R | 836 |
| Actina-F | Actina-R | 823 |

El primer paso de las reacciones de PCR fue someter las muestras durante 10 min a 94 °C, permitiendo así la separación completa de la doble hebra de DNA. Luego se realizaron ciclos que consistieron en 94 °C durante 30 s, hibridación de partidores a una temperatura que dependió de la pareja de partidores y 72 °C durante un período de tiempo que dependió del tamaño del fragmento a amplificar, calculando 1 min por 1000 pb. Tanto el número de ciclos de reacción, como el tiempo de hibridación de los partidores, se modificaron en función de los resultados obtenidos. En general, se utilizaron 30 ciclos, un tiempo de hibridación de 30 s y una extensión final de 10 min a 72 °C.

2.6.2 Análisis de ácidos nucléicos mediante electroforesis en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa de una concentración ajustada según el tamaño del fragmento a observar (entre 0,7 % y 2,0 %) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM pH 8,3) y BrEt 0,2 µg/ml. Se utilizó como estándar de peso molecular una mezcla comercial de fragmentos de DNA (λ /Φ ó 1kb). Antes de ser cargados en el gel, se agregó a la muestra solución de carga (azul de bromofenol 0,25 % p/v y glicerol 50 % v/v en TE). El gel se corrió en tampón TAE durante el tiempo necesario para resolver los componentes de la muestra (30-60 min) a un voltaje aproximado de 90 V. El gel fue observado y fotografiado mediante el uso de un transiluminador de luz UV.

2.7 AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DEL PROMOTOR EgCBF-1

2.7.1 Genome Walker

Para aislar el promotor del gen CBF-1 de *E. globulus* se utilizó el GenomeWalker Universal Kit, que permite obtener secuencias de DNA río arriba de un fragmento conocido. En primer lugar, se construyeron “librerías GenomeWalker”. Estas librerías se realizaron utilizando diferentes alícuotas de DNAg de *E. globulus* digeridas con enzimas de restricción que generan extremos romos (*StuI*, *PvuII*, *EcoRV* y *DraI*). Las digestiones se realizaron incubando 25 µl de DNAg (0,1 µg/µl), 8 µl de enzima de restricción (10 unidades/ µl), 10 µl de Buffer de ligación específico para cada enzima y 57 µl de agua desionizada. Luego se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Cada set de digestiones se ligó por separado a un adaptador provisto en el kit, generando de esta forma las 4 librerías GenomeWalker. Las ligaciones se realizaron mezclando 4 µl de DNAg digerido, 1,9 µl adaptador (25 µM), 1,6 µl de buffer de ligación 1 y 0,5 µl de enzima ligasa. Luego se incubaron a 16 °C durante toda la noche. Posteriormente se detuvieron las reacciones incubando las ligaciones a 70 °C durante 5 min.

Para cada librería, se realizó la primera reacción de PCR utilizando una pareja de partidores externos. Los partidores utilizados fueron AP1, partidor forward provisto por el kit y GW1, partidor reverse diseñado en el extremo 5' del gen EgCBF-1. Esta primera reacción de PCR tiene como objetivo amplificar una región de DNA extensa, que contenga el segmento diana. Se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante, partiendo con 7 ciclos de 94 °C por 25 s y 72 °C por 3 min. Luego se realizaron 32 ciclos de 94 °C por 25 s, 67 °C por 3 min y 67 °C por 7 min.

El producto amplificado de la primera reacción de PCR se usó como templado para un segundo PCR en una dilución 1:50. Esta segunda reacción de PCR se realizó con partidores internos y específicos para la zona a amplificar. Los partidores utilizados fueron AP2, partidor forward provisto por el kit y GW2, partidor reverse diseñado en el extremo 5' del gen EgCBF-1. Esta reacción de PCR se realizó en forma análoga a la de la primera reacción de PCR, partiendo con 5 ciclos de 94 °C por 25 s y 72 °C por 3 min. Luego se realizaron 20 ciclos de 94 °C por 25 s, 67 °C por 3 min y 67 °C por 7 min.

En la Figura 3 se presenta un diagrama ilustrativo del procedimiento seguido para la técnica GenomeWalker.

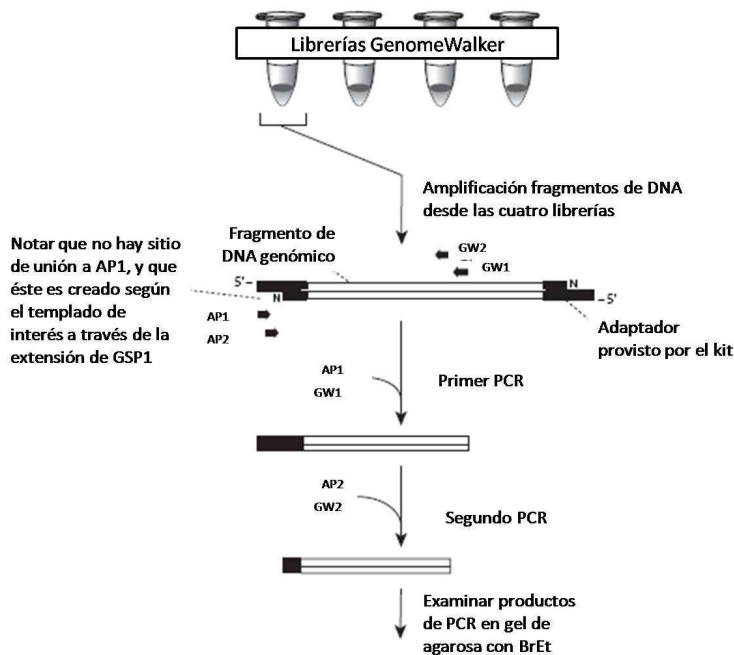


Figura 3: Diagrama del procedimiento GenomeWalker

“Librerías GenomeWalker”: alícuotas de DNAg de *E. globulus* digeridas, cada una, con una enzima de restricción que deja extremos romos, y a los que se les ha adherido un adaptador provisto por el kit. AP1 y AP2 son partidores complementarios al adaptador provisto por el kit, mientras que GW1 y GW2 corresponden a los partidores diseñados en función del extremo 5' del gen EgCBF- 1.

Los fragmentos amplificados de la segunda reacción de PCR, se recuperaron extrayéndolos desde un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1 %. Las bandas aisladas y purificadas se clonaron en el vector pGEM-T Easy. Luego se transformaron células competentes de *E. coli* cepa NovaBlue. Posteriormente, todos los fragmentos se secuenciaron.

A continuación se presentan los protocolos involucrados en la construcción de librerías GenomeWalker y en el aislamiento y secuenciación de los fragmentos de DNA obtenidas utilizando el kit.

2.7.2 Preparación de DNA genómico de *E. globulus*

Se tomaron 100 mg de tejido vegetal, los que se pulverizaron en nitrógeno líquido utilizando un mortero. Este polvo fue incubado a 60 °C durante 30 min en 800 µl del tampón de extracción de DNA (NaCl 1,42 M, EDTA 20 mM, ácido ascórbico 5 mM, DIECA 4 mM, CTAB 2 %, PVP40 2 %, Tris-HCl pH 8 100 mM) suplementado con 3 µl de β-mercaptoetanol. Se realizaron dos extracciones con 500 µl de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) centrifugando cada vez a 13000 xg durante 5 min. La fase acuosa recuperada se precipitó durante toda la noche con isopropanol a -20 °C. A la mañana siguiente el tubo se centrifugó a 13000 xg durante 10 min a 4 °C concentrándose el *pellet* en el fondo del tubo y eliminando el sobrenadante por inversión. El *pellet* se lavó con etanol frío al 70 % y se secó a temperatura ambiente. A continuación, el *pellet* se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada y se trató con 5 µl de RNasa (10 mg/l) seguido de una incubación de 30 min a 37 °C. Posteriormente la muestra fue precipitada adicionando 500 µl de isopropanol frío durante 2 h y centrifugando nuevamente en las condiciones antes descritas. El *pellet* se lavó con etanol frío al 70 %, se dejó secar a temperatura ambiente sobre un papel filtro y se resuspendió finalmente en 50 µl de agua⁴⁹.

2.7.3 Extracción de ácidos nucleicos desde geles de agarosa

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 50 V. Luego el gel se tiñó con una solución de BrEt 1 µg/ml para visualizar los fragmentos de DNA. Se aislaron todas las bandas, extrayendo los trozos de agarosa del gel con un bisturí y colocándolos en un tubo Eppendorf. Finalmente se procedió de acuerdo al protocolo del Kit E.Z.N.A. Gel Extraction, de Omega Bio-tek, suministrado por el fabricante.

2.7.4 Ligación al vector pGEMT-Easy

Los fragmentos de DNA extraídos desde geles de agarosa, se ligaron al vector de clonamiento pGEM-T Easy en una relación 1:10 de vector con respecto al inserto de DNA. Para esto se mezclaron

5 µl de solución buffer ligasa, entre 10-55 ng de vector, DNA para obtener la razón molar ya descrita y 1 µl de la enzima DNA T4 ligasa (Invitrogen).

Posteriormente se utilizó ese producto de ligación para transformar células competentes de *E. coli* cepa NovaBlue, según lo detallado en el Anexo A.3. Se usó Amp como marcador de selección de las colonias transformantes y alfa complementación para discriminar entre las colonias con inserto y las colonias vacías.

2.7.5 Extracción de DNAp

A partir de las colonias positivas obtenidas por transformación, se creció un cultivo bacteriano (2-5 ml) durante la noche a 37 °C con agitación constante. El cultivo se centrifugó a 5000 xg por 1 min obteniéndose un sedimento de bacterias. A partir de este *pellet*, el DNA plasmidial se obtuvo siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante del Kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

La presencia de los insertos de interés fue corroborada mediante digestión de los DNAs con la endonucleasa *EcoRI*, incubando el vector junto a enzima durante 1 h a 37°C.

2.7.6 Análisis de secuencias

Los fragmentos clonados en pGEM-T Easy se secuenciaron en Macrogen Korea, con partidores universales M13 que pertenecen al vector y mediante el método de Sanger⁵⁰. Con las secuencias de los fragmentos, se realizó el análisis bioinformático. Utilizando la base de datos NCBI, mediante los algoritmos BLASTN, BLASTX y BLASTP⁵¹. Los alineamientos se hicieron utilizando el programa ClustalW.

2.8 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL PROMOTOR EgCBF-1

2.8.1 Análisis bioinformático del promotor del gen EgCBF-1

El análisis bioinformático de la secuencia obtenida se realizó utilizando diferentes programas diseñados para el análisis de promotores en plantas. Estos programas entregan como resultado una serie de motivos conservados dentro de la secuencia del promotor en estudio. Con esta información se procedió a seleccionar aquellos motivos que guardan relación con respuesta a estrés, identificando los motivos conservados. En la Tabla 9 se presentan las bases de datos utilizadas.

Tabla 9: Bases de datos utilizadas en el análisis bioinformático

| Base de Datos | Descripción | Herramientas | Ref |
|---------------|--|--------------------|---------------|
| PLACE | Elementos reguladores de DNA tipo <i>cis</i> en plantas | Place | ⁵² |
| Softberry | Secuencias de promotores de plantas | N-Site y N-Site PL | ⁵³ |
| TRANSFACT | Elementos reguladores de DNA tipo <i>cis</i> y <i>trans</i> en eucariontes | Match, P-Match y | ⁵⁴ |

| | | | |
|-----------|---|-----------------------|----|
| | | Patch | |
| Genomatix | Factores de transcripción y potenciales sitios de unión de factores de transcripción en eucariontes | Matbase, MatInspector | 55 |

2.8.2 Análisis bioinformático de promotores de genes ortólogos al promotor EgCBF-1

Las secuencias de los promotores de genes ortólogos al promotor del gen EgCBF-1 se obtuvieron desde la base de datos GenBank. Cada una de estas secuencias se analizó en forma análoga al análisis realizado para el promotor del gen EgCBF-1, determinando así las regiones conservadas relacionadas con estrés para cada uno de ellos y la homología con el promotor en estudio.

2.9 DESARROLLO DE CONSTRUCCIONES MOLECULARES PARA ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD

La construcción desarrollada para los experimentos fue pGWB3::Promotor EgCBF-1. Como control negativo se utilizó el vector pGWB3 y como control positivo el vector pCAMBIA1305.1.

2.9.1 Amplificación del promotor EgCBF-1

Para clonar el promotor EgCBF-1 en el vector TOPO, se amplificó mediante reacción de PCR. Se diseñaron partidores específicos (ProCBF F/R, Tabla 7) para amplificarlo desde el DNAp secuenciado en pGEMT - Easy (Figura 15). Se realizaron 25 ciclos con 1 min de extensión cada uno. Posteriormente se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (sección 2.6.2).

2.9.2 Ligación del promotor EgCBF-1 al vector TOPO

La construcción se realizó utilizando el sistema pCR8/GW/TOPO, que permitió recombinar el promotor de interés al vector binario pGWB3.

La ligación se realizó utilizando 1-5 µl de fragmento purificado de PCR, 1 µl de vector TOPO, 3 µl de solución salina y 3 µl de agua estéril. Esta mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez concluida la ligación de los fragmentos de interés al vector TOPO, se transformaron células competentes Mach 1 de *E. coli* con esta construcción.

2.9.3 Transformación de cepa Mach 1 de *E. coli*

El protocolo de transformación utilizado para la cepa Mach 1 fue descrito por el fabricante y es análogo al detallado en el Anexo A.3. Las bacterias se sembraron en placas de LB-agar suplementadas con 100 µg/ml de Spectinomicina.

La orientación correcta 5'→3' del inserto clonado en el vector TOPO se verificó mediante un análisis de restricción. Para esto se creció un cultivo líquido a partir de colonias resistentes a Spec, realizándose una extracción de DNAP según el protocolo descrito por el fabricante del kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Las digestiones se realizaron utilizando 2 µl de DNAP, 0,3 µl enzima de restricción, 1 µl de buffer adecuado para la enzima y agua bidestilada para completar un volumen final de 10 µl. Tanto la orientación correcta, como la integridad de los insertos fue corroborada mediante secuenciación.

2.9.4 Recombinación del promotor EgCBF-1 desde el vector de entrada TOPO al vector de destino pGWB3

Con el fragmento de interés clonado en la orientación correcta en el vector TOPO y confirmado por secuenciación, se procedió a recombinar el inserto al vector binario pGWB3.

En primer lugar se preparó una mezcla de recombinación en un volumen final de 8 µl que contiene el fragmento de interés en el vector TOPO (5 %), el vector binario de destino pGWB3 (20 %) y un buffer adecuado para que se lleve a cabo la reacción (75 %). A esta mezcla se le agregó 1 µl enzima clonasa LR (Invitrogen) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C). Finalmente se le agregó 1 µl de proteinasa K para detener la reacción, incubándose durante 10 min a 37 °C.

Posteriormente, se utilizó 1 µl de la reacción recién descrita para transformar células competentes Mach1, según el protocolo descrito en la sección 2.9.3. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB-agar con Kan 100 µg/ml.

Con el propósito de corroborar la integridad de la recombinación, se creció un cultivo líquido a partir de las colonias resistentes a Kan y se realizó una extracción de DNAP según el protocolo descrito por el fabricante del kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Este DNAP se utilizó como templado para un PCR en que se amplificó con partidores específicos el fragmento de interés clonado en el vector binario. Las condiciones del PCR se han descrito en la sección 2.9.1. Los DNAP que presentaron un PCR positivo se enviaron a secuenciar para ratificar que la recombinación ha sido exitosa.

Una vez verificada la construcción en el vector binario, se procedió a transformar con ella células competentes de *A. tumefaciens*.

2.9.5 Transformación de la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*

Un volumen de 100 μ l de células competentes se mezclaron con el DNA de interés a una concentración de 1 μ g/ μ l congelándose en nitrógeno líquido por 5 min. Posteriormente, se descongelaron y mantuvieron a 37 °C durante 25 min. Transcurrido este tiempo se agregó 1 ml de medio LB y se incubó por 3 horas a 28 °C con agitación suave. Finalmente, se centrifugó la mezcla durante 1 min a 10000 xg, descartando la mayoría del sobrenadante y resuspendiendo las bacterias en el sobrenadante residual (aproximadamente 200 μ l) para sembrarlas en placas que contenían LB-agar más los antibióticos para la selección (Gentamicina 100 μ g/ml y Rifampicina 10 μ g/ml, resistencias aportadas por la cepa de *A. tumefaciens*, y Kanamicina 50 μ g/ml, resistencia aportada por el vector utilizado para la transformación)⁴⁴.

Las colonias que resultaron resistentes a los tres antibióticos se crecieron en medio líquido para extraer DNAp (sección 2.7.5). Este DNAp fue utilizado como templado para un PCR final en que se amplificó el fragmento de interés clonado en el vector binario. Las condiciones de la reacción de PCR se han descrito en la sección 2.9.1. Una vez verificada la construcción mediante reacción de PCR, se realizaron *stocks* de glicerol que se almacenaron a -80 °C.

2.10 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE PLANTAS DE *N. benthamiana*

2.10.1 Cultivo de *A. tumefaciens* transformadas

Se utilizaron células de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción de interés, cultivadas hasta una DO_{600nm} de 0,6 – 0,8 en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Las células se precipitaron en una centrifuga refrigerada a 4 °C a 3500 xg durante 15 min. Luego, el *pellet* fue resuspendido en agua destilada, utilizando el 10 % del volumen del cultivo crecido inicialmente.

2.10.2 Infiltración de plantas de *N. benthamiana*

Plantas de *N. benthamiana* de 8 semanas de edad, se utilizaron para los ensayos de infiltración. Éstas se cultivaron de acuerdo a lo detallado en la sección 2.5.3. Un día previo al ensayo, se roció con agua la epidermis inferior de cada hoja, para permitir la apertura de los estomas. La infiltración se llevó a cabo utilizando jeringas de 1 ml (BD Plastipak), mediante presión manual sobre la hoja. De esta manera se permitió la entrada del *A. tumefaciens* a la planta.

Las plantas transformadas se mantuvieron durante 48 h a 25 °C y oscuridad, inmediatamente después de ser infiltradas.

2.11 TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE PLANTAS DE *A. thaliana*

2.11.1 Técnica de transformación mediante inmersión floral

Se utilizaron células de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción molecular deseada, que se creció en medio líquido hasta una DO_{600nm} de 0,6 – 0,8 en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Las células se precipitaron en una centrifuga refrigerada a 4 °C a 3500 xg durante 15 min y luego resuspendidas en medio MS con 5 % sacarosa y 0,05 % detergente (Silwett L-77). La transformación se realizó sumergiendo las inflorescencias de la planta en el medio MS antes descrito durante 2 min. Posteriormente las plantas se mantuvieron en condiciones de vivero hasta que completaron su desarrollo (aproximadamente 8 semanas) para finalmente recolectar las semillas⁵⁶.

2.11.2 Selección de semillas transformadas

Las semillas de las plantas sometidas al método de transformación descrito previamente, se evaluaron para establecer los porcentajes de eficiencia de transformación obtenidos. Se determinó el número de semillas aproximado con las que se trabajó utilizando la siguiente relación: un peso de 40 mg corresponde aproximadamente a 2000 semillas de *A. thaliana*. Las semillas se esterilizaron (sección 2.5.1) y luego se sembraron en placas de MS-agar suplementado con 50 µg/mL de Kan, como medio selectivo. Aquellas plantas que sobrevivieron en presencia del antibiótico se traspasaron a tierra para obtener de ellas la siguiente generación de semillas. La eficiencia de la transformación se calculó determinando el porcentaje de semillas resistentes a Kan del total de semillas colocadas a germinar.

Para corroborar el carácter transgénico de las plantas resistentes a Kan, se realizó una extracción de DNAg de cada una de estas plantas, utilizando el kit Wizard Genomic (Promega) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego, este DNAg se utilizó como templado para una reacción de PCR en la que se amplificaron los fragmentos de interés según las especificaciones detalladas en la sección 2.9.1.

2.12 ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR EgCBF-1

2.12.1 Análisis funcional del promotor EgCBF-1 mediante transformación transitoria de plantas de *N. benthamiana*

Para los ensayos en *N. benthamiana* se utilizaron plantas de 2 meses de edad. Las hojas previamente transformadas (sección 2.10), se cortaron de la planta, extendidas sobre papel absorbente mojado y sometidas a 4 °C de frío a intervalos de tiempo de 30 min, 60 min, 90 min y 120 min. También se mantuvieron hojas a temperatura ambiente, como controles. Posteriormente se realizó el ensayo de detección de GUS mediante reacción histoquímica.

2.12.2 Análisis funcional del promotor EgCBF-1 mediante transformación estable de *A. thaliana*

Poblaciones de plantas transgénicas T1 y T2 de *A. thaliana* se sometieron a frío y a ABA. Se utilizaron plantas crecidas en placas MS Agar-Kan de 3 semanas de edad. Estas plantas se dispusieron sobre placas de vidrio que contienen un medio líquido nutritivo, compuesto por agua destilada suplementada con 0,4 g/l de sustrato nutritivo (Phostrogen).

Los experimentos en frío se realizaron sometiendo la placa, que contiene las plantas transgénicas en el medio líquido recién descrito, a una temperatura de 4 °C. Por otra parte, plantas control se trasladaron también a medio líquido, permaneciendo a temperatura ambiente. Se tomaron muestras en duplicado a intervalos de tiempo de 30 min, 60 min, 90 min y 120 min.

En el caso de los ensayos con ABA, se suministró al medio líquido un volumen adecuado de ABA preparado en metanol, tal que la concentración final de ABA corresponde a 100 µM. Plantas control son trasladadas al medio líquido suministrado con 0,1 % de etanol. La elección de este control negativo se debe a que la hormona ABA fue preparada en un alcohol, descartando de esta forma resultados provocados por el disolvente. En ambos casos las plantas permanecieron a temperatura ambiente. Se toman muestras en duplicado a intervalos de tiempo de 1 h, 2 h, 4 h y 24 h. La elección de estos intervalos de tiempo y la concentración de ABA se justifica por ensayos análogos descritos en la literatura⁵⁷.

Tanto para ensayos en frío, como en ABA, se realizó el ensayo de detección GUS mediante reacción histoquímica y RT-PCR.

2.12.3 Ensayo de detección GUS mediante reacción histoquímica

Una vez incorporada la construcción de interés a la célula vegetal, ya sea mediante transformación estable o transitoria, se realizó el ensayo de tinción GUS cualitativo. Éste consistió en poner en contacto con las células transformadas, el sustrato X-Gluc. De esta manera, células que estén expresando la enzima β -glucuronidasa serán capaces de degradar el sustrato y generar un producto azul fácilmente visible. En la Figura 4, se muestra la reacción a través de la cual el gen reportero degrada el sustrato X-gluc.

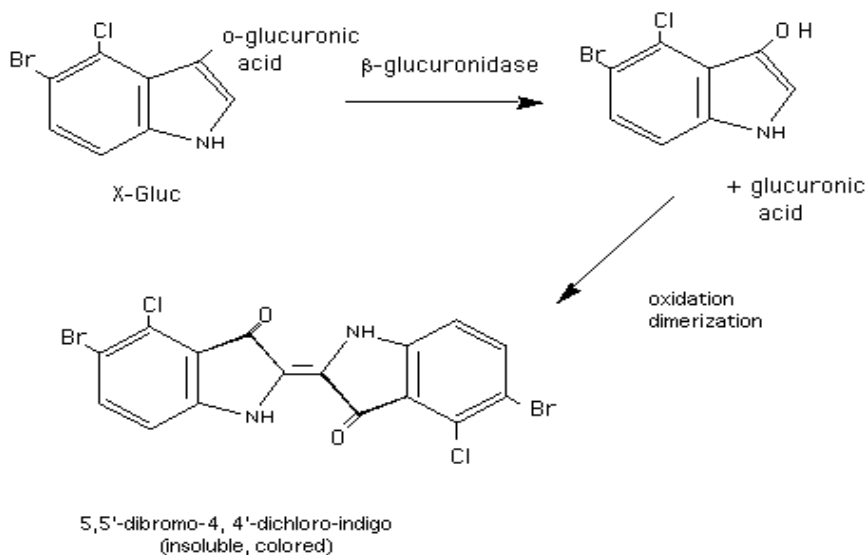


Figura 4: Reacción a través de la cual la enzima β -glucuronidasa degrada el sustrato X-gluc

Para esto, el tejido vegetal transformado fue sometido a vacío embebido en una solución de tinción que posee el sustrato X-Gluc (100 mM NaH_2PO_4 pH 7, 10 mM EDTA, 0,1 % p/v Triton X-100 y 0,1 mM X-Gluc disuelto en DMSO). Las hojas se sometieron a 50 cmHg de vacío dos veces durante 10 min cada vez. Posteriormente se incubaron las hojas en contacto con la solución de tinción a 37 °C durante 16 h.

Luego se realizó una fijación del sustrato coloreado en la hoja, poniendo en contacto las hojas con una solución de fijación (10 ml formaldehído 37 % stock, 10 ml ácido acético, 72 ml etanol 95 % y 155 ml agua desionizada, para un volumen total de 250 ml) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una extracción de clorofila mediante lavados sucesivos con etanol 100 %⁵⁸.

En resultados positivos se observó claramente la tinción azul en las hojas que, al perder la clorofila, se tornaron blancas.

2.13 ENSAYOS DE EXPRESIÓN MEDIANTE RT-PCR EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *A. thaliana*

El primer paso para los ensayos de RT-PCR fue la extracción de RNA total de plantas de *A. thaliana* sometidas a las distintas condiciones de estrés. Una vez extraído el RNA y comprobada su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, se procedió a realizar una reacción de PCR utilizando RNA como templado. El objetivo es determinar si existe contaminación del RNA con DNAg. De esta forma, las muestras de RNA que poseen contaminación por DNAg presentarán amplificado para un gen constitutivo. En este caso el gen constitutivo utilizado es actina y las reacciones de PCR se realizan a 45 ciclos. En la sección 2.9.1 se detalla la información relacionada con los partidores utilizados.

Una vez que se ha determinado que muestras presentan contaminación por DNAg, éstas deben ser tratadas con DNAsa para eliminar la contaminación. Al finalizar el tratamiento con DNAsa, se repite la reacción de PCR antes descrita, para confirmar que la contaminación ha sido efectivamente eliminada.

Al terminar el procedimiento anterior, es posible dar paso a la cuantificación del RNA mediante fluorescencia. Para esto se utiliza el kit Quant-iT RNA (Invitrogen). A partir de la cuantificación anterior, se realiza la transcripción reversa utilizando 1000 ng de RNA para cada muestra. Finalmente se prueba la integridad del cDNA realizando una reacción de PCR para el gen constitutivo y posteriormente puede ser utilizado para evaluar la expresión del gen de interés, en este caso, GUS.

A continuación se presentan los protocolos involucrados en el RT-PCR.

2.13.1 Extracción de RNA con TRIZOL

El protocolo utilizado para extraer RNA utilizando trizol fue descrito por el fabricante. Brevemente, las plantas sometidas a los distintos estímulos se pulverizaron en nitrógeno líquido utilizando un taladro. Luego se agregó 1ml de trizol, se agitó manualmente y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm y a 4 °C. Se recogió el sobrenadante. Posteriormente se agregó 200 µl de cloroformo frío y se agitó manualmente hasta obtener dos fases. Se centrifugó durante 15 min a 4 °C y 12000 rpm. Se recogió la fase superior y se repitió la extracción agregando 200 µl de cloroformo. Se procedió como se detalló anteriormente.

Se recogió la fase superior y se precipitó el RNA agregando 500 ml de isopropanol frío. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se centrifugó a 4 °C durante 10 min y a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* de RNA con 1 ml de etanol 75 % frío y preparado con agua con DEPC. Se agitó suavemente y se centrifugó a 4 °C durante 5 min a 7500 rpm.

Se descartó el sobrenadante y se secó el *pellet*. Se resuspendió el *pellet* de RNA agregando 60 µl de agua DEPC.

2.13.2 Tratamiento con DNAsa

Se utilizaron los reactivos DNAsa TURBO (Ambion, Inc.) y se procedió según las indicaciones del fabricante. Para un volumen de 60 µl de RNA, se procedió agregando 3 µl de DNAsa y 7 µl de Buffer, resultando un volumen final de 70 µl. Se incubó durante 1 hr a 37 °C. Se agregó 6 ml de Buffer de inactivación, se incubó 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 2 min a 10.000 rpm y temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante.

2.13.3 Cuantificación de RNA

Para cuantificar el RNA se utilizó el kit Quant-iT RNA Assay (Invitrogen) y se procedió según las descripciones del fabricante. El kit está basado en la utilización de un ligando fluorescente que se une selectivamente al RNA. La señal de fluorescencia se cuantificó utilizando un equipo para PCR en tiempo real y mediante interpolación en una curva de calibración, se determinó la cantidad de RNA en la muestra.

2.13.4 Transcripción Reversa

La transcripción reversa se realizó utilizando como templado 1000 ng de RNA total. Se utilizó 1µl del partidor reverso (oligo dT) a una concentración de 10 µM. El RNA se incubó con el partidor reverso durante 10 min a 70 °C. Luego esta mezcla se mantuvo en hielo durante 5 min. A continuación se agregaron 5 µl del tampón M-MLV, 1 µl de la enzima M-MLV (Invitrogen), 1 µl de dNTPs (10 µM), 25 unidades de inhibidor de RNasa (RNasa Out, Invitrogen), y agua hasta completar 25 µl de volumen final. Esta mezcla se incubó a 42 °C durante 1 h.

2.14 ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DE INSERCIÓN DEL PROMOTOR EgCBF-1::GUS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *A. thaliana* MEDIANTE SOUTHERN BLOT

Esta técnica se utilizó para determinar el número de copias en que se ha insertado la construcción molecular, promotor EgCBF-1::GUS, en el genoma de *A. thaliana*. Se utilizó DNAg proveniente de las plantas transgénicas de *A. thaliana* a evaluar, para realizar digestiones independientes con enzimas de restricción. Luego se transfirió el DNAg digerido a una membrana de nylon (Hybnd-XL, Amersham Biosciences) mediante capilaridad.

Por otra parte se sintetizó una sonda no radioactiva, marcada con digoxigenina, capaz de reconocer selectivamente un fragmento del gen reportero GUS. En los pasos de hibridación y detección se utilizó un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a una fosfatasa y un sustrato que al ser degradado por la fosfatasa emite quimio luminiscencia. La hibridación de la membrana y posterior detección de la sonda se realizó utilizando el kit Detector AP Chemiluminescent Blotting Kit.

A continuación se presentan los procedimientos involucrados en el *Southern blot*.

2.14.1 Síntesis de una sonda no radioactiva

La sonda se sintetizó amplificando mediante reacción de PCR un fragmento del gen GUS, con los partidores específicos GusF/GusR (ver sección 2.9.1). Los dNTPs utilizados fueron: mix de dNTPs sin dTTP 10 mM, dTTP 20 mM y dUTP-digoxigenina 1 mM. Las reacciones se realizaron con un volumen final de 50 µl. El producto de PCR fue purificado utilizando el kit E.Z.N.A Cycle –Pure Kit (Omega Bio-tek) y según las indicaciones del fabricante.

2.14.2 Digestión de DNA genómico y depurinación

Para realizar las digestiones del DNAg, se seleccionaron las enzimas de restricción *Bgl*II, *Eco*RI y *Hind*III, debido a que no cortan dentro de la construcción realizada. Las digestiones se llevaron a cabo a 37 °C durante 24 h. Un total de 10 µg de DNAg de *A. thaliana* transgénica se utilizó para cada digestión. Luego los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % y a 40 V.

Una vez concluida la electroforesis, el gel se colocó en una solución despurinizante (HCl 0,25 M) agitando suavemente durante 15 min. Transcurrido este tiempo se desechó la solución y se añadió la solución desnaturante (NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M) incubando en las mismas condiciones del paso anterior. Nuevamente se desechó la solución anterior y se agregó una solución neutralizante (NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M pH 8,0) incubándose por otros 15 min.

2.14.3 Transferencia a una membrana de nylon

El sistema de transferencia se realizó en una bandeja con solución tampón SSC (NaCl 3 M y citrato de sodio 0,3 M, pH 7,0) de la siguiente manera: dentro de la bandeja se colocó un soporte, sobre éste se puso papel Whatman 3 mm de tal manera que los extremos del papel estuvieran en contacto con la solución tampón. Luego se puso el gel de agarosa sobre el papel filtro cuidando que no quedaran burbujas de aire entre el gel y el papel, para a continuación poner sobre el gel la membrana de nylon. El tamaño de la membrana fue justo para cubrir la superficie del gel, evitando la formación de burbujas de aire. Luego, sobre la membrana se pusieron varios trozos de papel Whatman del mismo tamaño de ésta. Finalmente se apiló sobre el papel Whatman varios papeles absorbentes del mismo tamaño, hasta alcanzar una altura aproximada de 10 centímetros y sobre estos un peso suficiente para compactar los papeles y permitir una buena transferencia. El sistema de transferencia se dejó durante 18 h. Al día siguiente se desmontó recuperando la membrana de nylon. Por último la membrana se secó en papel Whatman y se fijó el DNA sometiéndolo a 5 min de luz UV.

2.14.4 Hibridación

Tanto la hibridación como la detección de la membrana se realizaron utilizando soluciones provistas por el kit (DetectorAP Chemiluminescent Blotting Kit, KPL). La membrana de nylon se prehibridó durante 1 h a 42 °C en solución de hibridación formamida adicionada con 200 µg/ml de DNA de espermio de salmón (Invitrogen).

A continuación, la membrana se hibridó durante 18 h a 42 °C con agitación constante en solución de hibridación formamida, adicionada con 50 ng/ml de la sonda marcada con digoxigenina (Ver sección 2.14.1). Luego se realizaron dos lavados de 15 min a temperatura ambiente con solución 2 x SSPE/0,1 % SDS y posteriormente dos lavados de 15 min a 55 °C con solución 0.2 x SSPE/0,1 % SDS. Se finalizó con un lavado de 5 min a temperatura ambiente con solución 2 x SSPE. Es importante señalar que la concentración de SSPE utilizada para el lavado a alta temperatura, es variable y depende del grado de estrictez que se requiera.

2.14.5 Detección y Revelado

Se incubó la membrana en solución de bloqueo de la detección por 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente se cambió la solución recién utilizada por una solución de detección que posee el anticuerpo anti-digoxigenina complementado con una fosfatasa. Se incubó durante 30 min con agitación y a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados de 5 min a temperatura ambiente y con agitación, utilizando una solución de lavado. A continuación se enjuagó la membrana 2 veces en una solución de ensayo durante 2 min cada vez y a temperatura ambiente.

La detección propiamente tal se realizó en un cuarto oscuro, agregando el sustrato CDP-Star e incubando a temperatura ambiente durante 5 min. Este sustrato, al ser degradado por acción de la fosfatasa acoplada al anticuerpo anti-digoxigenina, emitió quimio luminiscencia. La membrana se secó con papel absorbente y se expuso una placa fotográfica durante intervalos de tiempo variables. Finalmente la placa fotográfica se reveló enjuagándola en la solución reveladora Agfix (AGFA) y posteriormente en solución fijadora de la misma marca, para terminar con un enjuague en agua.

III. RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS ESTRATÉGICO PARA LA INTRODUCCIÓN DE *Eucalyptus globulus* TOLERANTES A LAS BAJAS TEMPERATURAS EN LA INDUSTRIA FORESTAL CHILENA

La industria forestal es la segunda generadora de divisas para el país y la primera basada en un recurso forestal renovable. Genera cerca de 130 mil empleos directos y algo más de 300 mil indirectos en las áreas de silvicultura y cosecha, industria primaria y secundaria y servicios. A lo largo de los últimos 15 años, ha generado aproximadamente el 13 % del total anual de los retornos por exportaciones que realiza Chile.

Uno de los elementos claves de la competitividad del sector forestal chileno lo constituye el bajo costo de formación de su madera, dado el alto rendimiento de las plantaciones de pino y eucalipto. En Chile el crecimiento de pino se estima en cerca de 20 m³/ha-año, mientras que en Estados Unidos varía entre 7 y 15 m³/ha-año y en Escandinavia, el crecimiento de los bosques de coníferas no supera 2 m³/ha-año⁵⁹.

La madera representa entre el 40 y el 75 % del costo de producción de la industria primaria para productos como celulosa, papel, tableros y madera aserrada. Dado el bajo costo de formación de madera en nuestro país, los costos de producción de celulosa son bajos. Esta es una de las razones que explica la competitividad a nivel mundial que posee la industria forestal chilena, que le ha permitido un creciente desarrollo.

La biotecnología puede cambiar el mapa de competitividad a nivel mundial, por la vía de lograr mejores rendimientos o mayor calidad. De esta forma, diversas experiencias en Estados Unidos muestran un mejor rendimiento en comparación a los chilenos, con coníferas locales modificadas mediante biotecnología. Brasil en tanto, ha desarrollado un ambicioso programa de genómica de eucalipto, con el fin de modificar las variables que permitan aumentar su productividad.

Por esta razón, resulta trascendental que Chile se posicione rápidamente a la vanguardia de las investigaciones en biotecnología forestal. De esta forma será posible mantener su posición en el mercado internacional, mejorar el rendimiento de las plantaciones forestales y abrir el paso para el desarrollo de nuevas tecnologías que hagan más rentable el negocio forestal.

3.1.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR FORESTAL

En esta sección se presenta el panorama global de la industria forestal nacional. Se incluyen cifras de productividad, los principales mercados para los productos forestales chilenos y las empresas forestales chilenas. En segundo lugar, se aborda la legislación chilena atinente a los organismos genéticamente modificados y se discute sobre los proyectos relacionados a biotecnología forestal que se desarrollan en el país y en el mundo.

3.1.1.1 Chile en el marco mundial de los productos forestales

La industria forestal, junto a la minería y la industria de la fruta, ha sido uno de los pilares del éxito exportador de nuestro país por más de cuatro décadas. Chile posee aptitudes naturales que le han permitido desarrollar de forma sustentable y vigorosa la industria forestal. Además, la industria forestal ha sido capaz de mantener su competitividad a lo largo de los años, debido principalmente su capacidad innovadora.

El sector forestal chileno tiene una orientación eminentemente exportadora. Durante el año 2007, las exportaciones forestales chilenas registraron la cifra récord de US\$ 4.952 millones, lo que representó un incremento de 27,3 % respecto del nivel logrado en el 2006. Este buen resultado se produjo por el efecto combinado del alto precio de la pulpa y del aumento en el volumen exportado del mismo producto.

Los 20 principales países de destino concentraron el 90 % del valor total exportado por el sector forestal chileno. Estados Unidos se mantuvo en el primer lugar de este ranking, con una participación de 16,8 %. Sin embargo, el monto exportado a este mercado experimentó una baja de 23,2 % en relación al 2006, debido a la crisis que afecta al sector de la construcción. Esta crisis ha resultado en una caída notable de las importaciones de productos forestales que realiza este país. En el segundo lugar del ranking de mercados se ubicó China, con una participación de 14,9 % y un incremento de 102,5 % respecto de 2006, principalmente por efecto de las mayores compras de pulpa⁶⁰.

En la Figura 5 se presentan los principales mercados para los productos forestales chilenos, incluyendo el porcentaje de participación durante el 2007 para los principales países. Entre paréntesis y junto al nombre de cada país se presenta además, la variación 2007/2006.



Figura 5: Principales mercados para los productos forestales chilenos (Fuente: INFOR, 2008)

Respecto a las exportaciones mundiales chilenas, éstas representaron un 1,7 % del monto mundial transado en el año 2004. Actualmente, la contribución chilena al comercio mundial de productos forestales es inferior al 2 % y perfilándose en el lugar 17° entre los países exportadores de productos forestales mundiales. En la Tabla 10 se presentan las cifras de producción y porcentaje de participación del mercado forestal mundial.

Tabla 10: Participación chilena en el mercado forestal mundial (Fuente: CORMA, 2004)

| | Mundo | CHILE | Lugar | % Participación |
|---|----------------|--------------|------------|-----------------|
| Papel Periódico (Mill Ton) | 17,8 | 0,2 | 14° | 1,1 |
| Chapas (Mill Ton) | 3,3 | 0,04 | 13° | 1,2 |
| Madera Aserrada (Mill Ton) | 90 | 1,4 | 12° | 1,6 |
| Astillas (Mill Ton) | 39,7 | 3,2 | 2° | 9,6 |
| Celulosa (Mill Ton) | 38,1 | 2,1 | 5° | 5,5 |
| TOTAL EXPORTACIONES DE PRODUCTOS FORESTALES (Millones de US\$) | 132.157 | 2.205 | 17° | 1,7 |

Es importante señalar que para productos forestales como la pulpa de celulosa, Chile se ha posicionado entre los líderes a nivel mundial. En la Figura 6 se presentan los principales países exportadores de celulosa y su participación en el mercado internacional.

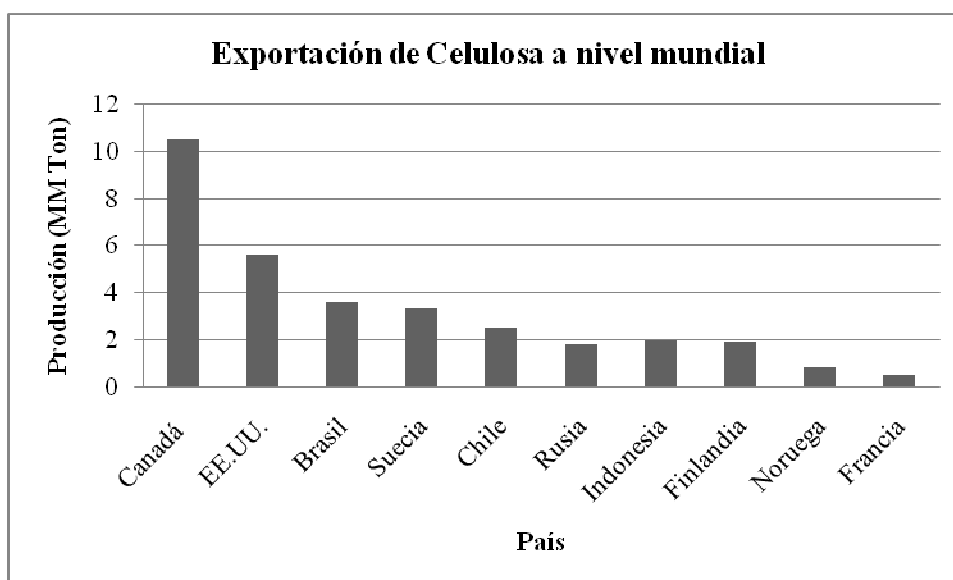


Figura 6: Exportaciones mundiales de Celulosa (Fuente: CORMA, 2004)

Es importante señalar que la participación del país en el mercado mundial de los productos forestales ha ido en aumento, principalmente en el caso del mercado de la celulosa.

3.1.1.2 Participantes de la industria forestal chilena

El sector está compuesto por firmas privadas, las que son propietarias de plantaciones de pino y eucalipto. Estas firmas en su mayoría están integradas verticalmente por plantas de pulpa, aserraderos y plantas productoras de papel. Las dos grandes compañías forestales de Chile son el Holding Arauco y el Holding CMPC. Estas dos compañías, que se encuentran entre las principales cincuenta firmas del rubro forestal a nivel mundial, conforman las dos empresas productoras de pulpa del país y concentran casi la totalidad de las plantaciones de pino.

Como grupos empresariales, Arauco concentra más del 45 % del valor exportado por el sector, mientras que las empresas del grupo CMPC alcanzan una participación en torno al 30 %. En la Figura 7 se muestran las principales empresas exportadoras chilenas, y su porcentaje de participación en el mercado. Entre paréntesis y junto al nombre de cada empresa se presenta además, la variación 2007/2006.



Figura 7: Principales empresas exportadoras de productos forestales chilenos (Fuente: INFOR, 2008)

Las expectativas a futuro para la industria forestal chilena son auspiciosas. A pesar de la crisis en Estado Unidos, principal país de destino de las exportaciones chilenas, las cifras indican un incremento en las exportaciones forestales, las cuales han sido impulsadas principalmente por la industria de la celulosa. De esta forma, entre Enero y Junio del 2008 las exportaciones forestales llegaron a US\$ 2.443 millones, representando un incremento de 13 % respecto a igual período del 2007. Cabe señalar que debido a la crisis estadounidense, las exportaciones de celulosa se han enfocado en el mercado chino. Así, en el período antes señalado, China se perfila como el nuevo mercado líder para los productos forestales chilenos, con un 17 %, relegando a Estados Unidos a un segundo lugar con 14 %⁶¹.

3.1.1.3 Recursos forestales y plantaciones de bosque

Un 45 % del territorio continental chileno posee aptitudes para el desarrollo forestal. De esta superficie, 18,9 millones de hectáreas han sido calificadas como de protección, mientras que 14,0 millones de hectáreas corresponden a terrenos forestales productivos.

Dentro de la superficie productiva, 7,5 millones de hectáreas están cubiertas de bosque nativo y 1,7 millones de hectáreas corresponden a plantaciones forestales. La superficie restante corresponde a terrenos descubiertos y susceptibles a ser forestados⁶².

Durante el año 2007 se llevó a cabo VII Censo Forestal y Agropecuario, cuyos principales objetivos fueron determinar las transformaciones que ha experimentado la estructura agraria chilena relacionadas con el uso y tenencia del suelo, tipos de cultivos, tecnología y mano de obra empleada,

entre otros. De esta forma es posible contar con información relativa a las especies de interés forestal presentes en el país y distribución geográfica de estas plantaciones.

Con esta información ha sido posible determinar que la variedad forestal de mayor importancia económica es *Pinus radiata*, especie introducida que posee una participación del 66 % de la superficie total plantada con fines forestales. En la Figura 8 se presenta el porcentaje de hectáreas plantadas para las principales especies de interés para la industria forestal chilena.

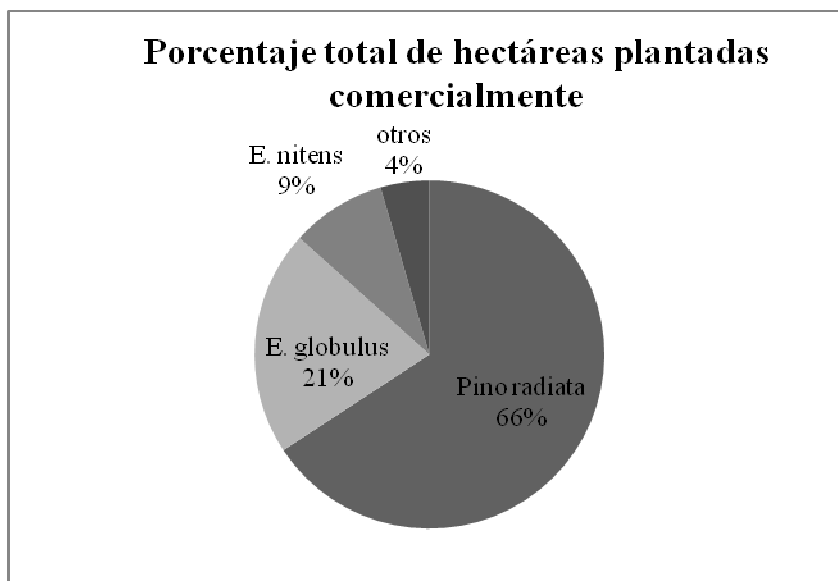


Figura 8: Plantaciones forestales totales (Fuente: VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal, 2007)

De la Figura 8 se observa que después de las variedades de pino, las especies de eucalipto son las segunda con mayor participación en las plantaciones forestales chilenas. En conjunto, pino radiata y las variedades de eucaliptus concentran cerca del 96 % de las plantaciones forestales a nivel nacional.

Con respecto a la distribución geográfica de las plantaciones forestales, se ha determinado que existen un poco menos de 1.200.000 hectáreas plantadas con *P. radiata*, alrededor de 377.000 hectáreas de *E. globulus* y poco menos de 160.000 hectáreas de *E. nitens*. En la Tabla 11 se presentan las hectáreas plantadas para las tres principales especies de interés forestal presentes en Chile, de acuerdo al número de hectáreas plantadas por región.

Tabla 11: Plantaciones forestales por regiones (Fuente: VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal, 2007)

| REGIÓN | <i>E. nitens</i> (ha) | <i>E. globulus</i> (ha) | <i>P. radiata</i> (ha) |
|----------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| Total país | 159.230,60 | 377.016,30 | 1.187.795,32 |
| I de Tarapacá | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| II de Antofagasta | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| III de Atacama | 11,00 | 37,70 | 0,00 |
| IV de Coquimbo | 29,30 | 73,00 | 0,00 |
| V de Valparaíso | 291,36 | 12.467,65 | 5.177,42 |
| VI de O'Higgins | 600,20 | 16.867,65 | 45.127,05 |
| VII del Maule | 3.377,00 | 22.145,93 | 287.004,96 |
| VIII del Bío-Bío | 45.277,44 | 167.122,27 | 523.324,15 |
| IX de La Araucanía | 42.496,70 | 94.527,10 | 218.029,24 |
| X de Los Lagos | 15.126,20 | 16.967,30 | 12.025,30 |
| XI Aysen | 2,00 | 0,00 | 0,00 |
| XII de Magallanes y Antártica | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Región Metropolitana de Santiago | 291,00 | 1.322,80 | 5,10 |
| XIV de Los Ríos | 51.728,40 | 45.484,90 | 97.102,10 |
| XV de Arica y Parinacota | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

De la Tabla 11 es posible inferir que las regiones VII, VIII, IX, X y XIV concentran cerca del 95 % de las plantaciones de interés forestal chilenas.

3.1.1.4 *Eucalyptus globulus*

El género *Eucalyptus* comprende más de 700 especies diferentes e incluye algunas de las variedades leñosas de más rápido crecimiento en el mundo. La superficie plantada asciende aproximadamente a 18 millones de hectáreas en 90 países, siendo de esta forma una de las variedades de árboles más plantados en el mundo⁶³.

Las especies de eucalipto presentan un rápido crecimiento y alto rendimiento de madera dura. Muchas especies se cultivan comercialmente en numerosas partes del mundo para producir pulpa para papel de alta calidad.

Pero las variedades de eucalipto se consideran también una fuente ideal para la producción limpia de biocombustibles como bioetanol. Por esta razón, contar con plantaciones de eucaliptos resulta un componente crítico en muchas naciones del mundo, para impulsar la energía verde y reducir la dependencia del petróleo extranjero⁶⁴.

En nuestro país, las hectáreas plantadas con *E. globulus* ascienden a 377.016,30 hectáreas, ubicadas en las regiones III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X y XIV del país. En la Figura 9 se presenta la distribución de plantaciones de *E. globulus* y *E. nitens* para cada una de las regiones de nuestro país.

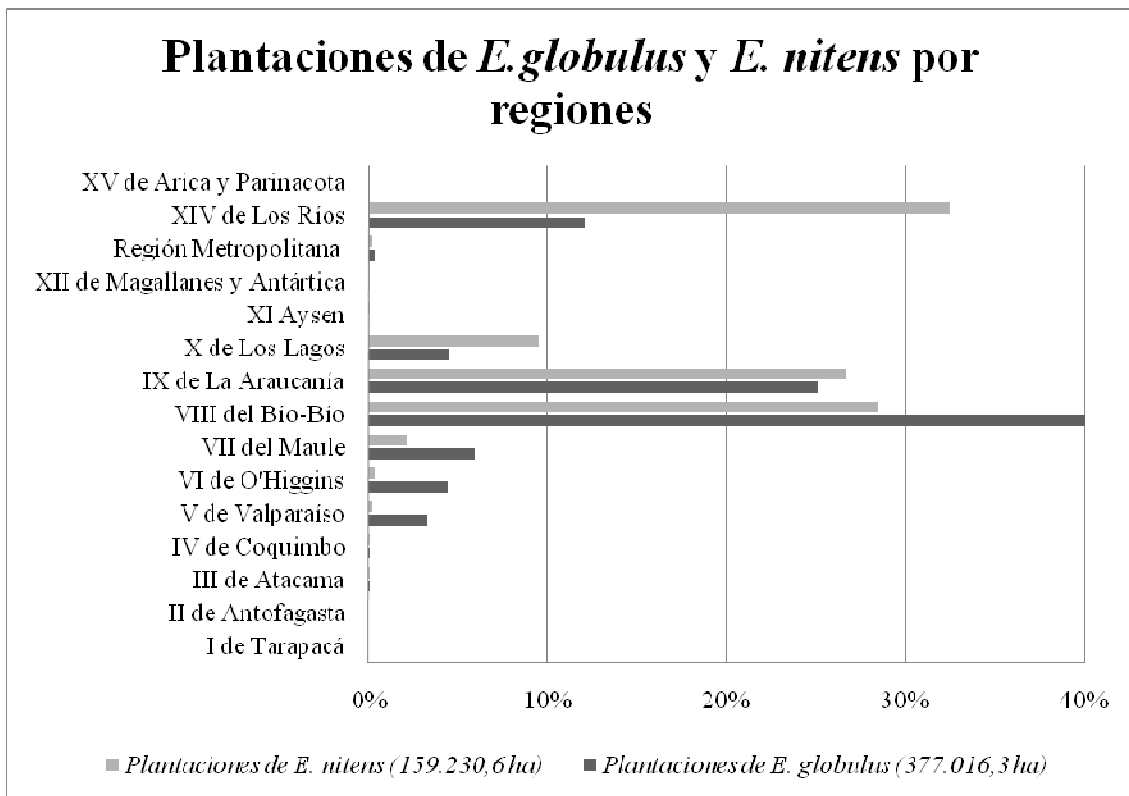


Figura 9: Plantaciones de *E. globulus* y *E. nitens* por regiones (Fuente: VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal, 2007)

En la Figura 9 es posible observar que las plantaciones de *E. globulus* están presentes principalmente hacia el centro norte del país, mientras que *E. nitens* presenta mayor presencia hacia el sur del país. Esto se debe principalmente a que *E. globulus* presenta baja tolerancia a las bajas temperaturas, mientras que *E. nitens* presenta mayor tolerancia a heladas.

3.1.2 BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR FORESTAL

3.1.2.1 Marco General

El auge experimentado por el sector forestal chileno se debe a una combinación de diversos factores. Sin embargo, éste se explica principalmente por la existencia de una industria que ha aprovechado eficientemente las ventajas naturales que posee el país. Por lo tanto, resulta fundamental la aceleración del avance nacional en materia de ciencia y tecnología, ya que con el amplio uso de la

biotecnología por muchos países competidores, las ventajas naturales del país no serán suficientes para mantener la viabilidad del negocio forestal nacional en el mediano y largo plazo.

Los principales competidores de Chile poseen un grado avanzado de desarrollo en este campo. Nueva Zelanda y Australia, y en menor medida Canadá, EEUU y Brasil, están desarrollando y aplicando biotecnología forestal fuertemente en especies de interés, tales como pino y eucalipto.

La biotecnología forestal involucra la cooperación de tres disciplinas principales: la biología molecular, la transformación genética y la propagación vegetativa. El área que más avances ha logrado hasta la fecha, corresponde al área de la producción vegetativa. Estos avances han sido realizados por laboratorios privados asociados a las grandes empresas forestales y a otros centros de investigación. Técnicas como la organogénesis, y en menor medida la embriogénesis somática, se están implementando con éxito en los laboratorios chilenos.

En cuanto a la producción y plantación de árboles transgénicos en nuestro país, se está aún en sus comienzos. Aunque se ha mostrado que es posible transformar pinos, no se han producido plantas transgénicas que permitan demostrar su viabilidad. Esto se debe principalmente a que las especies forestales poseen una vida longeva, lo dificulta demostrar que la expresión de los genes exógenos es estable en el tiempo. En eucaliptos, los resultados han sido más auspiciosos.

La producción de plantas transgénicas puede llevar a la obtención de árboles genéticamente mejorados, que presenten mejores tasas de crecimiento, resistencia a patógenos y herbicidas, o cambios en la composición de la madera, que permita aumentar el contenido de celulosa y bajar el de lignina, haciendo que el proceso de producción de celulosa sea más eficiente⁶⁵.

3.1.2.2 Normas chilenas e internacionales respecto a organismos genéticamente modificados

En cuanto a la legislación ambiental, la Ley N°19.300 de Bases Generales del Medio Ambiente y el Decreto Supremo N°95/2001 del Ministerio Secretaría General de la Presidencia, regulan el Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (SEIA). Se establece que los proyectos que incluyen el uso de organismos genéticamente modificados, comprendidos en el reglamento de la Ley, deben presentar un estudio y no una declaración de impacto ambiental. Por lo tanto, la legislación nacional en materia de evaluación de impacto ambiental se refiere al tema de los organismos genéticamente modificados solamente en la medida en que un proyecto de inversión, de los que deben someterse a SEIA según este reglamento, genere dentro de sus efectos o consecuencias, la liberación al medio ambiente de este tipo de organismos, en cuyo caso se le exigirá un estudio y no una declaración de impacto ambiental.

La legislación ambiental chilena incluye la adscripción del país al Convenio sobre la Diversidad Biológica, ratificado mediante Decreto Supremo N°1963/1994 del Ministerio de Relaciones Exteriores. De éste se desprende, entre otras materias, la obligación de regular y resguardar

el acceso a los recursos genéticos del país, el acceso a tecnologías desarrolladas en otros países en base a esos recursos y también el acceso a los conocimientos tradicionales de las comunidades locales.

En cuanto a la legislación agraria, el SAG (Servicio Agrícola y Ganadero), en virtud de sus facultades en materia de protección agrícola y su responsabilidad de proteger la sanidad vegetal y animal, además de evitar los efectos adversos de la introducción de especies exóticas al país, dictó resoluciones que establecen normas para la internación e introducción al medio ambiente de organismos vegetales vivos de propagación. La Resolución N°1.523/2001 recoge actualmente estas disposiciones y permite sólo el cultivo de semillas transgénicas para la exportación, previa evaluación de riesgo y existencia de la aplicación de diversas medidas de bioseguridad dependiendo del caso. No se ha regulado ni autorizado otro tipo de cultivos genéticamente modificados para otros fines ni para el sector forestal. Tampoco se ha regulado la autorización para producción u otro uso de animales transgénicos ni para alimentos transgénicos destinados a animales. Lo propio ha sucedido con los microorganismos para aplicaciones agrícolas.⁶⁶

La normativa actual es insuficiente para lograr que el país incorpore como actividad comercial el cultivo de organismos transgénicos. Se deberá establecer una normativa que regule claramente el procedimiento para autorizar la liberación de organismos transgénicos para diversos usos comerciales en el país. Lo anterior, estableciendo las regulaciones necesarias para las distintas etapas de desarrollo y comercialización de los organismos genéticamente modificados los cuales deberán basarse en criterios de análisis de riesgo caso a caso.

En cuanto a las normas internacionales, la norma internacional que aborda el tema del comercio de productos biotecnológicos desde la perspectiva de la bioseguridad, es el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología, derivado del Convenio sobre la Diversidad Biológica. El Protocolo fue acordado en Montreal el año 2000, sin que aún haya entrado en vigencia. Chile lo firmó en Mayo del 2000, pero aún no ha sido ratificado por el Congreso.

Entre los ítems del protocolo, se indica que el país exportador de transgénicos deberá suministrar información previa detallada a cada país importador del primer embarque, para que el receptor realice los análisis pertinentes a fin de resguardarse frente a posibles riesgos. También permite a las partes importadoras invocar el Principio de Precaución, esto es, tomar acciones preventivas frente a hipotéticas amenazas a la biodiversidad, aún cuando no exista evidencia científica inequívoca sobre el tema. Por último, es importante señalar que, si bien el Protocolo de Cartagena impone restricciones al movimiento entre fronteras de plantas o semillas transgénicas, no lo hace a su cultivo.

Es importante que las instituciones del país consideren, para establecer el marco regulatorio para la biotecnología, los compromisos internacionales que ha adquirido Chile en materias de comercio, propiedad intelectual y bioseguridad, entre otras. Se debe tener presente que dichos

compromisos están comprendidos en un marco jurídico internacional que define en última instancia la legalidad de las restricciones comerciales que pudiera imponer algún país en particular.

3.1.2.3 Biotecnología forestal en especies de eucalipto

En Chile se han realizado estudios preliminares respecto a mejoramiento genético de especies de pino y eucalipto, principalmente debido a que estas especies son las especies introducidas de mayor importancia económica para nuestro país.

La primera compañía que comenzó a experimentar con biotecnología en Chile fue Bioforest, creada en 1990 y empresa subsidiaria de Forestal Arauco, cuyo programa de investigación se centra en mejoramiento clonal de pinos y eucaliptus. A su vez, Royal Dutch/Shell en Chile y Uruguay, estudian la producción de un eucaliptus genéticamente modificado con un tipo diferente de lignina que facilite su remoción para la industria de la pulpa y el papel. En Chile, la Forestal Monte Águila S.A, miembro de este grupo, efectuó pruebas de campo con 60 plantas de *E. grandis* resistentes al herbicida glifosato en 1999, bajo la supervisión del SAG. Sin embargo, la forestal no posee actualmente plantaciones de eucaliptos transgénicos.

En 1999 y con el apoyo de CORFO, se creó Genfor S.A. que es una sociedad entre Fundación Chile, Sylvagen de Canadá e Interlink de Estados Unidos. Su objetivo es proveer a la industria forestal chilena y americana de tecnologías de mejoramiento genético. Estas tecnologías involucran mejoramiento clonal y creación de variedades de pino modificadas para otorgarles resistencia a la polilla del brote, a enfermedades fungosas y a características relativas a la calidad de la madera.

Existen además proyectos asociados a entes gubernamentales, como INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias), INFOR (Instituto Forestal de Chile) y el Centro de Biotecnología Forestal de la Universidad de Concepción (CB-UdeC), que apunta al trabajo conjunto con las empresas del sector forestal. Los proyectos que se están desarrollando abordan la problemática asociada a la baja tolerancia al frío en *E. globulus*, resistencia a plagas y mejoramiento en la calidad de la madera en especies de eucaliptos y pino. A esto se suman investigaciones asociadas a universidades, como la Universidad Católica de Chile, quienes han sido los primeros en Chile y los segundos en el mundo después de Nueva Zelanda, en producir embriones de *P. radiata* transformados con un gen reportero.

Tal como en Chile existen una serie de proyectos que abordan la baja tolerancia al frío de *E. globulus*, en el mundo se han desarrollado otros programas de investigación. Muchos de ellos se encuentran en etapas avanzadas, tales como transformación de especies de eucalipto e incluso pruebas en terreno.

Dentro de las empresas líderes en ingeniería genética de árboles se encuentra la estadounidense ArborGen, que es propiedad conjunta de tres compañías de productos forestales: International Paper, MeadWestvaco y Rubicon, con sede en Nueva Zelanda. La compañía está desarrollando un eucalipto genéticamente modificado para sobrevivir a las olas de frío, permitiendo que los árboles sean cultivados más extensamente en Estados Unidos. La variedad de eucalipto modificado corresponde a *Eucalyptus grandis*. Durante el año 2007 la compañía recibió los permisos gubernamentales para comenzar los ensayos en campo de esta variedad de eucalipto transgénico y esperan que en los próximos cinco a diez años salgan al mercado⁶³. Este permiso corresponde a una ampliación de una aprobación previa del Servicio de inspección en Salud Animal y Vegetal y del Servicio de Reglamentación en Biotecnología (APHIS-BRS, Animal and Plant Health Inspection Service - Biotechnology Regulatory Services, USDA). Este es un caso que marcará precedentes a nivel mundial, ya que en base al análisis de todas las observaciones hechas durante el proceso de comentarios públicos abiertos, la BRS determinó que no habría consecuencias ambientales importantes por desarrollar este proyecto.

A su vez, la empresa de origen israelita Floragene, ha logrado exitosamente desarrollar una tecnología para transformar especies de eucaliptus. Esta compañía ha descubierto y desarrollado una nueva modalidad de transformación, basado en la modificación de la pared celular. Teniendo esta tecnología a su disposición, estarían en condiciones de probar genes que le otorguen tolerancia al frío a eucaliptos e incluso de prestar el servicio de transformación de eucaliptos al resto de los centros de investigación del mundo.

3.1.3 ANÁLISIS DE FACTORES INTERNOS

3.1.3.1 Cadena de Valor

La cadena de valor permite integrar el conjunto de eslabones que conforma un proceso económico, desde la materia prima a la distribución de los productos terminados. En cada parte del proceso se agrega valor. Una cadena de valores completa, abarca toda la logística desde el cliente al proveedor. De este modo, al revisarse todos los aspectos de la cadena se optimizan los procesos empresariales y se controla la gestión del flujo de mercancías e información entre proveedores, minoristas y consumidores finales.

En este caso, el trabajo realizado a través de la tesis pertenece a uno de los primeros eslabones en la cadena de valor. Para este análisis se asume que se obtienen resultados positivos en cada una de las

etapas de la cadena de valor y que se logra finalmente llegar a un producto comercializable. En este contexto, la cadena de valor permitirá dar una visión global con respecto a las etapas necesarias para obtener una variedad de *E. globulus* tolerante a las bajas temperaturas.

En la Figura 10 se esquematiza los distintos eslabones de la cadena de valor para la introducción de *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena. Posteriormente se detallan las actividades de apoyo y las actividades primarias.

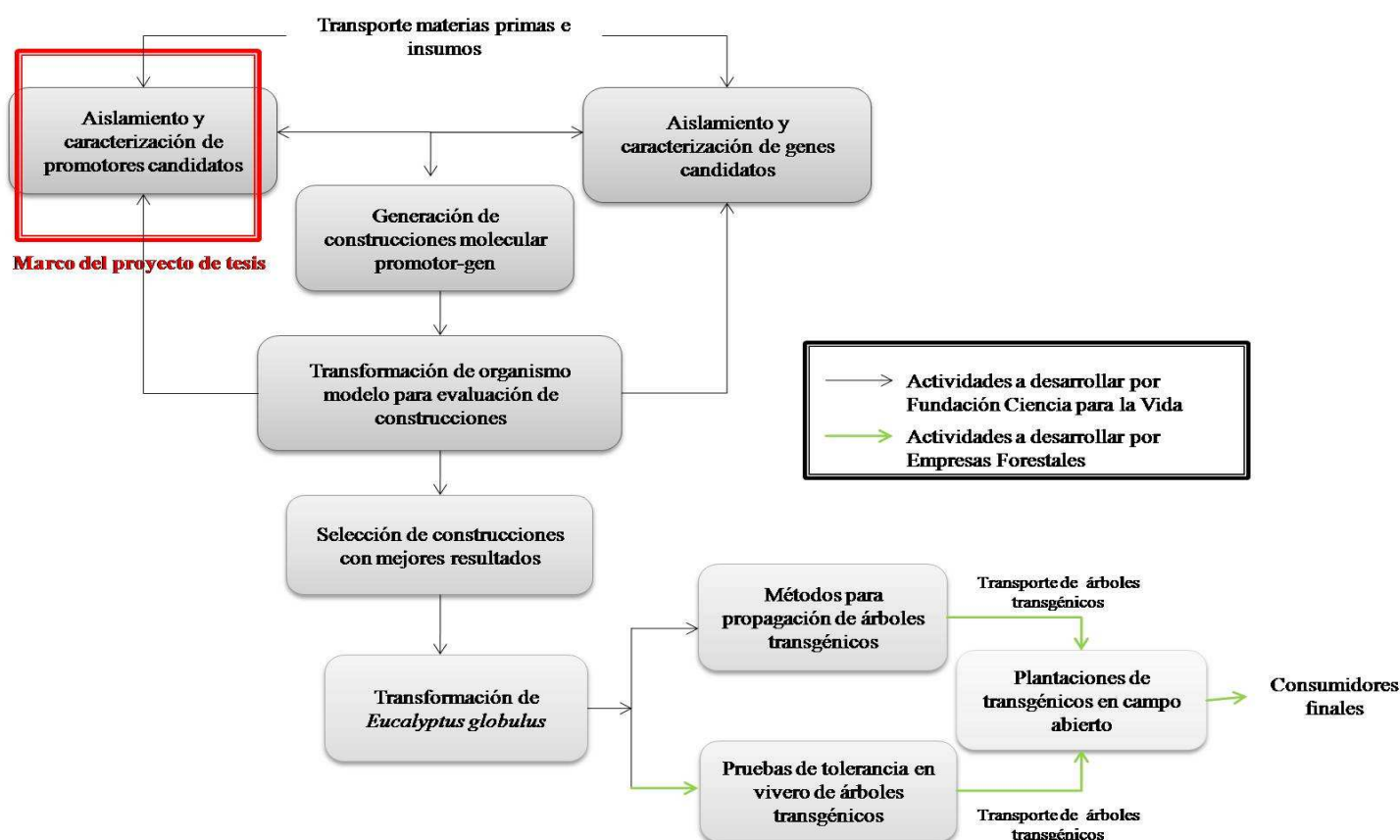


Figura 10: Cadena de Valor para la introducción de *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena

Actividades de Apoyo

Infraestructura de la Firma

En el marco del trabajo de tesis, la Fundación Ciencia para la Vida es la entidad que lleva a cabo el negocio. Se trata de una agrupación privada sin fines de lucro, cuyo principal objetivo es fomentar el uso de la Biotecnología en los diversos sectores productivos chilenos y especialmente orientada a las industrias exportadoras con alto impacto económico. En este contexto, la Fundación actúa como un puente entre el sector productivo y académico, y entre el país y los actores internacionales. En particular, ha desarrollado programas de investigación y desarrollo en conjunto

con el sector privado, usando la biotecnología para resolver los principales problemas que afectan a las industrias de exportación chilenas.

Posee un directorio formado por tres miembros, en el cual se toman las decisiones estratégicas en materias administrativas, financieras y de planificación. Sus instalaciones se encuentran ubicadas en la comuna de Ñuñoa, Santiago-Chile y cuenta con amplios laboratorios aptos para la realización de las actividades experimentales.

Manejo de Recursos Humanos

Al tratarse de una entidad relativamente pequeña en cuanto al número de trabajadores, es el director ejecutivo quien toma las decisiones estratégicas relacionadas con recursos humanos. Es responsable de desarrollar y administrar las políticas, programas y procedimientos que proveen una estructura organizativa eficiente, trabajadores capaces, oportunidad de progreso, satisfacción en el trabajo y seguridad en el mismo de todos los trabajadores.

En conjunto con el director ejecutivo, cada jefe de laboratorio propone en forma particular, sus requerimientos en cuanto a contratación de personal, programas de capacitación y entrenamiento para los empleados.

Desarrollo de Tecnología

Las tecnologías asociadas a la obtención de una variedad de *E. globulus* tolerante a las bajas temperaturas, serán desarrollada íntegramente por la Fundación Ciencia para la Vida. La Fundación cuenta con una amplia experiencia en el desarrollo de tecnologías de DNA recombinante y utilización de herramientas biotecnológicas en el mejoramiento genético.

Instalaciones

Se cuenta con instalaciones suficientes para realizar el proyecto hasta el paso de transformación de *E. globulus*. Con un terreno de aproximadamente 3 ha y 1500 m² construidos, existe también la posibilidad de construir un vivero para el trabajo con árboles de mayor tamaño. Cuenta además con bodegas para almacenamiento de materias primas, vivero para plantas pequeñas y cultivo *in vitro*, además de los laboratorios.

En cuanto al transporte de materias primas, los insumos utilizados son distribuidos por las respectivas empresas proveedoras.

Aún no se ha estudiado si el transporte entre las instalaciones de la Fundación y las posibles empresas forestales compradoras del producto será mediante un servicio de tren o camiones. En ambos casos, se tratará de servicios sub contratados.

Los equipos necesarios para realizar la producción de *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas, forman parte del equipamiento de los laboratorios. En caso de requerir equipos adicionales, serán comprados a empresas nacionales o internacionales especializadas en cada equipo.

Actividades Primarias

Logística de Entrada:

El primer insumo necesario para comenzar los experimentos, son plantas silvestres de *E. globulus*. Estas fueron compradas al vivero Antumapu de la Universidad de Chile, y corresponden a semillas de la especie de interés. El material vegetal ha sido propagado dentro del laboratorio a partir de estas semillas.

El resto de los insumos de laboratorio ha sido adquirido a través de empresas especializadas, representantes en Chile de compañías internacionales, o empresas nacionales. La relación entre la Fundación y estos proveedores ha sido fuertemente establecida a lo largo de los años de funcionamiento de la Fundación, y es un factor que es de interés de todos los proyectos de la Fundación, en particular, del que se desarrolla en este estudio.

Como se ha mencionado anteriormente, el transporte de materias primas es una actividad desarrollada por las empresas proveedoras. De esta forma, todos los insumos son llevados a las instalaciones de la Fundación por sus respectivos proveedores.

Operaciones

El proceso a través del cual es posible conseguir un *E. globulus* tolerante a las bajas temperaturas es en serie. Es además, un proceso secuencial en el que se debe cumplir obligatoriamente una primera etapa para pasar a la siguiente. El trabajo desarrollado por la Fundación hasta la fecha ha conseguido establecer una serie de genes candidatos y sus respectivos promotores, que eventualmente podrían ser utilizados para otorgarle tolerancia a las bajas temperaturas a *E. globulus*. Este trabajo corresponde a las primeras etapas del proyecto, como se ha descrito en la Figura 10.

Por lo tanto y para efectos del trabajo que se está desarrollando, se considera como primer proceso productivo la selección de genes candidatos y promotores que podrían ser utilizados en etapas posteriores del proyecto. Considerando lo anterior, en la Figura 11 se presenta un diagrama del

proceso productivo realizado hasta la fecha en la Fundación Ciencia para la Vida, en el marco del proyecto que busca introducir *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena.

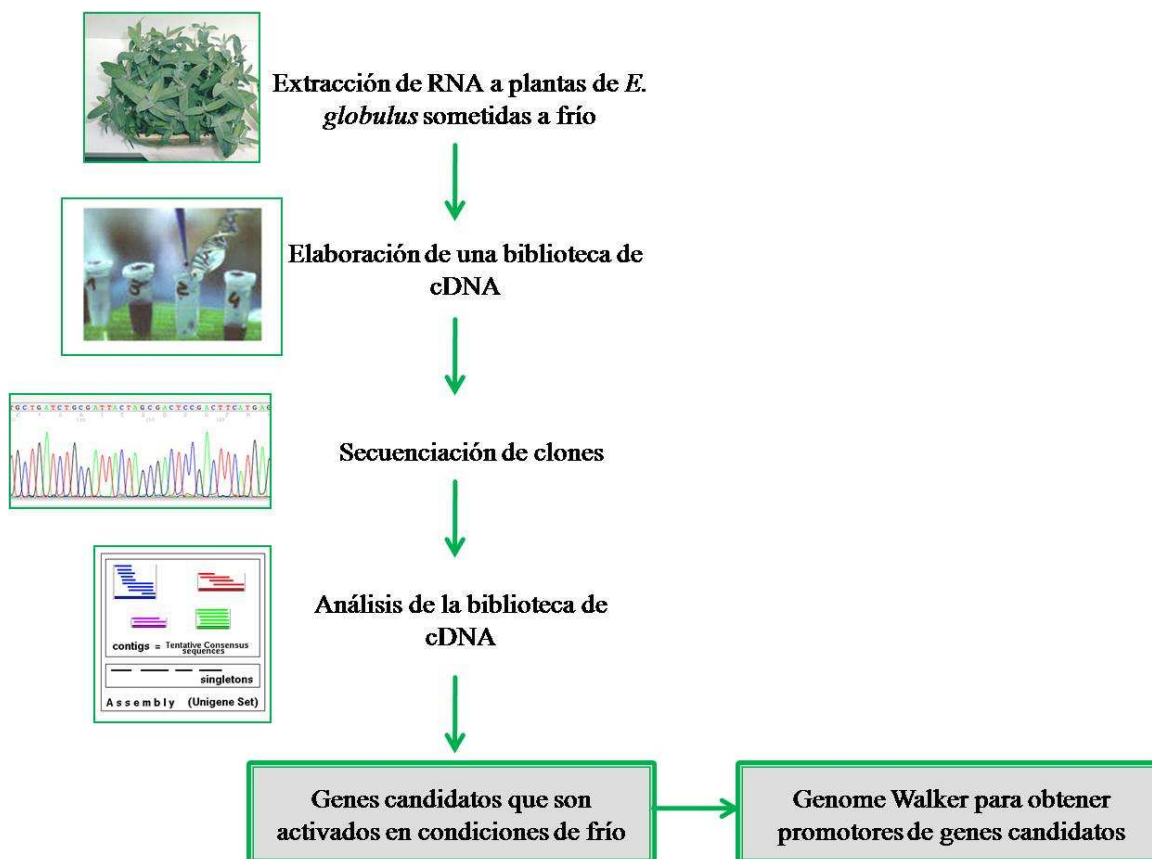


Figura 11: Diagrama productivo para la identificación de genes y promotores candidatos que otorgarían tolerancia al frío a *E. globulus*

Una vez que se evalúen los genes y promotores candidatos, se puede proseguir con etapas posteriores del proyecto. De esta manera, se generarán construcciones moleculares, en las que un promotor en particular dirigirá la expresión de un gen candidato. Se evaluarán las construcciones en un organismo modelo, probablemente *A. thaliana* o *N. benthamina*, de manera tal que se pueda establecer si la construcción molecular propuesta otorga tolerancia a las bajas temperaturas.

Luego, se seleccionarán aquellos candidatos que resulten mejor evaluados en la etapa anterior para transformar *E. globulus*. Este paso es de vital importancia para el proyecto, principalmente porque, hasta la fecha, no se cuenta con protocolos establecidos para la transformación genética de *E. globulus* en ningún país del mundo. Por esta razón, esto significa un desafío mayúsculo y quizás el de más alta complejidad del proyecto.

Una vez superada la problemática asociada a la transformación de *E. globulus*, será posible generar árboles genéticamente modificados en su nivel de tolerancia a las bajas temperaturas,

utilizando para esto, las construcciones moleculares evaluadas previamente en organismos modelo. Con esto, la etapa siguiente será propagar los árboles genéticamente modificados y luego realizar las pruebas de tolerancia a las bajas temperaturas en viveros experimentales. Aún no se ha decidido si dicha labor se realizará en dependencias de la Fundación Ciencia para la Vida, o si será encargada a otra entidad.

En cuanto se cuente con protocolos de propagación de *E. globulus* transgénicos y se hayan seleccionado los mejores candidatos, se estará en presencia del producto final del proyecto.

Logística de Salida

Los árboles genéticamente modificados serán ofrecidos a empresas forestales ya establecidas en el país o en el extranjero, quienes se encargarán del establecimiento de plantaciones forestales transgénicas en sus propios terrenos.

Por las características del producto ofrecido, los terrenos a utilizar por las empresas forestales se ubicarán en zonas australes o en altura, donde actualmente ha sido imposible introducir *E. globulus* debido al nefasto efecto de las bajas temperaturas sobre su desarrollo. Por lo tanto, los estudios de impacto ambiental asociados a las plantaciones de transgénicos serán de responsabilidad de los compradores.

Finalmente, serán las empresas forestales quienes utilizarán los árboles genéticamente modificados en los procesos de obtención de celulosa.

Marketing/Ventas

Se competirá por producto, pues los *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas se diferencian de otras especies vegetales, poseen valor agregado y ventajas comparativas frente a especies silvestres. Se diseñará una imagen comercial para el producto que potencie los beneficios de su uso.

3.1.4 ANÁLISIS DE FACTORES EXTERNOS

3.1.4.1 Análisis de las fuerzas de Porter

De acuerdo con la teoría lanzada por Michael Porter en 1979, existen 5 fuerzas que influyen en la estrategia competitiva de una compañía. Cuatro fuerzas – el poder de negociación de los consumidores, el poder de negociación de los proveedores, la amenaza de los nuevos actores y la amenaza de los productos sustitutos – se combinan con otras variables para crear una quinta fuerza, el nivel de competencia en una industria. Cada una de estas fuerzas tiene algunos determinantes que se detallarán a continuación.

Entrada de nuevos competidores

En los últimos años ha habido un fuerte incremento en el número de proyectos asociados a biotecnología forestal, en particular, a *E. globulus* y la respuesta a estrés abiótico. De esta forma, todos los centros de investigación dedicados a la identificación y eventual uso de genes y promotores que otorguen tolerancia al frío a *E. globulus*, son potenciales competidores.

Entre ellos se encuentran entidades privadas como Bioforest, empresa subsidiaria de Forestal Arauco cuyo programa de investigación se centra en mejoramiento clonal de pinos y eucaliptus, y Royal Dutch/Shell en Chile y Uruguay, que estudian la producción de un eucaliptus genéticamente modificado con un tipo diferente de lignina que facilite su remoción para la industria de la pulpa y el papel. Existen además proyectos asociados a entes gubernamentales, como INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias), INFOR (Instituto Forestal de Chile) y el Centro de Biotecnología Forestal de la Universidad de Concepción (CB-UdeC), que apunta al trabajo conjunto con las empresas del sector forestal.

Si bien se ha avanzado favorablemente en la identificación de genes putativos que le otorgarían tolerancia al frío a *E. globulus*, el paso limitante en la obtención de una variedad genéticamente modificada radica principalmente en los mecanismos de transformación para la especie. De esta forma, los centros de investigación se han abocado también a establecer una técnica eficiente, que permita generar árboles modificados. Por estas razones, se concluye que la amenaza en la entrada de nuevos competidores es alta.

Amenaza de productos sustitutos

El sustituto natural de *E. globulus*, desde el punto de vista de la tolerancia a las bajas temperaturas, es *E. nitens*. Esto se debe a que el ambiente que habita naturalmente *E. globulus* se caracteriza por tener temperaturas mínimas absolutas de -4°C y una frecuencia de heladas de 0 a 5 días en el año, en cambio el hábitat del *E. nitens* presenta temperaturas mínimas absolutas de -10°C y una frecuencia de heladas de 50 a 150 días en el año. De esta manera, las zonas donde actualmente *E. globulus* no posee un desarrollo satisfactorio, podrían ser forestadas con *E. nitens*. Se trata de una especie que posee mayor tolerancia a las bajas temperaturas en forma natural, descartando de esta forma, la polémica asociada a la introducción de especies genéticamente modificadas.

Sin embargo, *E. nitens* posee desventajas que le impedirían ser sustituto de *E. globulus*. Estas desventajas tienen directa relación con la densidad de la madera, ya que mientras *E. globulus* alcanza alrededor de 510 kg/m^3 , *E. nitens* sólo alcanza 450 kg/m^3 ⁶⁷. Su rendimiento es 12 % menor al de *E. globulus* y el precio base es 31 % inferior, debido a que se trata de un producto relativamente nuevo y a su menor densidad, por lo que presenta mayores dificultades para los actuales sistemas de pulpaje. Estos factores resultarán fundamentales al evaluar la sustitución de *E. globulus* por *E. nitens*.

Por otra parte y como se ha mencionado anteriormente, existen empresas internacionales como ArborGen, que están a la vanguardia en la investigación en eucaliptos. Estas empresas han abordado exitosamente la problemática asociada a la tolerancia a las bajas temperaturas en estas especies. Por esta razón, se espera que en los próximos años cuenten con eucaliptos modificados como productos comerciales. Las empresas forestales podrán, de esta forma, optar por adquirir estos árboles a las empresas que han sido pioneras en su desarrollo.

Considerando el aumento en las plantaciones de *E. nitens* y el desarrollo de árboles modificados por empresas internacionales, se concluye la amenaza de productos sustitutos en media-alta.

Poder de negociación de los proveedores

En cuanto a la generación de una variedad de *E. globulus* tolerante a las bajas temperaturas, los insumos involucrados son principalmente plantas silvestres de *E. globulus* y tecnologías para mejoramiento genético. Es decir, todo lo relacionado con el aislamiento de genes y promotores, así como lo necesario para transformación genética. Desde este punto de vista, el poder de negociación de los proveedores es bajo, ya que se trata en gran parte de insumos distribuidos y comercializados por empresas especializadas y de prestigio mundial.

Poder de negociación de los compradores

Los compradores son representados por las grandes empresas forestales, quienes llevarían a cabo en terreno las plantaciones *E. globulus* modificados. Dado que en nuestro país los grupos empresariales Arauco y CMPC concentran alrededor del 75 % de las exportaciones forestales chilenas, el poder de negociación que poseen es alto.

Rivalidad de los competidores existentes en el sector

Como se ha mencionado anteriormente, son múltiples las agrupaciones nacionales y extranjeras que abordan la problemática asociada a la tolerancia al frío en *E. globulus*. Cada una de ellas posee una estrategia propia para afrontar el tema, incluyendo la selección y prueba de diversos genes con potencialidad para ser utilizados. En este sentido, existe una alta rivalidad entre estos grupos.

Sin embargo, debido a que no existen en el mercado especies de *E. globulus* modificadas disponibles, por el momento no existe competencia por producto como tal.

En la Figura 12 se presenta un esquema en el que se han resumido las 5 fuerzas de Porter que estarían afectando la introducción de *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena.

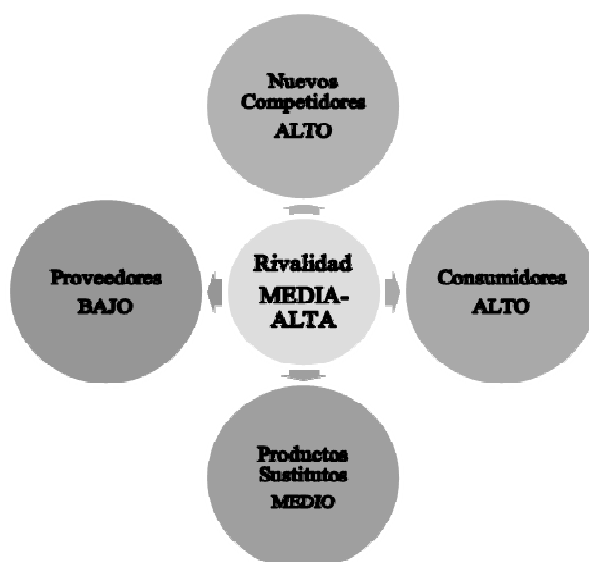


Figura 12: Esquema de las fuerzas de Porter para la Introducción de *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena

Como conclusión del análisis de Porter, es posible señalar que el escenario actual para la introducción de *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena es

auspicioso. Si bien la amenaza de entrada de nuevos competidores es alta, ninguno de los actores a nivel nacional posee una ventaja significativa con respecto a los otros. De esta forma el poder de negociación de los consumidores se mantiene a la expectativa y dependerá directamente de cuantos productos de interés se encuentren a disposición del mercado a mediano plazo.

Si las iniciativas nacionales tardan demasiado, entonces la amenaza de productos sustitutos se incrementará también, de la mano de las grandes empresas internacionales que llevan una significativa ventaja en la creación de variedades de eucaliptos tolerantes a las bajas temperaturas.

Por último, es importante señalar que la rivalidad entre los competidores del sector se mantiene también a la expectativa. De principal relevancia será el avance en técnicas de transformación genética, y junto con esto, el desarrollo de normativas gubernamentales que permitan las pruebas en terreno de las variedades modificadas obtenidas.

3.1.4.2 Análisis FODA

El análisis FODA es una herramienta que permite conformar un cuadro de la situación actual de la empresa u organización, permitiendo de esta manera obtener un diagnóstico preciso que permita en función de ello tomar decisiones acordes con los objetivos y políticas formulados. El término FODA es una sigla conformada por las primeras letras de las palabras Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas. De entre estas cuatro variables, tanto fortalezas como debilidades son internas de la organización, por lo que es posible actuar directamente sobre ellas. En cambio las oportunidades y las amenazas son externas, por lo que en general resulta muy difícil poder modificarlas.

A continuación se presenta el análisis FODA realizado para la introducción de *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena.

Factores Externos

Oportunidades

Aumento de la tasa de forestación

Los avances permitirían reducir significativamente el costo de formación de madera, lo que incrementa el atractivo económico de la plantación forestal, aumentando la posición competitiva de Chile e incentivando la expansión de la superficie forestada. Esto se debe a que al introducir *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas, será posible forestar zonas que actualmente no están siendo utilizadas con este fin, sin perjudicar el desarrollo agrícola. Este punto es de gran relevancia en un escenario económico en el que los costos de la mano de obra y de la tierra para cultivo aumentan.

Con esto, se producen positivos impactos ambientales en la recuperación de suelos erosionados, captura acelerada de carbono reduciendo el calentamiento global y regulación del ciclo hidrológico, entre otros.

Políticas gubernamentales favorables

El uso de la biotecnología en el sector forestal chileno ha sido ampliamente fomentado por el gobierno. De esta forma, existen una serie de fondos públicos disponibles para financiar proyectos de investigación e innovación tecnológica. Esto deja de manifiesto el interés a nivel país de desarrollar herramientas biotecnológicas que permitan mantener y aumentar las oportunidades de negocios en el ámbito forestal.

Un ejemplo del interés gubernamental por fomentar el uso de herramientas biotecnológicas en la industria forestal chilena, es el Programa de Prospectiva Tecnológica de Chile Innova. Dependiente del Ministerio de Economía, este programa tiene como objetivo contribuir al aumento de la competitividad de la economía nacional, mediante la generación de información sobre las actividades económicas que constituirán los ejes de esa competitividad en la próxima década. Con ese propósito se realizó en el año 2001 un estudio prospectivo para la biotecnología aplicada a la industria forestal⁶⁸, a través del cual se identificaron las acciones y políticas públicas que son necesarias de realizar para lograr la materialización del futuro deseado en el ámbito de la biotecnología forestal. De esta forma se determinaron objetivos que se requieren cumplir a mediano plazo para situar a Chile como país líder en biotecnología forestal.

A través de iniciativas como ésta, se entiende que las políticas gubernamentales futuras serán favorables para el desarrollo de la biotecnología forestal en nuestro país. Esto a través del fomento de la formación de investigadores altamente calificados y de necesidad de generar una legislación adecuada al avance científico y tecnológico.

Amenazas

Carencia de legislación relativa al uso de organismos genéticamente modificados

Dado que existe una carencia legal en la materia referente a la producción y comercialización de especies forestales transgénicas, tanto dentro como fuera del país, no existe garantía que indique que las inversiones realizadas en biotecnología forestal sean sostenibles en el tiempo. Esto desde múltiples puntos de vista, tanto financiero como ambiental y genético. Dado que no hay consenso con respecto a la inocuidad de los transgénicos para el medio ambiente y para la salud humana, existe la posibilidad que los mercados internacionales a los cuales exporta Chile, tomen una postura

desfavorable en torno a la comercialización de productos forestales que provengan de plantaciones transgénicas.

Certificación Forestal

La Certificación Forestal es fundamental en un producto de categoría mundial. Hoy en día es un factor diferenciador en las preferencias de los consumidores, principalmente del mercado Japonés, Europeo y Norteamericano. El concepto tiene por objetivo que a través de un Logo o Sello adherido al producto, los consumidores finales comprueben que los bosques de donde provienen las materias primas de ese producto, se manejaron bajo un concepto ambientalmente responsable y socialmente benéfico. En nuestro país existen principalmente dos certificaciones. La primera se basa en un Sistema de Gestión Ambiental (SGA) bajo la normativa ISO 14.001. La segunda se ha desarrollado como respuesta a un consenso internacional sobre el cuidado de los bosques, siendo el Manejo Forestal Sustentable (MFS) la base fundamental.

Entre estas certificaciones, la MFS excluye del proceso de certificación a las plantaciones provenientes de organismos genéticamente modificados (OGM), que sería el caso de las variedades de *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas. Por otra parte, la norma ISO 14.001 no se manifiesta con respecto a los OGM.

A pesar de los dictámenes de la Organización Mundial del Comercio (OMC) en pro de la liberación del comercio internacional, estos procesos de orden global se están transformando en verdaderas barreras arancelarias para el comercio forestal mundial. Por lo tanto, no es de extrañar que si los productos forestales chilenos no cumplen con las metas mínimas de aceptación internacional, el país se verá enfrentado a la amenaza de ser marginado o bien su participación en estos mercados de exportación se verá reducida significativamente.⁶⁹

Factores Sociales

A nivel social, existe una imagen reticente a todo lo relacionado con productos transgénicos. Esto se debe en parte a falta de información a nivel país de las tecnologías relativas a ingeniería genética y a sus posibles beneficios y riesgos. Si bien los posibles impactos negativos a nivel ecológico por el uso de árboles transgénicos no han sido probados, existe temor de los posibles riesgos que conllevaría su plantación.

Así, en el mundo, distintos grupos ambientalistas como el Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF) y Greenpeace, han llamado la atención respecto al posible impacto de las plantaciones transgénicas sobre los ecosistemas naturales. Entre los posibles riesgos a los que los grupos

ambientalistas hacen alusión se tienen el incremento del uso de tóxicos en la agricultura, la contaminación genética, la contaminación del suelo, la pérdida de biodiversidad, el desarrollo de resistencias en insectos y malezas o los efectos no deseados en otros organismos. También señala que los efectos sobre los ecosistemas serían irreversibles e imprevisibles.⁷⁰

En este contexto es importante señalar que no existe evidencia científica, a nivel mundial, que indique que los organismos genéticamente modificados tengan algún efecto sobre los consumidores o el medio ambiente⁷¹.

En el caso de las variedades de *E. globulus* modificados, se minimiza la posible amenaza sobre la salud humana, debido a que se trata de un producto de uso industrial.

Factores Internos

Fortalezas

Fuerza de trabajo

El país cuenta con una amplia gama de profesionales plenamente calificados para el desarrollo y la aplicación de la biotecnología forestal, ya sea a nivel del trabajo molecular para la obtención de árboles genéticamente modificados, como también para la propagación de éstos y su posterior plantación en los bosques.

Consistencia de la Industria forestal chilena

La industria forestal chilena ha mostrado ser sustentable y rentable a través de los años, posicionándose exitosamente en el mercado internacional e incorporando a sus faenas tecnologías de punta. Por esta razón, se espera que la industria forestal local sea capaz de asimilar rápida y efectivamente los vertiginosos cambios que ha introducido la biotecnología forestal en el mundo. Se trata de un sector en pleno desarrollo, que posee la disponibilidad de infraestructura y tecnología para propagación masiva, manejo en vivero y comercialización eventual de material proveniente de plantaciones transgénicas.

Disponibilidad de suelos

Actualmente existen extensas superficies que no son plenamente aprovechadas, entre las que se encuentran amplias regiones cordilleranas y vastas superficies australes. Su desaprovechamiento

radica principalmente en que resultan inhóspitas para la mayoría de las plantaciones forestales y agrícolas. La posibilidad de que estos terrenos puedan ser forestados con especies modificadas que toleren de mejor forma condiciones ambientales, repercutirá en nuevos polos de desarrollo para esas regiones. Esto provocaría además externalidades positivas para los asentamientos humanos cercanos, tales como mayor número de puestos de trabajo.

Modificación genética versus transgénesis

El proyecto propuesto, a través del cual se pretende obtener una variedad de *E. globulus* tolerante a las bajas temperaturas, implica la utilización de genes endógenos de la especie. Si bien se trata de una forma de modificación genética, se evita mayormente el temor de la población el cual consiste en la inserción de genes foráneos a organismos. Sin embargo, este hecho se ve contrarrestado ya que la modificación genética incluye, a su vez, la utilización marcadores de selección foráneos a *E. globulus*.

Debilidades

Transformación de *E. globulus*

A pesar del creciente desarrollo de la biotecnología forestal en Chile, actualmente no está disponible la tecnología necesaria para transformar *E. globulus*. De esta forma, Chile se encuentra en desventaja con respecto a otros países que ya han logrado desarrollar exitosamente especies de interés forestal modificadas. A través de esta herramienta pueden aumentar la rentabilidad de sus propios cultivos, desincentivando la exportación de productos forestales chilenos.

Requerimientos de capital y recursos

Generar una variedad de *E. globulus* genéticamente modificado implica, en primer lugar, un gran desafío tecnológico y consecuentemente, altos gastos en investigación y desarrollo. De esta manera, las empresas forestales interesadas en desarrollar esta tecnología, deben evaluar si le otorgaría ganancias suficientes para realizar el proyecto. En este sentido, implementar y llevar a buen término proyectos en biotecnología forestal, significa también aceptar un inapelable riesgo. Este riesgo se ve representado principalmente por dos factores. El primero, la carencia de una legislación atinente, que otorgue la certeza de que las plantaciones de transgénicos serán efectivamente llevadas a cabo en el país. El segundo, guarda relación con el retorno de la inversión, que debido a las características de las plantaciones forestales, son a largo plazo. Si a esto se le suma el riesgo asociado al rendimiento que tendrían dichas plantaciones, se observa que es un negocio altamente riesgoso. Sin embargo, el

gobierno ha asumido un rol estratégico, destinando fondos para incentivar el desarrollo de la biotecnología forestal en Chile.

3.1.5 Conclusiones del análisis estratégico

Como se mencionó en la sección 1.3, el principal objetivo de realizar este análisis estratégico fue justificar con fundamentos económicos y sociales el desarrollo del proyecto de tesis.

A través del análisis estratégico es posible situar el proyecto de tesis en el contexto global de la biotecnología forestal. De esta forma es posible magnificar el aporte del proyecto de tesis en un propósito mucho más amplio, que de llegar a resultados exitosos significaría un avance significativo en la competitividad de la industria forestal chilena.

Asimismo, es importante recalcar que los resultados experimentales de este trabajo de tesis son sólo un acercamiento muy preliminar al proyecto global, pero que dejan de manifiesto la complejidad y la multiplicidad de desafíos y problemas pendientes que será necesario abordar en el futuro para que la industria forestal chilena cuente de una variedad de *E. globulus* modificado, capaz de tolerar las bajas temperaturas.

Con estos antecedentes se presentan a continuación los resultados atinentes al análisis funcional y estructural del promotor del gen CBF-1 de *E. globulus* en la respuesta a estrés por frío.

3.2 AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL PROMOTOR EgCBF-1

En primer lugar se detallan los resultados de los experimentos para aislar y secuenciar el promotor EgCBF-1. Luego, se describe el análisis bioinformático que permitió concluir que efectivamente se había aislado y secuenciado el promotor del gen EgCBF-1. Posteriormente, se detalla el análisis realizado sobre la secuencia obtenida del promotor en estudio, a partir de los cuales se

obtienen los elementos de respuesta presentes en la secuencia. Finalmente, se abordan los análisis referentes a la homología entre el promotor en estudio y promotores de genes ortólogos.

3.2.1 GenomeWalker

Para aislar el promotor del gen EgCBF-1 se optó por utilizar el kit comercial GenomeWalker. Mediante esta técnica es posible obtener secuencias río arriba de una secuencia conocida. Para esto se requieren digestiones de DNAg y la utilización de adaptadores. A su vez, se requieren dos reacciones de PCR para amplificar fragmentos de DNA que deben ser analizados para evaluar si corresponden al región deseada.

En la Figura 13 se presenta un gel de agarosa al 1 %, en el que se han cargado 2 μ l de DNAg de *E. globulus*, extraído según el protocolo descrito en la sección 2.7.2. Se muestra además su digestión con las enzimas *StuI*, *EcoRV*, *PvuII* y *DraI*.

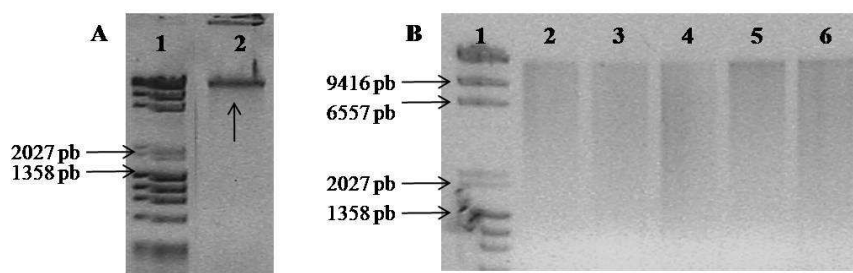


Figura 13: DNAg de *E. globulus* y digestión con enzimas de restricción

A: Gel de agarosa al 1 % en el que se muestra la extracción de DNAg de *E. globulus*. Carril 1, estándar de tamaño molecular λ/ϕ , carril 2 DNAg de *E. globulus*.

B: Gel de agarosa al 0,5 % en el que se muestran las digestiones de DNAg de *E. globulus*. Carril 1 estándar de tamaño molecular λ/ϕ , carril 2 1 μ l digestión DNAg con enzima *StuI*, carril 3 1 μ l digestión DNAg con enzima *PvuII*, carril 4 1 μ l digestión DNAg con enzima *EcoRV*, carril 5 1 μ l digestión DNAg con enzima *DraI*, carril 6 digestión con enzima *Pvu II* de control positivo provisto por el kit.

Con las cuatro alícuotas de DNAg digeridas con las enzimas antes descritas, se procedió a ligar el adaptador provisto por el kit. Esto se realizó según lo descrito en la sección 2.7.1. Posteriormente se realizó el *nested* PCR.

Las reacciones de PCR del GenomeWalker se llevaron a cabo utilizando los partidores GW1 y GW2 (Tabla 7). Las condiciones utilizadas se detallaron en la sección 2.7.1. En la Figura 14 se presentan los resultados.

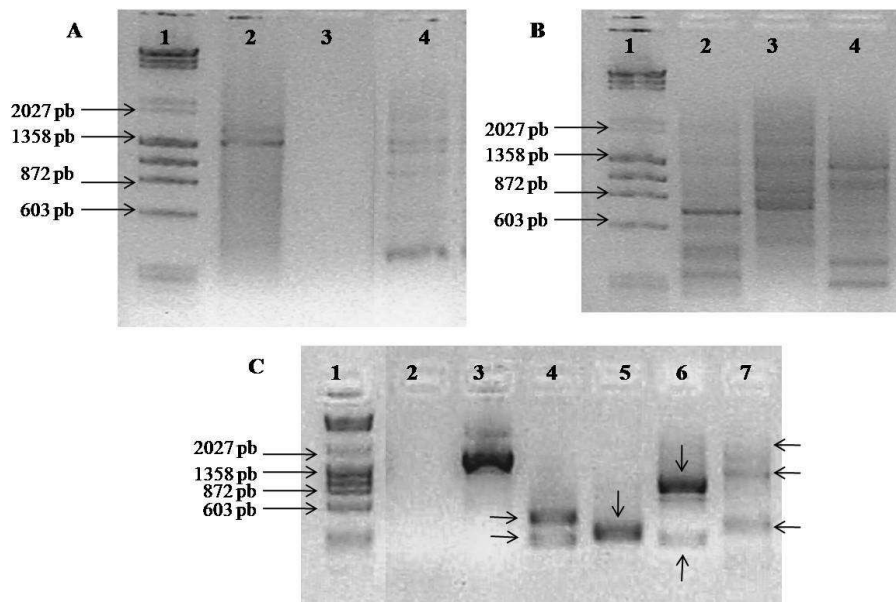


Figura 14: Productos amplificados mediante reacciones de PCR para el Genome Walker

A: Gel de agarosa al 1 % en el que se muestran los controles de la primera reacción de PCR GenomeWalker. En el carril 1, estándar de tamaño molecular λ/ϕ . Carril 2, control positivo de la reacción de PCR con templado provisto por el kit. Carril 3, control negativo de la reacción de PCR. Carril 4, reacción de PCR con templado DNAg de *E. globulus* digerido con enzima *StuI*.

B: Gel de agarosa al 1 % en el que se muestra la primera reacción de PCR GenomeWalker. En el carril 1, estándar de tamaño molecular λ/ϕ . Carril 2, reacción de PCR con templado DNAg de *E. globulus* digerido con enzima *PvuII*. Carril 3, reacción de PCR con templado DNAg de *E. globulus* digerido con enzima *EcoRV*. Carril 4, reacción de PCR con templado DNAg de *E. globulus* digerido con enzima *DraI*.

C: Gel de agarosa al 1 % en el que se muestra el *nested* PCR GenomeWalker. En el carril 1, estándar de tamaño molecular λ/ϕ . Carril 2, control negativo de la reacción de PCR. Carril 3, control positivo de la reacción de PCR. Carril 4, reacción de PCR utilizando como templado amplificado A4 1:50. Carril 5, reacción de PCR utilizando como templado amplificado B2 1:50. Carril 6, reacción de PCR utilizando como templado amplificado B3 1:50. Carril 7, reacción de PCR utilizando como templado amplificado B4 1:50.

Cada una de las bandas señaladas en la Figura 14 C se purificó desde un gel de agarosa de bajo punto de fusión utilizando el protocolo descrito en la sección 2.7.3. Todas las bandas se ligaron al vector pGEMT-Easy (sección 2.7.4) y luego se transformaron células competentes de *E. coli* cepa NovaBlue con los fragmentos clonados (Anexo A.3). Se realizó una extracción de DNAp (sección 2.7.5) y se verificó mediante digestión con la enzima *EcoRI* la presencia de los fragmentos clonados. Posteriormente se secuenciaron todas las bandas con partidores universales M13. Finalmente se revisaron las secuencias como se describió en la sección 2.7.6.

3.2.2 Aislamiento y secuenciación del promotor del gen EgCBF-1

En la Figura 15 se muestra la digestión del vector pGEM-T Easy secuenciado, en el que se clonó una banda proveniente del GenomeWalker, que corresponde al promotor del gen EgCBF-1.

La banda liberada que se muestra en la Figura 15 posee 959 pb, de las cuales 165 pb se superponen con el extremo 5' del gen EgCBF-1. Esto indica que se lograron obtener 776 pb del promotor del gen EgCBF-1.

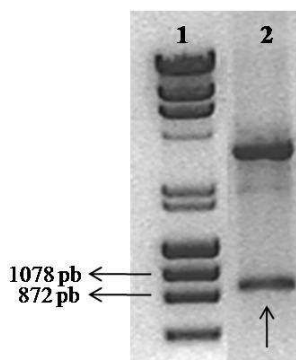


Figura 15: Digestión del vector pGEM-T Easy que contiene el promotor EgCBF-1

Gel de agarosa al 1 % en el que se muestra la digestión del vector pGEMT-Easy en el que se ha clonado el promotor EgCBF-1. Carril 1, estándar de peso molecular λ/ϕ . Carril 2, digestión del vector pGEM-T Easy con la enzima *EcoRI*.

3.2.3 Análisis bioinformático del promotor del gen EgCBF-1

Utilizando todas las herramientas computacionales detalladas en la sección 2.7.6, se realizó el análisis bioinformático a la secuencia obtenida para el promotor del gen EgCBF-1. Así se determinó que el promotor en estudio posee cinco sitios de unión al factor de transcripción EgICE-1, cuatro elementos de respuesta a ácido abscísico (ABA), dos elementos de respuesta a luz y dos elementos de respuesta tipo MYB, entre otros. En la Figura 16 se muestran esquemáticamente los resultados del análisis bioinformático.

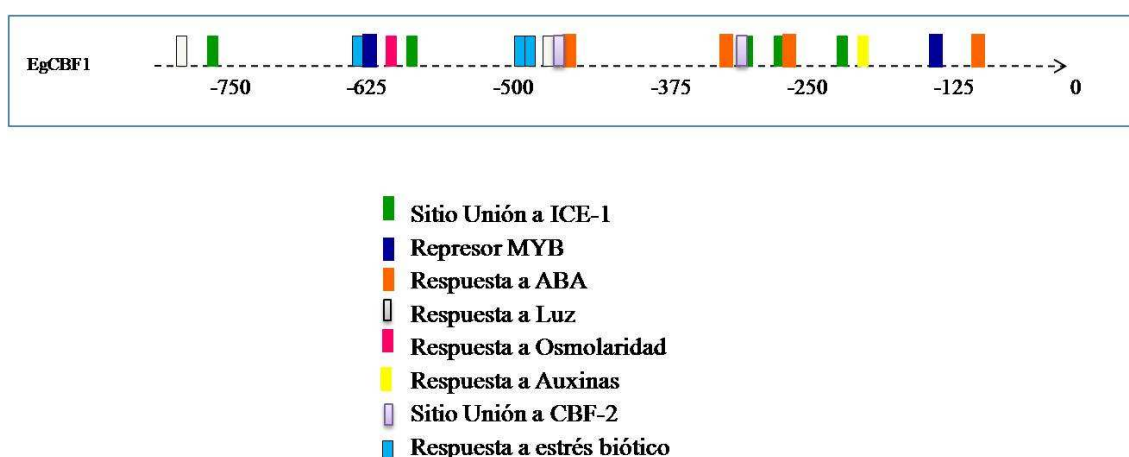


Figura 16: Elementos de respuesta a estrés identificados en el promotor EgCBF-1 (PLACE)

3.2.4 Análisis bioinformático de promotores de genes ortólogos al promotor del gen EgCBF-1

La secuencia de promotores de genes ortólogos al promotor del gen EgCBF-1 se obtuvieron desde la base de datos GenBank. Actualmente se cuenta con el promotor del gen CBF3 de *Arabidopsis thaliana* (Genbank número de acceso AF076155), DREB1d de *Oryza Sativa* (GenBank número de acceso AB023482 y CBF1a de *Eucalyptus gunni*⁷². En ellos se han encontrado al menos cuatro sitios de unión al factor de transcripción ICE, además de otros elementos de respuesta a estrés como respuesta a hormonas (ABA y auxinas), respuesta a luz y sitios de respuesta a frío.

En la Figura 17 se muestra esquemáticamente el resultado del análisis bioinformático realizado para el promotor en estudio y sus ortólogos.

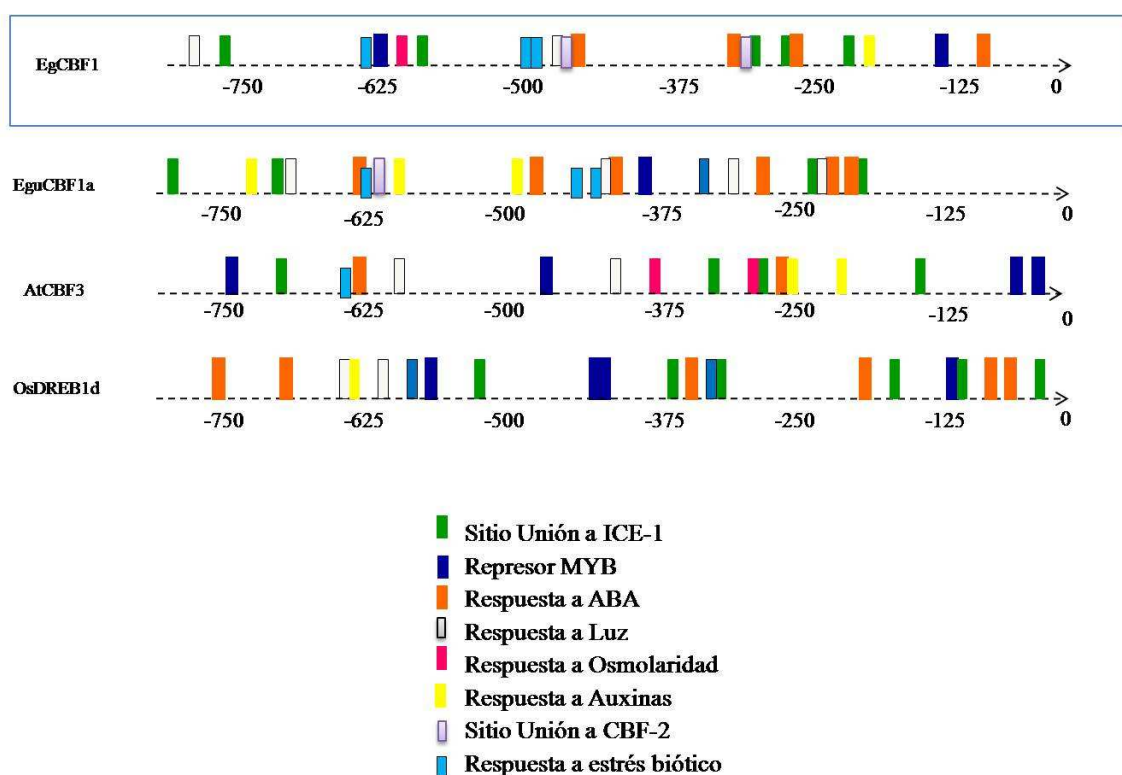


Figura 17: Elementos de respuesta a estrés identificados en promotores de genes ortólogos al promotor EgCBF-1 (PLACE)

De los sitios de unión para el factor de transcripción ICE-1, al menos la mitad se encuentra entre -300 y 0 pb. En todos los promotores se observó además, un alto número de elementos de respuesta a ABA y de reconocimiento para proteínas MYB. Sólo en los promotores EgCBF-1 y AtCBF-3 se observaron elementos de respuesta a osmolaridad, mientras que los elementos de respuesta a luz se encuentran en cantidades similares en todos los promotores estudiados. Se observó una distribución y número de elementos de respuesta a auxinas disímil para cada caso. Sólo los promotores de eucaliptos, EgCBF-1 y EguCBF1a, presentan sitios de reconocimiento para el factor de transcripción CBF-2.

3.3 CONSTRUCCIONES MOLECULARES PARA ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR EgCBF-1

A continuación se presentan los resultados parciales obtenidos durante el desarrollo de las construcciones utilizadas en los ensayos de funcionalidad del promotor EgCBF-1.

3.3.1 Controles

Se utilizó el vector comercial pCAMBIA1305.1 como control positivo, tanto para la transformación estable como para transformación transitoria. Este vector posee el gen reportero GUS bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. La utilización de este vector en los ensayos experimentales permitió evaluar que los procedimientos de transformación y reacción histoquímica se realizaron adecuadamente, ya que el promotor CaMV 35S desencadenó la expresión del gen reportero independientemente de las condiciones de estrés que se evaluaron.

Por otra parte, se utilizó el vector comercial pGWB3 vacío como control negativo para todos los ensayos de funcionalidad. Este vector posee el gen reportero GUS sin el control de ningún promotor y por lo tanto no desencadenó la expresión del gen reportero bajo ninguna condición evaluada.

3.3.2 Amplificación mediante reacción de PCR del promotor EgCBF-1 y clonamiento en el vector de entrada TOPO

El promotor del gen EgCBF-1 aislado se amplificó mediante reacción de PCR, utilizando los partidores proEgCBF1-F y proEgCBF1-R (Tabla 7) y según el procedimiento detallado en la sección 2.9.1. El templado utilizado fue el vector pGEMT-Easy que contiene el promotor EgCBF-1 secuenciado (Figura 15). En la Figura 18 se presenta el fragmento amplificado correspondiente al tamaño esperado para el promotor de interés.

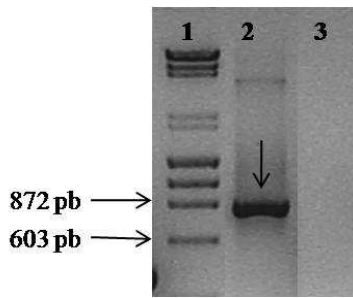


Figura 18: Amplificación mediante reacción de PCR del promotor EgCBF-1

Amplificación del Promotor EgCBF-1 mediante reacción de PCR. Carril 1, estándar de tamaño molecular λ/ϕ . Carril 2, el amplificado esperado. Carril 3, control negativo.

Se amplificó un fragmento de alrededor de 850 pb para el promotor EgCBF-1. Este tamaño corresponde a lo esperado, ya que los partidores fueron diseñados en regiones externas al promotor EgCBF-1 (Tabla 8, sección 2.9.1).

Posteriormente, este fragmento amplificado se clonó en el vector de entrada TOPO según las especificaciones de la sección 2.9.2 y utilizando Spec como marcador de selección. Para verificar la construcción, se realizó una extracción de DNAp (sección 2.7.5) proveniente de las colonias seleccionadas. Este DNAp se digirió con las enzimas *EcoRV* y *SacI*, para determinar la orientación en que se clonó el fragmento de interés en el vector TOPO. En la Figura 19 se muestran los análisis de restricción y posterior digestión del vector TOPO en el que se ha clonó el promotor EgCBF-1.

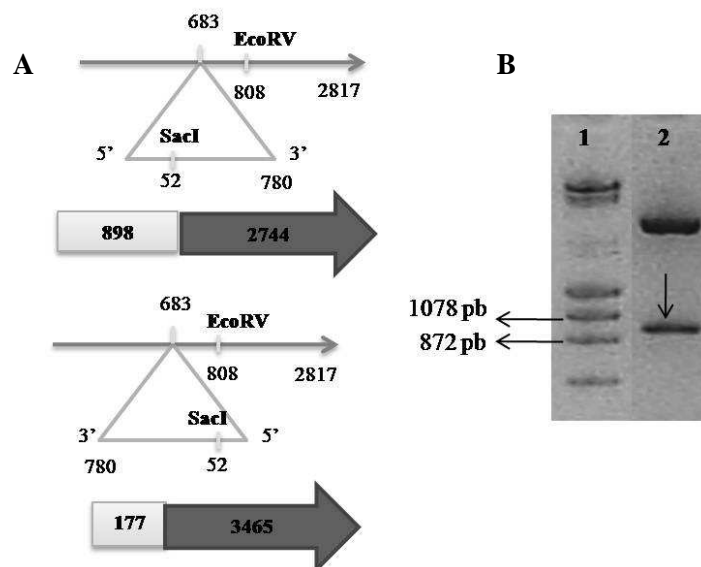


Figura 19: Análisis de restricción y digestión de DNAp del vector TOPO, en el que se ha clonado el promotor de EgCBF-1

A: Análisis de restricción en el que se evalúan las posibilidades de clonación para el promotor EgCBF-1 en el vector TOPO. En la parte superior, fragmentos esperados de 898 y 2744 pb para la inserción en sentido 5'-3'. En la parte inferior, fragmentos esperados de 177 y 3465 pb para la inserción en sentido 3'-5'. En ambos casos las

digestiones se realizaron con las enzimas EcoRV, que corta dentro del vector TOPO, y SacI, que corta dentro del fragmento clonado.

B: Digestión de DNAp proveniente de una colonia positiva para el promotor EgCBF-1 clonado en el vector TOPO en la orientación correcta. Carril 1, estándar de tamaño molecular λ/ϕ . Carril 2, fragmento liberado de alrededor de 900 pb.

Una vez corroborado por secuenciación que el fragmento clonado corresponde efectivamente al promotor deseado, se utilizó el vector TOPO recombinante como vector de entrada en la reacción de recombinación con el vector de destino pGWB3.

3.3.3 Clonación del promotor EgCBF-1 en el vector de destino pGWB3 mediante recombinación

La reacción de recombinación, mediante la cual el vector TOPO se recombinó al vector pGWB3, se realizó según lo descrito en la sección 2.9.4. Con el fragmento de interés recombinado en el vector binario, se procedió a transformar células competentes Mach 1 (sección 2.9.3). Las colonias recombinantes positivas se seleccionaron mediante resistencia a Kan. El DNAp obtenido de las colonias positivas se utilizó como templado para una reacción de PCR con partidores específicos (sección 2.9.1). En la Figura 20 se presentan los resultados obtenidos.

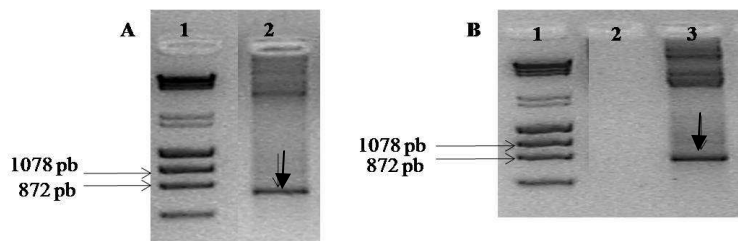


Figura 20: Verificación de la presencia del promotor EgCBF-1 en el vector pGWB3

A: reacción de PCR para el promotor EgCBF-1. Carril 1, estándar de tamaño molecular λ/ϕ . Carril 2, amplificado del tamaño esperado que corresponde al promotor EgCBF-1 amplificado a partir de una colonia positiva.

B: controles de la reacción de PCR. Carril 1, estándar de tamaño molecular λ/ϕ . Carril 2, control negativo. Carril B3, control positivo amplificado desde pGEMT Easy (Figura 15).

Se secuenció el DNAp proveniente de la colonia positiva, corroborándose que el promotor en estudio fue clonado exitosamente en el vector binario pGWB3. Luego se utilizó este DNAp para transformar células competentes de *A. tumefaciens*.

3.3.4 Transformación de *A. tumefaciens*

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* se realizó según el protocolo descrito en la sección 2.9.5. La selección de las colonias que incorporaron el vector binario recombinante se efectuó mediante selección por antibióticos apropiados (sección 2.3.7). Las colonias positivas se crecieron en medio líquido y se realizó la extracción de DNAp (sección 2.7.5). Este DNAp se utilizó como templado para una nueva reacción de PCR con partidores específicos (sección 2.9.1).

En la Figura 21 se detallan los resultados de estas reacciones de PCR. Es importante señalar que además de la construcción pGWB3::promotor EgCBF-1, se transformaron también células competentes de *A. tumefaciens* con el vector pGWB3 vacío y el vector pCAMBIA1305.1 vacío, que se utilizaron como controles.

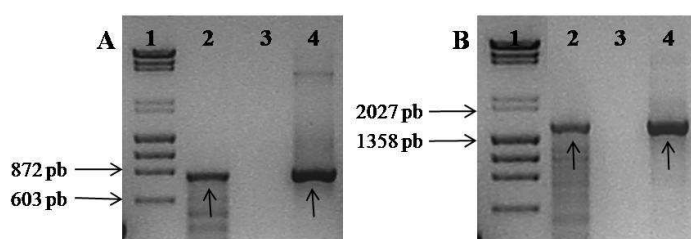


Figura 21: Amplificación mediante reacción de PCR del promotor EgCBF-1 desde DNAp de *A. tumefaciens*

A: reacción de PCR para el promotor EgCBF-1. Carril 1, estándar de tamaño molecular λ/ϕ . Carril 2, amplificado del tamaño esperado que corresponde al promotor EgCBF-1. Carril 3, control negativo. Carril 4, control positivo para la pareja de partidores proEgCBF1-F/proEgCBF1-R.

B: reacción de PCR para el promotor EgCBF-1 en fusión con el gen GUS. Carril 1, estándar de tamaño molecular λ/ϕ . Carril 2, amplificado el tamaño esperado para el promotor EgCBF-1 y un fragmento 5' del gen GUS. Carril 3, control negativo. Carril 4, control positivo para la pareja de partidores proEgCBF1-F/gus-R.

Con esta última etapa de verificación se confirma que la colonia seleccionada de *A. tumefaciens* había incorporado el vector binario pGWB3, en el que se había clonado el promotor del gen EgCBF-1.

3.4 ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR EgCBF-1 MEDIANTE TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA EN PLANTAS DE *N. benthamiana*

3.4.1 Ensayos de funcionalidad en hojas de *N. benthamiana*

Para este experimento se utilizó una única planta de *N. benthamiana* para cada repetición. Se realizaron 5 repeticiones. Dos de sus hojas se infiltraron con la construcción pGWB3::promotor EgCBF-1 y otras dos hojas con el vector pCAMBIA1305.1. Se infiltraron además 2 hojas con el vector pGWB3 vacío. El experimento se realizó de esta forma, ya que se evaluó la expresión del gen reportero en el contexto de la hoja completa.

Este experimento se realizó incubando la planta infiltrada a temperatura ambiente y oscuridad durante 48 h inmediatamente después de la infiltración. Posteriormente, todas las hojas infiltradas fueron cortadas y sometidas a 1 h a 4 °C ó 25 °C sobre una placa de vidrio.

En la Figura 22 se observan los resultados obtenidos para hojas completas tratadas con frío (4 °C) y el control a temperatura ambiente.

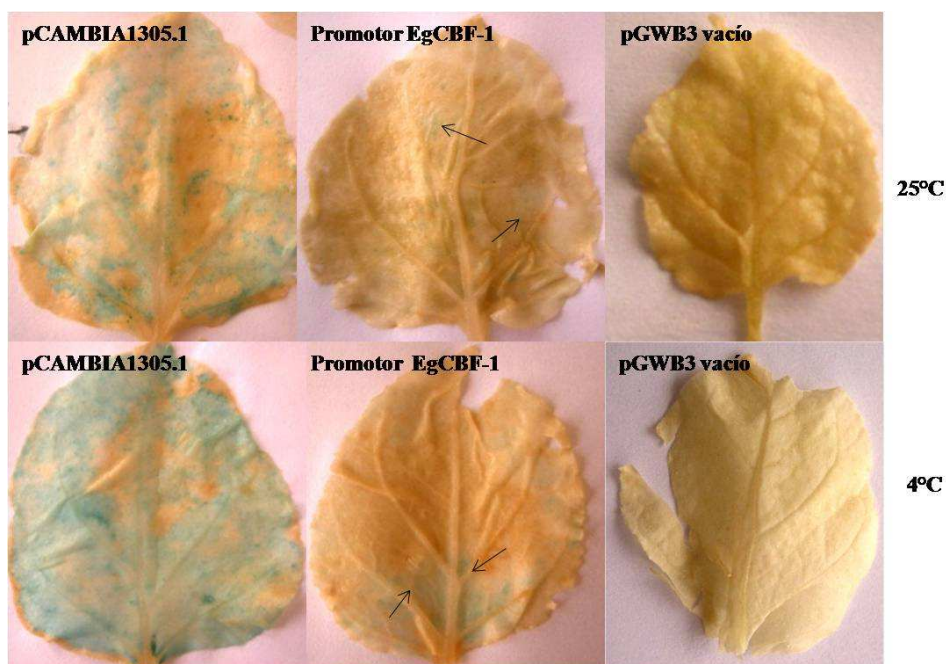


Figura 22: Ensayo de funcionalidad en hojas completas de una misma planta de *N. bentamiana* bajo tratamiento de frío y a temperatura ambiente
En la parte superior se presentan las hojas mantenidas a temperatura ambiente y en la parte inferior las hojas sometidas a frío.

Para el control positivo se observó que ambas hojas, sometida y no sometida a frío, presentaron resultados satisfactorios. Sin embargo, se observó que la hoja sometida a frío presentó mayor intensidad que la mantenida a 25 °C. Además, en ambas hojas se observó que la expresión del gen reportero no fue uniforme en el tejido vegetal, y por lo tanto el método con trozos de hojas se descartó. Esto podría explicar el comportamiento errático observado en el control positivo.

En el caso del promotor EgCBF-1, se observó que existen niveles bajos de expresión del reportero, observándose una mayor expresión en el caso de la hoja sometida a frío que para la hoja que se mantuvo a temperatura ambiente. Sin embargo, el resultado no es válido ya que en tres repeticiones del experimento, no se lograron resultados reproducibles. En general, el comportamiento de la

expresión del gen reportero para el promotor EgCBF-1 sólo es comparable entre la hoja sometida a frío y la hoja control a 25 °C.

3.4.2 Ensayos de funcionalidad en plantas de *N. benthamiana* con hojas completas y estímulos combinados

Se realizó un segundo experimento, cuya motivación fue evaluar si el promotor EgCBF-1 estaba siendo activado por otros elementos de respuesta, y no por ICE-1. Como se mostró en la sección 3.2.2, el promotor EgCBF-1 posee una serie de elementos reguladores, entre ellos, dos elementos de respuesta a luz.

En este experimento se utilizaron cuatro plantas independientes que fueron transformadas e incubadas durante 48 h después de la infiltración, para luego ser sometidas durante 1 h a estímulos combinados: luz/4°C, luz/25°C, oscuridad/4°C y oscuridad/25°C (Figura 23). Se realizaron 5 repeticiones, encontrándose en todas resultados similares.

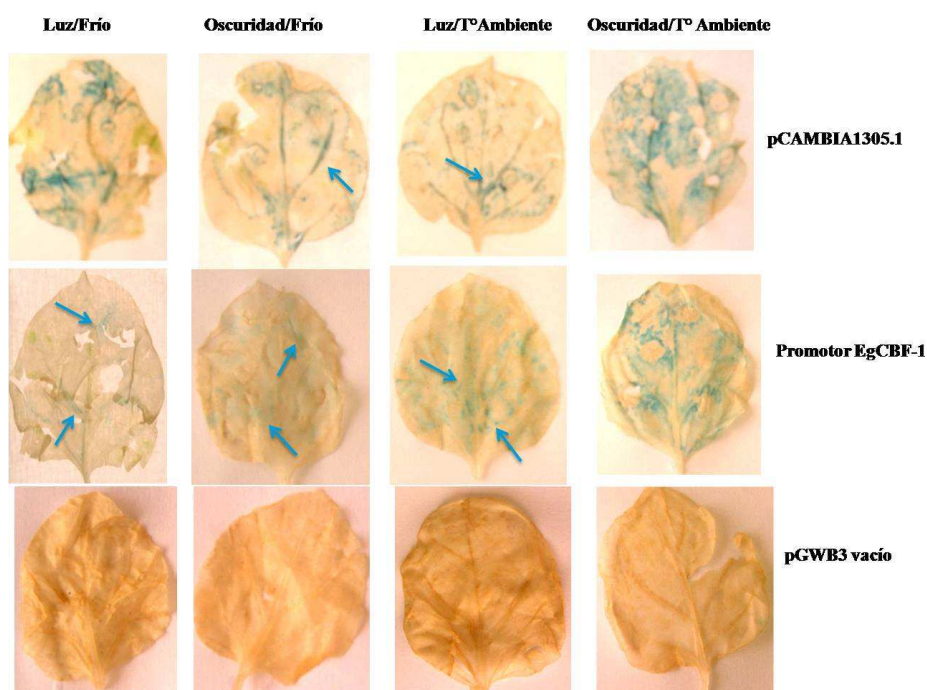


Figura 23: Ensayo de funcionalidad en hojas completas de *N. benthamiana* bajo tratamientos combinados de frío y temperatura ambiente en luz y oscuridad

En la Figura 23 se presentan las imágenes del promotor EgCBF-1, el control positivo (pCAMBIA1305.1) y el control negativo (pGWB3 vacío).

En el control positivo se observó que existe expresión del gen reportero en todas las muestras. En las plantas tratadas con luz/frío, oscuridad/frío y luz/temperatura ambiente se observaron niveles comparables de tinción. No así en la planta con tratamiento oscuridad/temperatura ambiente, que posee una expresión mayor a las otras condiciones evaluadas.

En el caso del promotor EgCBF-1, se observó expresión para todas las plantas. El nivel es bajo para ambas plantas sometidas a frío, en condiciones de luz y oscuridad, en comparación a las que permanecieron a temperatura ambiente. Entre las que permanecieron a temperatura ambiente, también se observó mayor tinción en la planta que fue sometida a oscuridad/temperatura ambiente.

3.5 ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE *A. thaliana*

Como se detalló en la sección 2.11.1, la transformación estable de *A. thaliana* se realizó mediante la técnica de inmersión floral y las semillas se seleccionaron utilizando Kan como marcador. En la Figura 24 se presenta el DNAg y los fragmentos amplificados mediante reacción de PCR con los que se corroboraron líneas transgénicas del promotor EgCBF-1, el vector pGWB3 vacío y el control positivo pCAMBIA1305.1 vacío, respectivamente.

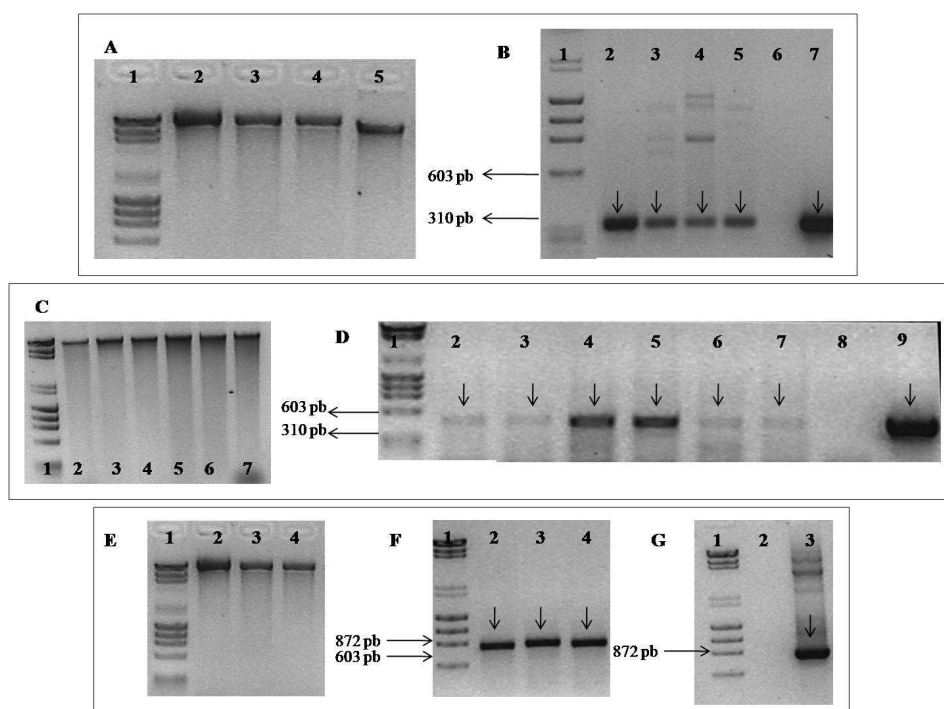


Figura 24: DNAg y amplificación mediante PCR de las construcciones de interés usando como templado DNAg de plantas resistentes a Kan

Carriles A1, B1, C1, D1, E1, F1 y G1 corresponden al estándar de tamaño molecular λ/ϕ

A: gel agarosa al 1 % en el que se ha cargado DNAg extraído de cuatro plantas transgénicas pGWB3 vacío resistentes a Kan. Carriles 2, 3, 4 y 5 DNAg de las plantas 1, 2, 3 y 4.

B: amplificación mediante PCR de un fragmento del gen GUS utilizando partidores gus-F/gus-R. El templado utilizado corresponde a DNAg de cada planta. Carriles 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden al amplificado de las plantas 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Carril 6 control negativo y carril 7 control positivo.

C: gel agarosa al 1 % en el que se ha cargado DNAg extraído de seis plantas transgénicas pCAMBIA1305.1 resistentes a Kan. Carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 DNAg de las plantas 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

D: amplificación mediante PCR de un fragmento del gen GUS utilizando partidores gusp-F/gusp-R. El templado utilizado corresponde a DNAg de cada planta. Carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden al amplificado de las plantas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente. Carril 8 control negativo y carril 9 control positivo.

E: gel agarosa al 1 % en el que se ha cargado DNAg extraído de tres plantas transgénicas promotor EgCBF-1 resistentes a Kan. Carriles 2, 3 y 4 DNAg de las plantas 1, 2 y 3.

F: amplificación mediante PCR del promotor EgCBF-1 utilizando partidores proEgCBF1-F/proEgCBF1- R. El templado utilizado corresponde a DNAg de cada planta. Carriles 2, 3 y 4 corresponden al amplificado de las plantas 1, 2 y 3 respectivamente.

G: Controles de la reacción de PCR en la que se amplificó el promotor EgCBF-1. Carril 2 control negativo y carril 3 control positivo.

La eficiencia de la inmersión floral, calculada como se ha descrito en la sección 2.11.2, se detalla en la Tabla 12 para cada una de las construcciones.

Tabla 12: Eficiencia de transformación estable de *A. thaliana* realizada mediante inmersión floral

| Construcción | Nº semillas sembradas | Nº semillas resistentes a Kan | Eficiencia % |
|------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------|
| Promotor EgCBF-1 | 1500 | 3 | 0,2 |
| pGWB3 vacío | 835 | 4 | 0,48 |
| pCAMBIA 1305.1 | 2000 | 6 | 0,3 |

Se obtuvieron tres líneas transgénicas confirmadas mediante reacción de PCR para el promotor EgCBF-1, cuatro líneas para el vector pGWB3 vacío y seis líneas transgénicas para el control positivo pCAMBIA1305.1.

3.6 ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR EgCBF-1 EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *A. thaliana* MEDIANTE REACCIÓN HISTOQUÍMICA GUS

3.6.1 Ensayos de funcionalidad en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a frío

El primer acercamiento a los ensayos experimentales, consistió en someter plantas transgénicas confirmadas a 4 °C durante 1 h, manteniendo otras a 25 °C en condiciones de luz y oscuridad. Estos valores corresponden los descritos en la literatura para ensayos análogos⁴². Para esto se utilizaron como controles líneas transgénicas del vector pGWB3 vacío y líneas transgénicas del vector pCAMBIA1305.1 (Control negativo y positivo, respectivamente). Además se evaluaron las tres líneas transgénicas del promotor EgCBF-1, junto a plantas silvestres. Todas las plantas se utilizaron a las tres semanas de edad.

Después de someter las plantas a los diferentes estímulos, a cada una de ellas se le realizó el ensayo GUS mediante reacción histoquímica, según lo establecido en la sección 2.12.3. En la Figura 25 se presentan los resultados obtenidos.

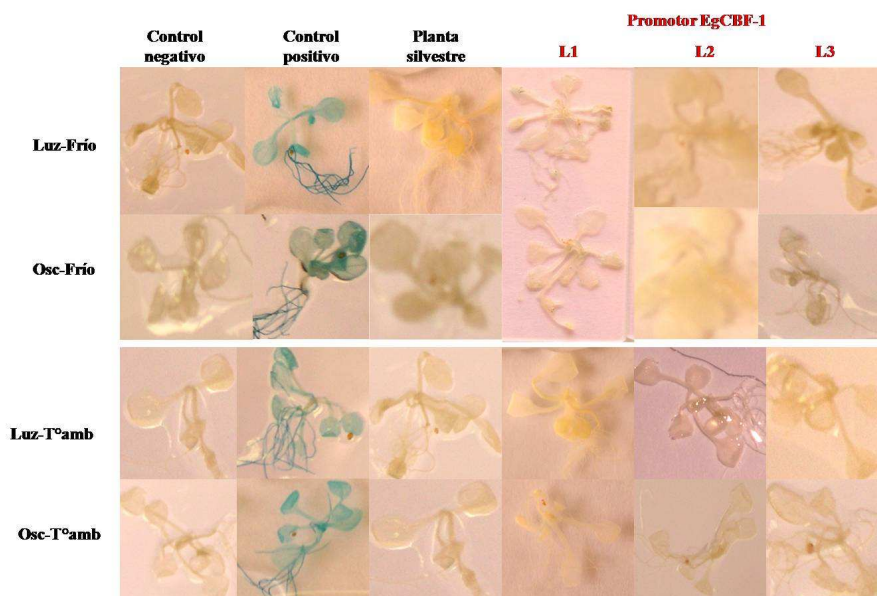


Figura 25: Ensayo de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a estímulos combinados de frío/temperatura ambiente y luz/oscuridad

En la Figura 25 se observa que los controles funcionaron correctamente, ya que tanto el control positivo (pCAMBIA1305.1) como los controles negativos (pGWB3 vacío y plantas silvestres) se comportaron de forma esperada. Es importante señalar que cada una de las pruebas fue realizada independientemente para tres individuos de cada línea transgénica, comportándose todos de la misma forma en cada uno de los tratamientos.

En la columna correspondiente a las pruebas para el promotor EgCBF-1, no se observaron resultados positivos bajo ninguno de los estímulos aplicados y para ninguna de las líneas transgénicas evaluadas; es decir, el promotor EgCBF-1 no fue activado. Esto puede deberse a que el tiempo de exposición al frío fue insuficiente para lograr la activación del promotor y de esta manera permitir la expresión del gen reportero.

Por esta razón, se realizó nuevamente el experimento, pero esta vez sólo con estímulos de luz/frío y luz/temperatura ambiente, pero a distintos intervalos de exposición a frío. Los intervalos de tiempo utilizados fueron 0, 1, 2, 3 y 4 h a 4 °C / 25 °C. Una vez realizado el tratamiento, todas las plantas se sometieron al ensayo de detección GUS mediante reacción histoquímica, según lo detallado en la sección 2.12.3. Se utilizaron líneas del vector pGWB3 vacío, líneas del vector pCAMBIA1305.1 y las tres líneas del promotor EgCBF-1. Se utilizaron además plantas silvestres, todas de tres semanas de edad.

En la Figura 26 y Figura 27, se observan los resultados obtenidos para las plantas sometidas a frío-luz y a temperatura ambiente –luz a distintos intervalos de tiempo, respectivamente.

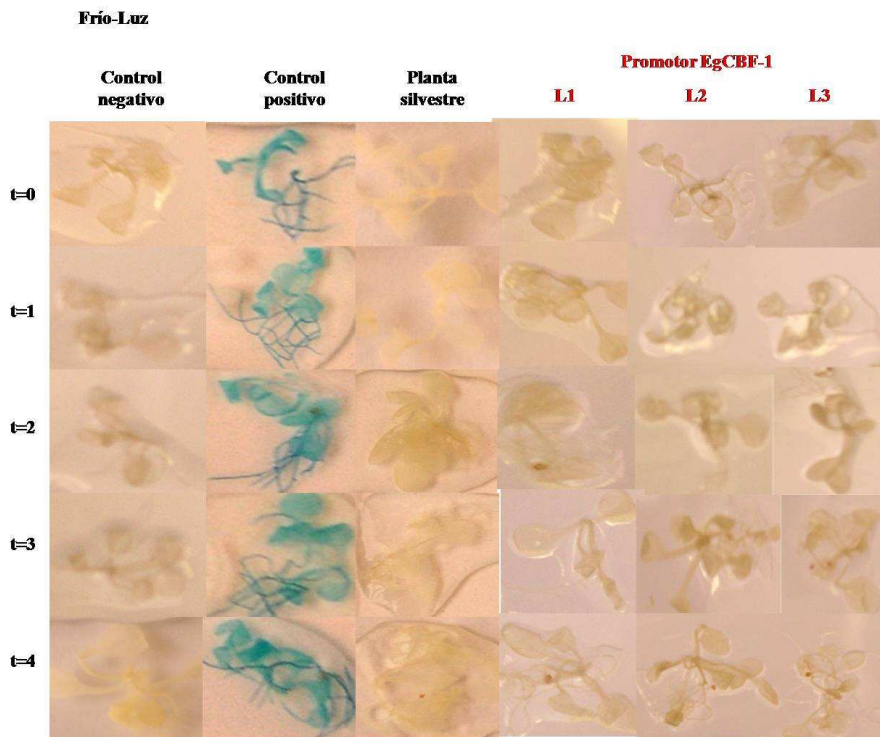


Figura 26: Ensayo de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a frío y luz a distintos intervalos de tiempo

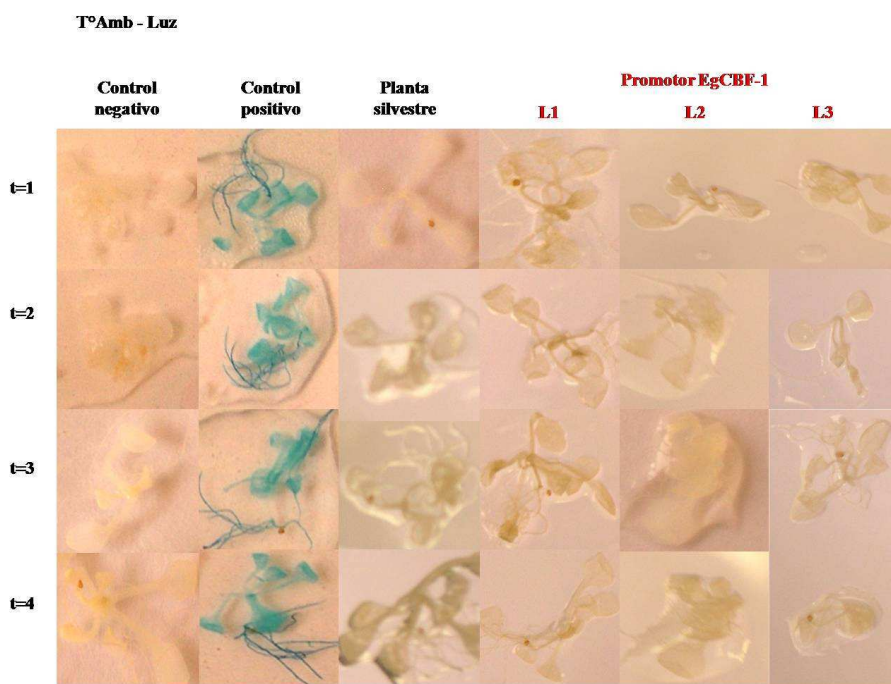


Figura 27: Ensayo de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de *A. thaliana* a T° ambiente y luz a distintos intervalos de tiempo

En las figuras anteriores (Figura 26 y Figura 27) se observó que todos los controles se comportaron según lo esperado bajo los distintos tratamientos y a todos los intervalos de tiempo.

Sin embargo, nuevamente se obtuvieron resultados negativos para el promotor EgCBF-1, ya que bajo ninguno de los tiempos de exposición a frío se logró activar el promotor. Esto se repitió para todas las líneas transgénicas evaluadas.

3.6.2 Ensayos de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de *A. thaliana* tratadas con ABA

Dado que no se logró activar el promotor EgCBF-1 bajo estímulos de frío para ninguna de las líneas transgénicas estudiadas, se realizaron ensayos para evaluar si la hormona ABA es capaz de lograrlo. Este ensayo se fundamenta en que el análisis bioinformático de la secuencia obtenida para el promotor EgCBF-1 identificó motivos de respuesta a ABA (sección 3.2.4). De esta forma podría lograrse la activación del promotor por una vía distinta a la regulada por el factor de transcripción ICE-1. Los ensayos con ABA se realizaron según lo descrito en la sección 2.12.2.

En la Figura 28 se presentan los resultados obtenidos para el tratamiento con 100 μ M ABA, mientras que en la Figura 29 se presentan los resultados del control con etanol 0,1 %.

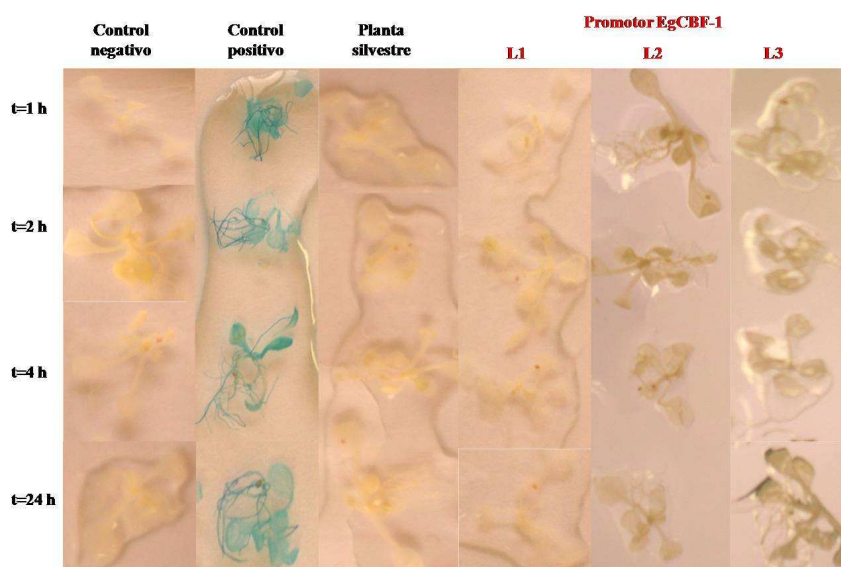


Figura 28: Ensayo de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a distintos intervalos de tiempo de tratamiento con ABA

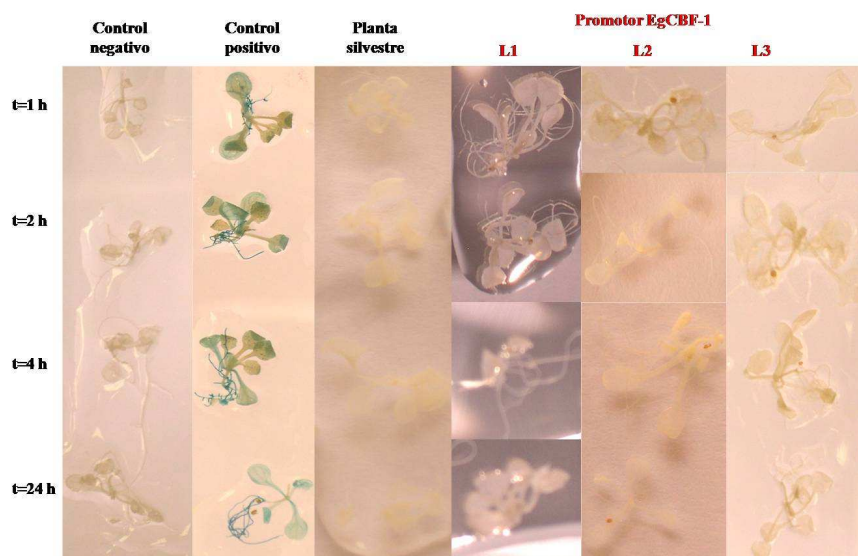


Figura 29: Ensayo de funcionalidad del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a distintos intervalos de tiempo de tratamiento con etanol

De las Figura 28 y Figura 29 se determinó que no existe activación del promotor en estudio para ninguna de las líneas transgénicas estudiadas bajo el tratamiento con ABA. Este resultado fue similar al que se observó para las plantas sometidas a estímulos de frío (Figura 26 y Figura 27). Al igual que en ese caso, los controles realizados indican que no existieron errores en el desarrollo metodológico, ya que en ambos casos el control positivo y los controles negativos se comportaron según lo esperado.

Ninguno de los ensayos de funcionalidad desarrollados arrojó resultados concluyentes. Mediante la infiltración de plantas de *N. benthamiana* el promotor EgCBF-1 desencadenó la actividad GUS en forma constitutiva y en los ensayos en plantas transgénicas de *A. thaliana* nunca se observó actividad GUS mediante reacción histoquímica. Por esta razón se evaluó la presencia de transcritos del gen GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a frío y ABA.

3.7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN GUS MEDIANTE RT-PCR EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *A. thaliana*

Se utilizó la técnica de RT-PCR como una forma semi cuantitativa de estudio de la expresión de los transcritos del gen GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a estímulos de frío y ABA. Los ensayos se realizaron tal como se detalló en la sección 2.13.1.

La extracción de RNA se realizó utilizando TRIZOL y la cuantificación del RNA utilizando el Kit Quant-iT RNA Assay (Invitrogen). Se verificó la consistencia de la cuantificación y calidad del RNA mediante el análisis de la intensidad de la bandas ribosomales. Para esto se cargaron 150 ng de RNA en un gel de agarosa al 1 %. Se tomaron 1000 ng para realizar la transcripción reversa, según lo

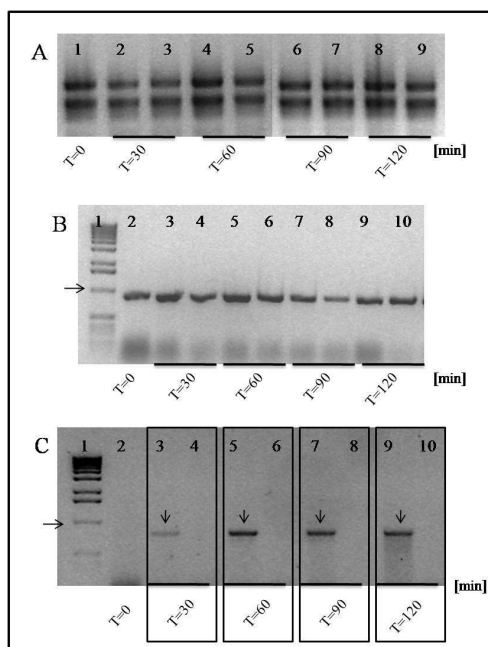
descrito en la sección 2.13.4 y utilizando el partididor reverso oligo dT. Para confirmar la calidad del cDNA sintetizado, se realizó una reacción de PCR para amplificar el gen constitutivo Actina (partidores Actina F/R, Tabla 7).

Una vez establecida la calidad del cDNA, se realizó una segunda reacción de PCR, utilizando partididores específicos para el gen GUS (partidores GUS2 F/R, Tabla 7). Para obtener productos amplificados que no presentaran saturación, se utilizó 1 µl de cDNA diluido 1:10 y 25 ciclos de amplificación en el caso de plantas sometidas a frío, mientras que para la plantas sometidas a ABA se utilizaron como templado 2 µl directos de cDNA y 45 ciclos de amplificación.

3.7.1 Ensayo de expresión del gen GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a frío

En la Figura 30, Figura 31 y Figura 32 se presentan los ensayos de expresión, realizados mediante RT-PCR, para las tres líneas transgénicas promotor EgCBF-1::GUS evaluadas. Estas figuras incluyen el RNA obtenido de las plantas tratadas, la amplificación del gen constitutivo y la amplificación del gen GUS. En la Figura 33 se presentan los controles del ensayo, correspondientes a una línea transgénica transformada con el vector pGWB3 vacío y plantas silvestres de *A. thaliana*.

Figura 30: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de *A. thaliana* de la línea transgénica uno del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a frío



Todas las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1 %.

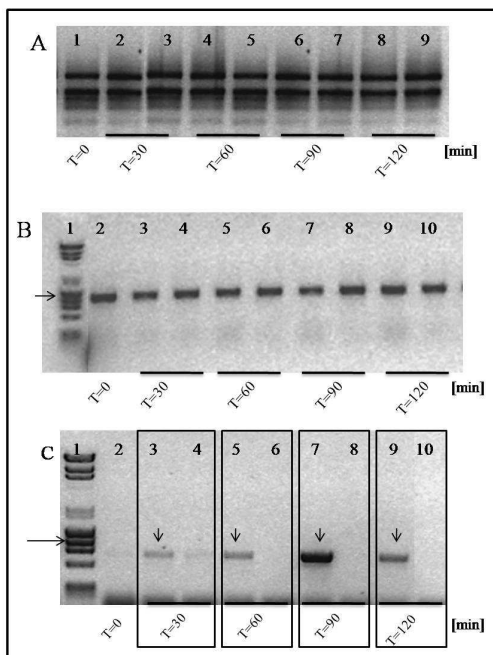
Los números señalan el tratamiento al que fueron sometidas las plantas. **1:** estándar de peso molecular 1 kb, **2:** tiempo 0 (sin tratamiento), **3:** 30 minutos a 4 °C, **4:** 30 min a temperatura ambiente, **5:** 60 min a 4 °C, **6:** 60 min a temperatura ambiente, **7:** 90 min a 4 °C, **8:** 90 min a temperatura ambiente, **9:** 120 min a 4 °C, **10:** 120 min a temperatura ambiente.

A: RNA extraído de plantas de la línea transgénica uno sometidas a frío

B: Expresión del gen constitutivo Actina de *A. thaliana*

C: Expresión del gen GUS

Figura 31: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de la línea transgénica dos del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a frío



Todas las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1 %.

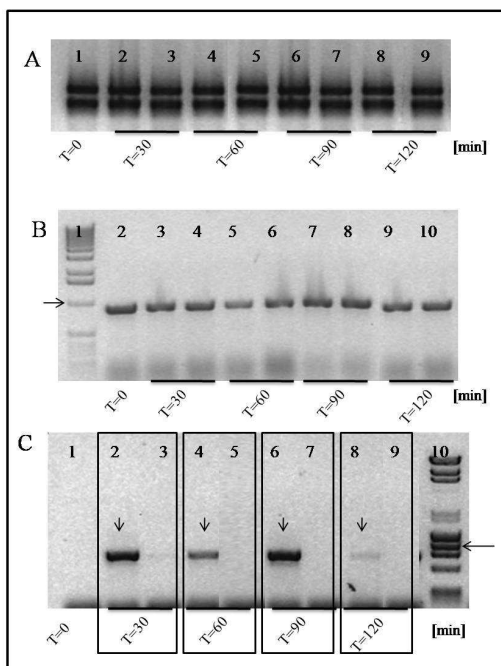
Los números señalan el tratamiento al que fueron sometidas las plantas. **1:** estándar de peso molecular 1 kb, **2:** tiempo 0 (sin tratamiento), **3:** 30 minutos a 4 °C, **4:** 30 min a temperatura ambiente, **5:** 60 min a 4 °C, **6:** 60 min a temperatura ambiente, **7:** 90 min a 4 °C, **8:** 90 min a temperatura ambiente, **9:** 120 min a 4 °C, **10:** 120 min a temperatura ambiente.

A: RNA extraído de plantas de la línea transgénica dos sometidas a frío

B: Expresión del gen constitutivo Actina de *A. thaliana*

C: Expresión del gen GUS

Figura 32: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de *A. thaliana* de la línea transgénica tres del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a frío



Todas las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1 %.

A: RNA extraído desde plantas de la línea tres **1:** tiempo 0 (sin tratamiento), **2:** 30 minutos a 4 °C, **3:** 30 min a temperatura ambiente, **4:** 60 min a 4 °C, **5:** 60 min a temperatura ambiente, **6:** 90 min a 4 °C, **7:** 90 min a temperatura ambiente, **8:** 120 min a 4 °C, **9:** 120 min a temperatura ambiente.

B: Expresión del gen constitutivo Actina de *A. thaliana*: estándar de peso molecular 1 kb, **2:** tiempo 0 (sin tratamiento), **3:** 30 minutos a 4 °C, **4:** 30 min a temperatura ambiente, **5:** 60 min a 4 °C, **6:** 60 min a temperatura ambiente, **7:** 90 min a 4 °C, **8:** 90 min a temperatura ambiente, **9:** 120 min a 4 °C, **10:** 120 min a temperatura ambiente.

C: Expresión del gen GUS **1:** tiempo 0 (sin tratamiento), **2:** 30 minutos a 4 °C, **3:** 30 min a temperatura ambiente, **4:** 60 min a 4 °C, **5:** 60 min a temperatura ambiente, **6:** 90 min a 4 °C, **7:** 90 min a temperatura ambiente, **8:** 120 min a 4 °C, **9:** 120 min a temperatura ambiente, **10:** estándar de peso molecular λ/ϕ .

En la Figura 30A, Figura 31A y Figura 32A se observan RNAs de buena calidad y sin signos de degradación. La reacción de PCR para el gen constitutivo generó amplificados de intensidad

equivalente para cada experimento (Figura 30B, Figura 31B y Figura 32B). Esto indica que la cuantificación del RNA fue exitosa y que en cada punto a evaluar se está trabajando con igual cantidad de RNA. De esta forma, los resultados para la reacción de PCR del gen GUS indican una tendencia cinética válida de la acumulación de transcritos.

En la Figura 30C se observó la presencia de productos de RT-PCR, lo que indica que existen transcritos para las plantas transgénicas de la línea transgénica uno sometidas a frío en todos los intervalos evaluados. Por otra parte, no se observó presencia de productos de RT-PCR en las plantas mantenidas a condición control (Temperatura ambiente), lo que indica que no existen transcritos. El máximo de expresión se determinó a los 60 min de sometimiento a frío.

Para las líneas transgénicas dos y tres, se observa en las Figura 31 y Figura 32, respectivamente, la presencia de productos de RT-PCR, lo que indica que existen transcritos para las plantas sometidas a frío en todos los intervalos evaluados. No se observó presencia de productos de RT-PCR, lo que indica que no existen transcritos en las plantas mantenidas a condición control (Temperatura ambiente). El máximo de expresión ocurrió, en ambos casos, a los 90 min de sometimiento a frío.

Como controles del ensayo, se realizó el mismo procedimiento para plantas transgénicas transformadas con el vector pGWB3 vacío y plantas silvestres de *A. thaliana*. En la Figura 33 se observan los resultados obtenidos para las plantas utilizadas como controles.

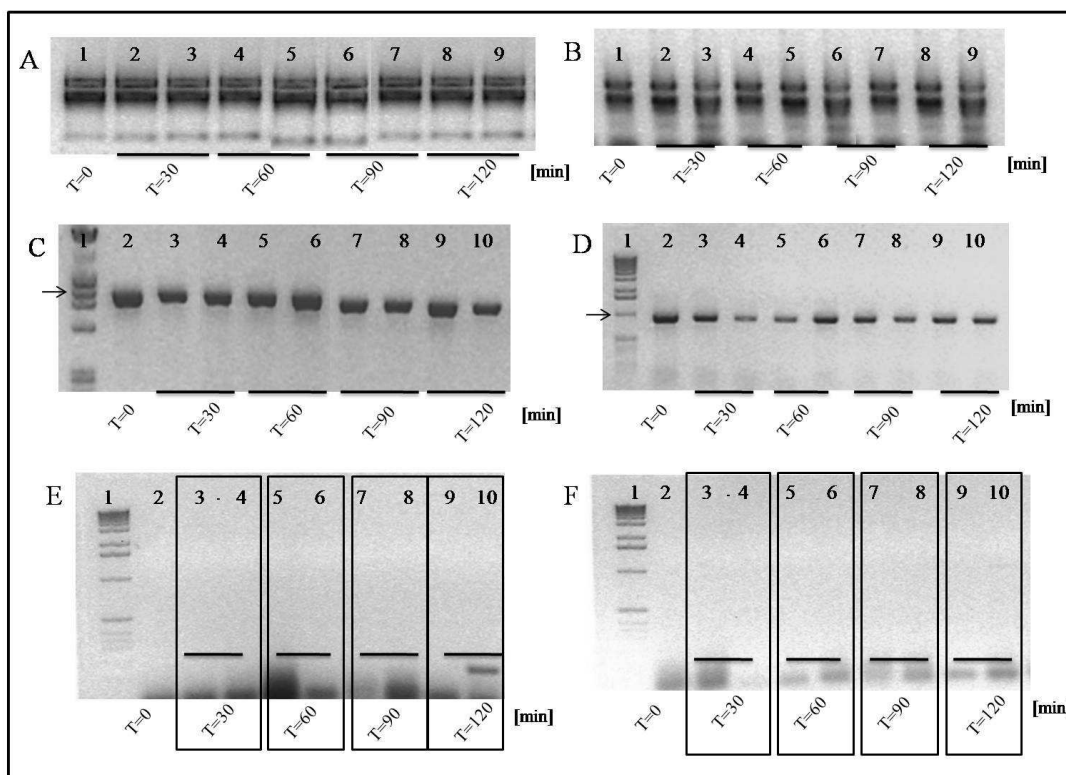


Figura 33: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas controles de *A.thaliana* sometidas a frío

Todas las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1 %. **A y B:** RNA extraído de la línea transgénica uno del vector pGWB3 vacío y plantas silvestres, respectivamente. Carriles del uno al nueve indican el tratamiento al que fue sometido la planta. **1:** tiempo 0 (sin tratamiento), **2:** 30 minutos a 4 °C, **3:** 30 min a temperatura ambiente, **4:** 60 min a 4 °C, **5:** 60 min a temperatura ambiente, **6:** 90 min a 4 °C, **7:** 90 min a temperatura ambiente, **8:** 120 min a 4 °C y **9:** 120 min a temperatura ambiente.

C y D: Expresión del gen constitutivo Actina de *A. thaliana*. Carriles del uno al diez indican el tratamiento al que fue sometido la planta. **1C:** estándar de peso molecular λ/ϕ , **1D:** estándar de peso molecular 1 kb, **2:** tiempo 0 (sin tratamiento), **3:** 30 minutos a 4 °C, **4:** 30 min a temperatura ambiente, **5:** 60 min a 4 °C, **6:** 60 min a temperatura ambiente, **7:** 90 min a 4 °C, **8:** 90 min a temperatura ambiente, **9:** 120 min a 4 °C, **10:** 120 min a temperatura ambiente.

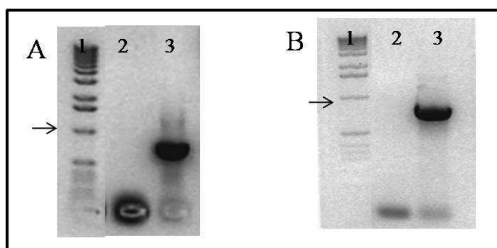
E y F: Expresión del gen GUS. **1:** estándar de peso molecular 1 kb, **2:** tiempo 0 (sin tratamiento), **3:** 30 minutos a 4 °C, **4:** 30 min a temperatura ambiente, **5:** 60 min a 4 °C, **6:** 60 min a temperatura ambiente, **7:** 90 min a 4 °C, **8:** 90 min a temperatura ambiente, **9:** 120 min a 4 °C, **10:** 120 min a temperatura ambiente.

En la Figura 33 A y B se observan RNAs de buena calidad y sin signos de degradación. La reacción de PCR para el gen constitutivo generó amplificadas de intensidad equivalente para cada experimento (Figura 33 C y D). En cuanto a los resultados para la reacción de PCR del gen GUS, se observa en las Figura 33 E y F, que para ningún tratamiento existen productos de RT-PCR, lo que indica que no existen transcritos para el gen GUS.

Este resultado es coherente con lo esperado, ya que las plantas transformadas con el vector pGWB3 vacío poseen el gen GUS sin el control de ningún promotor. De esta forma se confirma que es necesaria la presencia de un promotor y elementos reguladores para gatillar la expresión del gen reportero GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Por otra parte, se confirma que plantas silvestres de *A. thaliana* no presentan transcritos para el gen reportero GUS.

En la Figura 34 se presentan los controles de las reacciones de PCR realizadas para los ensayos de RT-PCR en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a frío. A través de estos controles se prueba que no existe contaminación en las reacciones de PCR y que por lo tanto, los resultados obtenidos son representativos de los ensayos realizados.

Figura 34: Controles de las reacciones de PCR para los ensayos de expresión en plantas de *A. thaliana* sometidas a frío



A: controles para el gen Actina. **A1:** estándar de peso molecular 1 kb, **A2:** control negativo de la reacción de PCR, **A3:** control positivo de la reacción de PCR.

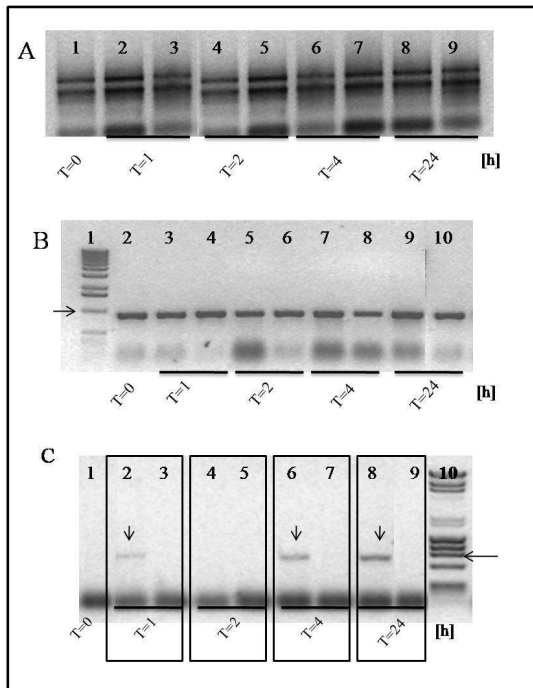
B: controles para el gen GUS. **B1:** estándar de peso molecular 1 kb, **B2:** control negativo de la reacción de PCR, **B3:** control positivo de la reacción de PCR.

El templado utilizado como control positivo de la reacción de PCR para el gen de Actina, corresponde a 2 μ l de DNAg de plantas silvestres de *A. thaliana* (Figura 34A). Como control positivo de la reacción de PCR para el gen GUS se utilizaron 2 μ l de DNAp del vector pGWB3 vacío en una dilución 1:100 (Figura 34B).

3.7.2 Ensayo de expresión del gen GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a ABA

En la Figura 35, Figura 36 y Figura 37 se presentan los ensayos de expresión, realizados mediante RT-PCR en las tres líneas transgénicas promotor EgCBF-1::GUS evaluadas. Estas figuras incluyen los RNA extraídos desde las plantas tratadas, la amplificación del gen constitutivo y la amplificación del gen GUS. En la Figura 38 se presentan los controles del ensayo, correspondientes a una línea transgénica transformada con el vector pGWB3 vacío y plantas silvestres de *A. thaliana*.

Figura 35: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de *A. thaliana* de la línea transgénica uno del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a ABA



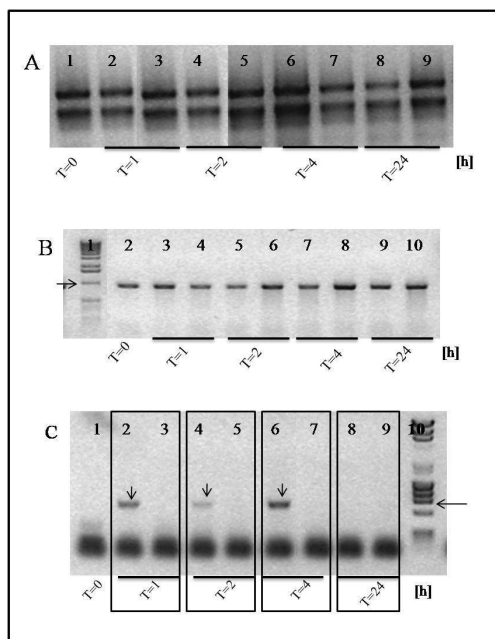
Todas las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1 %.

A: RNA extraído desde plantas de la línea transgénica 1 **1:** tiempo 0 (sin tratamiento), **2:** 1 h 100 μM ABA, **3:** 1 h etanol 0,1 %, **4:** 2 h 100 μM ABA, **5:** 2 h etanol 0,1 %, **6:** 4h 100 μM ABA, **7:** 4 h etanol 0,1 %, **8:** 24 h 100 μM ABA, **9:** 24 h etanol 0,1 %.

B: Expresión del gen constitutivo Actina de *A. thaliana* **1:** estándar de peso molecular 1 kb, **2:** tiempo 0 (sin tratamiento), **3:** 1 h 100 μM ABA, **4:** 1 h etanol 0,1 %, **5:** 2 h 100 μM ABA, **6:** 2 h etanol 0,1 %, **7:** 4h 100 μM ABA, **8:** 4 h etanol 0,1 %, **9:** 24 h 100 μM ABA, **10:** 24 h etanol 0,1 %.

C: Expresión del gen GUS **1:** tiempo 0 (sin tratamiento), **2:** 1 h 100 μM ABA, **3:** 1 h etanol 0,1 %, **4:** 2 h 100 μM ABA, **5:** 2 h etanol 0,1 %, **6:** 4h 100 μM ABA, **7:** 4 h etanol 0,1 %, **8:** 24 h 100 μM ABA, **9:** 24 h etanol 0,1 %, **10:** estándar de peso molecular λ/ϕ .

Figura 36: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de *A. thaliana* de la línea transgénica dos del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a ABA



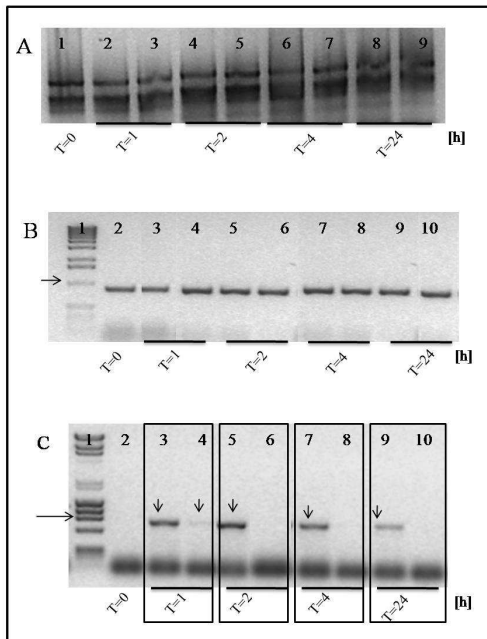
Todas las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1 %.

A: RNA extraído desde plantas transgénicas de la línea dos **1:** tiempo 0 (sin tratamiento), **2:** 1 h 100 μM ABA, **3:** 1 h etanol 0,1 %, **4:** 2 h 100 μM ABA, **5:** 2 h etanol 0,1 %, **6:** 4h 100 μM ABA, **7:** 4 h etanol 0,1 %, **8:** 24 h 100 μM ABA, **9:** 24 h etanol 0,1 %.

B: Expresión del gen constitutivo Actina de *A. thaliana* **1:** estándar de peso molecular 1 kb, **2:** tiempo 0 (sin tratamiento), **3:** 1 h 100 μM ABA, **4:** 1 h etanol 0,1 %, **5:** 2 h 100 μM ABA, **6:** 2 h etanol 0,1 %, **7:** 4h 100 μM ABA, **8:** 4 h etanol 0,1 %, **9:** 24 h 100 μM ABA, **10:** 24 h etanol 0,1 %.

C: Expresión del gen GUS **1:** tiempo 0 (sin tratamiento), **2:** 1 h 100 μM ABA, **3:** 1 h etanol 0,1 %, **4:** 2 h 100 μM ABA, **5:** 2 h etanol 0,1 %, **6:** 4h 100 μM ABA, **7:** 4 h etanol 0,1 %, **8:** 24 h 100 μM ABA, **9:** 24 h etanol 0,1 %, **10:** estándar de peso molecular λ/ϕ .

Figura 37: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas de *A. thaliana* de la línea transgénica tres del promotor EgCBF-1::GUS sometidas a ABA



Todas las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1 %.

A: RNA extraído desde plantas de la línea transgénica tres **1:** tiempo 0 (sin tratamiento), **2:** 1 h 100 μ M ABA, **3:** 1 h etanol 0,1 %, **4:** 2 h 100 μ M ABA, **5:** 2 h etanol 0,1 %, **6:** 4h 100 μ M ABA, **7:** 4 h etanol 0,1 %, **8:** 24 h 100 μ M ABA, **9:** 24 h etanol 0,1 %.

B: Expresión del gen constitutivo Actina de *A. thaliana*

C: Expresión del gen GUS

Para **B** y **C** los números señalan el tratamiento al que fueron sometidas las plantas. **1B:** estándar de peso molecular 1 kb, **1C:** estándar de peso molecular λ/ϕ , **2:** tiempo 0 (sin tratamiento), **3:** 1 h 100 μ M ABA, **4:** 1 h etanol 0,1 %, **5:** 2 h 100 μ M ABA, **6:** 2 h etanol 0,1 %, **7:** 4h 100 μ M ABA, **8:** 4 h etanol 0,1 %, **9:** 24 h 100 μ M ABA, **10:** 24 h etanol 0,1 %.

En la Figura 35A, Figura 36A y Figura 37A se observan RNAs de buena calidad y sin signos de degradación. La reacción de PCR para el gen constitutivo generó amplificadores de intensidad equivalente para cada experimento (Figura 35B, Figura 36B y Figura 37B). De esta forma, los resultados para la reacción de PCR del gen GUS indican una tendencia cinética válida de la acumulación de transcritos.

En la Figura 35, Figura 36 y Figura 37 C se observó la presencia de productos de RT-PCR, lo que indica que existen transcritos para las plantas transgénicas de todas las líneas transgénicas sometidas a ABA en los intervalos de tratamiento de 1 h, 4 h y 24 h. No se observó presencia de productos de RT-PCR en las plantas mantenidas a condición control (Temperatura ambiente), lo que indica que no existen transcritos en esta condición. El máximo de expresión ocurre a los 24 h de sometimiento a ABA para la línea transgénica uno, a las 4 h para la línea transgénica dos y a las 2 h para la línea transgénica tres.

Como controles del ensayo, se realizó el mismo procedimiento para plantas transgénicas transformadas con el vector pGWB3 vacío y plantas silvestres. En la Figura 38 se observan los resultados para los controles.

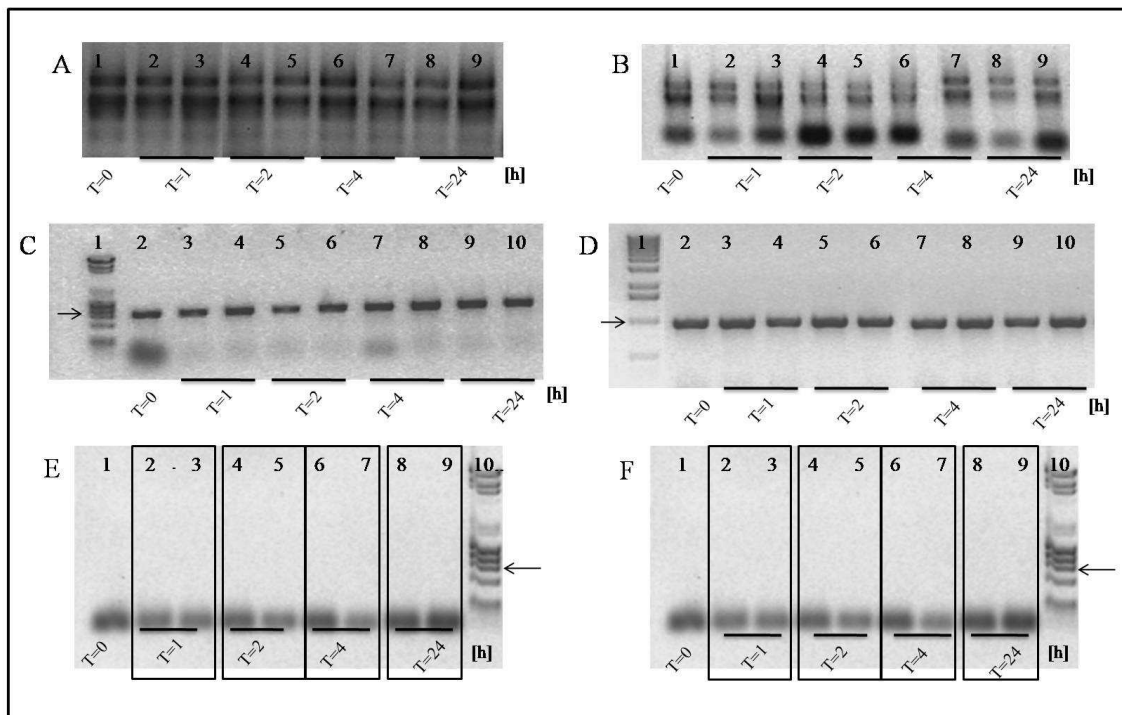


Figura 38: Ensayo de expresión mediante RT-PCR en plantas controles de *A.thaliana* sometidas a ABA

Todas las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1 %. **A y B:** extracciones de RNA para la línea transgénica dos del vector pGWB3 vacío y plantas silvestres, respectivamente. Carriles del uno al nueve indican el tratamiento al que fue sometido la planta. **1:** tiempo 0 (sin tratamiento), **2:** 1 h 100 μ M ABA, **3:** 1 h 0,1 % etanol, **4:** 2 h 100 μ M ABA, **5:** 2 h 0,1 % etanol, **6:** 4 h 100 μ M ABA, **7:** 4 h 0,1 % etanol, **8:** 24 h 100 μ M ABA y **9:** 24 h 0,1 % etanol.

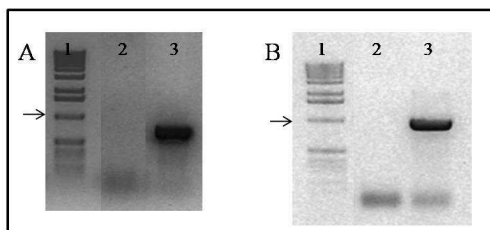
C y D: amplificación mediante reacción de PCR del gen constitutivo Actina de *A. thaliana*. Carriles del uno al diez indican el tratamiento al que fue sometido la planta. **1C:** estándar de peso molecular 1 kb, **1D:** estándar de peso molecular λ/ϕ , **2:** tiempo 0 (sin tratamiento), **3:** 1 h 100 μ M, **4:** 1 h 0,1 % etanol, **5:** 2 h 100 μ M, **6:** 2 h 0,1 % etanol, **7:** 4 h 100 μ M, **8:** 4 h 0,1 % etanol, **9:** 24 h 100 μ M, **10:** 24 h 0,1 % etanol.

E y F: amplificación mediante reacción de PCR del gen GUS. **1:** tiempo 0 (sin tratamiento), **2:** 1 h 100 μ M ABA, **3:** 1 h 0,1 % etanol, **4:** 2 h 100 μ M ABA, **5:** 2 h 0,1 % etanol, **6:** 4 h 100 μ M ABA, **7:** 4 h 0,1 % etanol, **8:** 24 h 100 μ M ABA y **9:** 24 h 0,1 % etanol, **10:** estándar de peso molecular λ/ϕ .

En las Figura 38 A y B se observan RNAs de buena calidad y amplificados de intensidad equivalente para el gen constitutivo (Figura 38 C y D). En cuanto a la expresión del gen GUS, se observa en las Figura 38 E y F, que para ningún tiempo de tratamiento con ABA existen transcritos para el gen GUS. Tal como los resultados obtenidos para las plantas sometidas frío, este resultado es coherente con lo esperado.

En la Figura 39 se presentan los controles de las reacciones PCR realizadas para el ensayo de RT-PCR en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a ABA. A través de estos controles se prueba que no existe contaminación en las reacciones de PCR y que por lo tanto, los resultados obtenidos son representativos de los ensayos realizados.

Figura 39: Controles de las reacciones de PCR para los ensayos de expresión en plantas de *A. thaliana* sometidas a ABA



A: controles para el gen Actina. **A1:** estándar de peso molecular 1 kb, **A2:** control negativo de la reacción de PCR, **A3:** control positivo de la reacción de PCR.

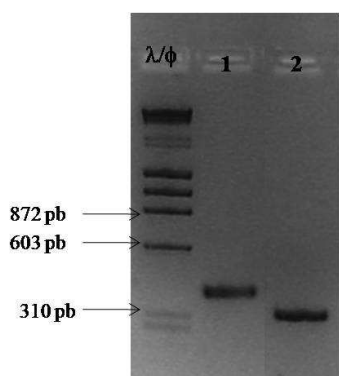
B: controles para el gen GUS. **B1:** estándar de peso molecular 1 kb, **B2:** control negativo de la reacción de PCR, **B3:** control positivo de la reacción de PCR.

3.8 ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DE INSERCIÓN DEL PROMOTOR Eg-CBF1::GUS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *A. thaliana* MEDIANTE *SOUTHERN BLOT*

3.8.1 Síntesis de la sonda no radioactiva

La sonda se sintetizó mediante una reacción de PCR, según lo señalado en la sección 2.14.1. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presenta el amplificado mediante reacción de PCR, utilizando los partidores GUS F/R (Ver Tabla 7).

Figura 40: Sonda no-radioactiva para detectar un fragmento del gen GUS



Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2 %. En el carril 1 se muestra la sonda sintetizada, utilizando el nucleótido marcado dUTP-digoxigenina. En el carril 2 se muestra el amplificado, pero utilizando nucleótidos normales.

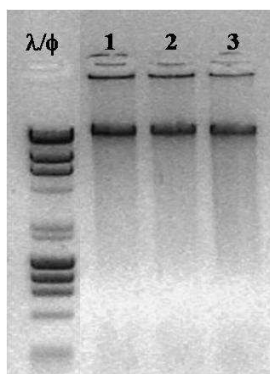
Es importante notar la diferencia de tamaño entre la sonda sintetizada utilizando el nucleótido marcado dUTP-digoxigenina y el amplificado con partidores normales. Esta diferencia se debe a que la molécula digoxigenina, que se agrega al producto de reacción de PCR, corresponde a una molécula de gran tamaño que retarda la migración del amplificado en un gel de agarosa. De esta forma es posible comprobar que la síntesis de la sonda ha sido exitosa.

3.8.2 Extracción y digestiones de DNAg

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, el número de copias de la construcción promotor EgCBF-1::GUS en el genoma de las distintas líneas de *A. thaliana* transgénicas, se estableció mediante la técnica de *Southern blot* (sección 2.14).

En la Figura 41 se presenta el DNAg extraído desde las 3 líneas transgénicas de *A. thaliana*. Este DNAg se cuantificó mediante inspección visual y comparándolo con el estándar de DNA λ/ϕ , en el que cada una de las bandas es de concentración conocida. A partir de esto, se determinó el volumen de DNAg a utilizar, para completar 10 μg de DNAg en cada digestión.

Figura 41: DNAg extraído desde las distintas líneas transgénicas de *A. thaliana*



Se cargó 1 μl de cada muestra, en un gel de agarosa al 1 %. En el carril 1 se presenta el DNAg extraído para la línea uno, en el carril 2 para la línea dos y en el carril 3 para la línea tres.

Una vez determinado el volumen de DNAg necesario para completar los 10 μg de DNAg de las distintas líneas transgénicas, se realizaron digestiones con tres endonucleasas de restricción que no cortaran dentro de la secuencia de la construcción desarrollada, escogiendo *BglII*, *EcoRI* y *Hind III*. Estas digestiones se realizaron en un volumen final de 100 μl . En la Figura 42 A, D y G se muestran las digestiones correspondientes a las líneas transgénicas uno, dos y tres, respectivamente.

Una vez realizadas las digestiones, se procedió a transferir el DNAg a una membrana de nylon, según lo detallado en las secciones 2.14.2 y 2.14.3. Finalmente se realizó la fijación de los fragmentos de DNAg a la membrana de nylon, exponiendo la membrana a luz UV durante 15 min.

3.8.3 Determinación del número de copias de la construcción promotor EgCBF-1::GUS en líneas transgénicas de *A. thaliana*

Una vez que se tuvo la membrana de nylon con los fragmentos de DNAG adheridos y la sonda sintetizada, se procedió a la hibridación y posterior detección. Estos procedimientos se realizaron según lo detallado en las secciones 2.14.4 y 2.14.5.

La membrana de nylon se hibridó con la sonda marcada por 16 h a 42°C para posteriormente ser lavada, aumentando en cada lavado la estrictez.

A continuación de las etapas de lavado, la membrana se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina y posteriormente con el sustrato CDP-Star. Luego se expuso a una placa fotográfica durante intervalos variables de tiempo (entre 15 min y 1 h), observándose en todos los casos el mismo resultado, la presencia de múltiples bandas en los distintos carriles (Figura 42).

Para la primera línea transgénica (Figura 42 B), la digestión con *BglII* generó una única banda de alto peso molecular, que no pudo ser determinado. Mediante la digestión con la enzima *EcoRI* se obtuvieron cuatro bandas de aproximadamente 3500, 5000, 6000 y 1000 pb. La digestión con *Hind III* generó también cuatro bandas de aproximadamente 4500, 5500, 6000 y 10500 pb. Este resultado sugiere que para la línea transgénica uno hay al menos cuatro copias de la construcción promotor EgCBF-1::GUS.

Para la segunda línea transgénica (Figura 42 E), la digestión con *BglII* generó tres bandas de alto peso molecular, tamaños que no pudieron ser determinados. Mediante la digestión con la enzima *EcoRI* se obtuvieron seis bandas de aproximadamente 3000, 3500, 5000, 6000 y 6500 pb. No fue posible determinar el tamaño de la banda de mayor peso molecular. La digestión con *Hind III* generó siete bandas de aproximadamente 3800, 4200, 7500, 9000, 10000 y 12000 pb. No fue posible determinar el tamaño de la banda de mayor peso molecular. Este resultado sugiere que para la línea transgénica dos hay al menos cinco copias de la construcción promotor EgCBF-1::GUS.

Para la tercera línea transgénica (Figura 42 H), *BglII* generó una única banda de alto peso molecular, tamaño que no pudo ser determinado. Mediante la digestión con la enzima *EcoRI* se obtuvieron dos bandas de aproximadamente 6500 y 4500 pares de bases. La digestión con *Hind III* generó cuatro bandas de aproximadamente 20.000, 9.000 y 7.000 pares de bases. No fue posible determinar el tamaño de la banda de mayor peso molecular. Este resultado sugiere que para la línea transgénica tres hay al menos tres copias de la construcción promotor EgCBF-1::GUS.

Como un control de la sensibilidad del *Southern blot* se realizó un *Dot blot* (Figura 42 C, F e I). Para esto se depositó sobre la membrana de nylon 1 µl de diluciones crecientes de DNAP del vector pGWB3 vacío que contenía el fragmento del gen GUS utilizado como sonda (1, 1:10, 1:100 y 1:1000), con lo cual se estimó que el *Southern blot* fue capaz de detectar hasta una concentración de 0,25 ng/ul de DNA.

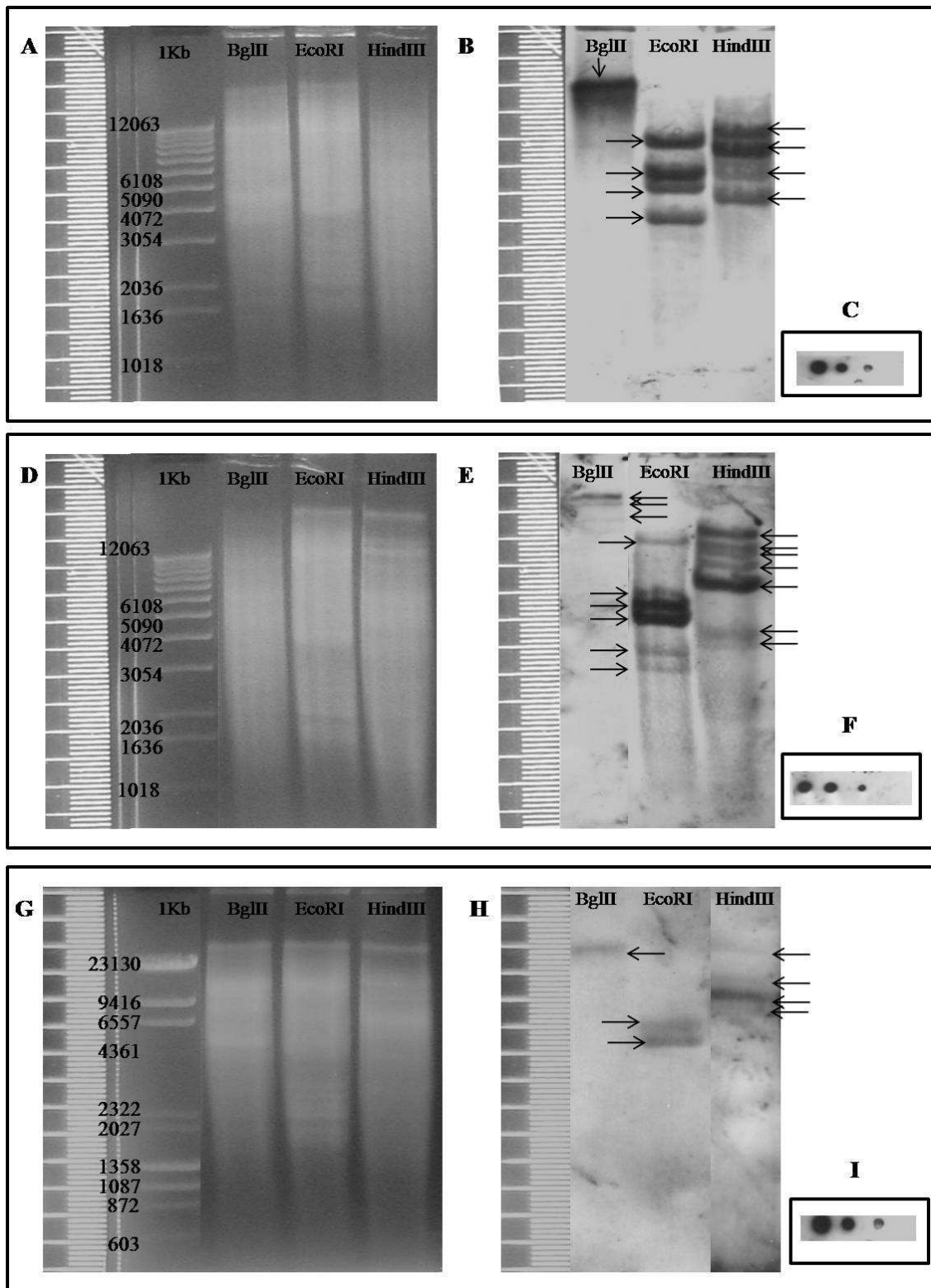


Figura 42: Determinación del número de copias de inserción del promotor EgCBF-1 en líneas transgénicas de *A. thaliana* mediante Southern blot

A: Digestiones DNAg para la línea transgénica uno. B: Southern blot línea transgénica uno. C: Dot blot

D: Digestiones DNAg para la línea transgénica dos. E: Southern blot línea transgénica dos. F: Dot blot

G: Digestiones DNAg para la línea transgénica tres. H: Southern blot línea transgénica tres. I: Dot blot

IV. DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS ESTRATÉGICO PARA LA INTRODUCCIÓN DE *E. globulus* TOLERANTES A LAS BAJAS TEMPERATURAS EN LA INDUSTRIA FORESTAL CHILENA

El análisis estratégico realizado incluyó, en primer lugar, un estudio detallado del escenario actual de la industria forestal chilena. Se determinó que el principal mercado para los productos forestales chilenos es Estados Unidos, pero que el panorama económico global ha hecho que las exportaciones se reenfoquen en el mercado chino. A su vez, se estableció que la industria forestal chilena posee auspiciosas expectativas a futuro, lo que se manifestó principalmente en el constante incremento de las importaciones.

En cuanto al rol de *E. globulus* en la industria forestal chilena, se determinó que del total de hectáreas plantadas comercialmente, esta especie concentra el 21% de las plantaciones forestales. Con este porcentaje, *E. globulus* se perfila como la segunda especie de importancia forestal plantada en el país, superado sólo por las plantaciones de *Pino radiata*. Se determinó además, que las plantaciones de *E. globulus* se concentran principalmente en la zona centro-sur del país, debido a la sensibilidad que presenta la especie a las bajas temperaturas características de zonas más australes.

Respecto a los avances en biotecnología forestal, se puso de manifiesto el creciente interés en el desarrollo biotecnológico en especies de eucalipto. A través de la experiencia en investigación y desarrollo de empresas chilenas y extranjeras, se logró dar luces de la magnitud real que la biotecnología forestal puede tener en la modificación del escenario económico actual de la industria forestal.

Para entender el contexto global del presente trabajo de tesis, fue necesario realizar un completo análisis interno. Éste se llevó a cabo utilizando el modelo de la cadena de valor, que permitió visualizar todas las etapas necesarias para enfrentar el negocio asociado a la introducción de una variedad de *E. globulus* tolerante a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena. La cadena de valor resultó fundamental para situar este trabajo de tesis en el contexto de un plan de negocio extremadamente complejo y que incluye desafíos superiores a los ya realizados para lograr resultados. Entre estos desafíos se encuentra el estudio de diversos promotores y genes que sean capaces de otorgar tolerancia al frío a *E. globulus*, y principalmente, el desarrollo de tecnologías específicas para transformar especies de eucalipto.

Los avances realizados hasta la fecha dejan de manifiesto que aún son necesarios muchos de años de trabajo, para que alguna institución chilena esté en condiciones de propagar o establecer cultivos de variedades de eucaliptos tolerantes a las bajas temperaturas.

El análisis de las fuerzas de Porter y el análisis FODA permitieron establecer los principales factores que determinarán el éxito o fracaso del plan de negocios planteado. En este sentido, una de las principales amenazas del negocio propuesto es que existen empresas internacionales que próximamente estarán en condiciones de poner a la venta en el mercado especies de eucaliptos

tolerantes a las bajas temperaturas. Sin embargo, nuestro país no se encuentra en condiciones de establecer cultivos de árboles transgénicos a corto plazo, debido principalmente a la carencia de una legislación adecuada. A su vez, el desconocimiento social de los temas relacionados con organismos genéticamente modificados hace difícil la implementación de plantaciones transgénicas. En este sentido, además de los esfuerzos científicos para generar una variedad de *E. globulus* tolerante a las bajas temperaturas, será necesario la implementación de políticas públicas acordes con este objetivo. De esta forma, es de esperar que de aquí a un mediano plazo el escenario actual cambie.

Entre las principales ventajas del negocio propuesto se tiene que las políticas gubernamentales se han mostrado favorables en el desarrollo de la biotecnología forestal. A su vez, la industria forestal chilena posee la solidez y experiencia necesaria para afrontar el desafío de introducir *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena.

4.2 AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL PROMOTOR EgCBF-1

Mediante la técnica de GenomeWalker, se logró aislar y secuenciar un fragmento de 941 pb. De estas 941 pb, 165 pb se sobrepone con el extremo 5' del gen EgCBF-1 y 776 pb corresponden a la región reguladora y al promotor del gen EgCBF-1 propiamente tal. Dado que la secuencia obtenida se sobrepone a una región conocida del extremo 5' del gen EgCBF-1 (GenBank Número de acceso DQ523829), se pudo determinar que se trata efectivamente del promotor deseado.

Es importante señalar que la región obtenida corresponde a un fragmento del promotor del gen EgCBF-1 y que debido a las limitaciones de la técnica utilizada no fue posible obtener un fragmento de mayor tamaño. Dado que no se puede determinar cuál es el largo completo del promotor, se debe considerar que el fragmento obtenido corresponde a una secuencia parcial del promotor. Para efectos de este trabajo se consideraron sólo las primeras 750 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, dejando fuera (hacia el extremo 5') secuencias reguladoras que podrían ser importantes en la funcionalidad del promotor. Por ejemplo, para el promotor del gen CBF-1 de *Eucalyptus gunni*, ortólogo al promotor en estudio, se conocen alrededor de 1500 pb. En dicha secuencia se encuentran 8 sitios de unión para el factor de transcripción ICE-1, pero en este trabajo sólo se consideraron los 4 primeros, ya que son los que se encuentran en las primeras 750 pb del promotor de *Eucalyptus gunni*.

En cuanto al análisis bioinformático del promotor en estudio, se determinó que el promotor EgCBF-1 presenta una serie de elementos de respuesta a estrés. Entre ellos se tienen cinco sitios de unión al factor de transcripción ICE-1, dos sitios de unión a proteínas tipo MYB, cuatro elementos de respuesta a ABA, dos elementos de respuesta a luz, un elemento de respuesta a auxinas, tres elementos de respuesta a estrés biótico y dos sitios de unión al factor de transcripción CBF-2. Estos elementos de respuesta a estrés son secuencias conservadas en promotores de genes ortólogos al promotor EgCBF-

1, tal como se observó en la Figura 17. Sin embargo, la cantidad de los elementos de respuesta varía entre los distintos promotores estudiados. Es así como el promotor de *Oriza sativa* posee seis sitios de unión al factor de transcripción ICE-1, mientras que los promotores de *Eucalyptus gunni* y *A. thaliana* poseen cuatro sitios de unión a este factor de transcripción.

En general, los elementos de respuesta en los cuatro promotores estudiados se encuentran conservados. Se observó particular similitud entre los promotores de las dos especies de eucaliptos, ya que son los únicos que presentan sitios de unión al factor de transcripción CBF-2 y un alto número de elementos de respuesta a estrés biótico.

4.3 ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR EgCBF-1

4.3.1 Clonamiento del gen reportero GUS bajo el control del promotor EgCBF-1 en el vector binario pGWB3

Un vez establecido, mediante secuenciación, que se tiene el promotor EgCBF-1, se dio paso a la realización de construcciones moleculares para pruebas de funcionalidad. Para esto el promotor en estudio se clonó direccionalmente, mediante recombinación, en el vector binario pGWB3. De esta forma, el promotor en estudio regula la expresión del gen reportero GUS. El control positivo para los ensayos de funcionalidad fue el vector binario pCAMBIA13051, mientras que como control negativo se utilizó el vector pGWB3 vacío.

Es importante señalar que el vector pGWB3 y el vector pCAMBIA1305.1 codifican para dos isoformas distintas de la enzima GUS. En los Anexos B y C se presenta el alineamiento aminoacídico y el análisis de los dominios funcionales para ambas isoformas, respectivamente. Dado que se trabajó con dos enzimas distintas, pudieron ocurrir una serie de eventos post traduccionales que potenciasen sus diferencias en desmedro de sus similitudes. A su vez, pudieron existir diferencias en el plegamiento, en la actividad catalítica o cinética, entre otras. Esto podría explicar, en parte, la irregularidad de los ensayos de funcionalidad en plantas infiltradas de *N. benthamiana*.

4.3.2 Análisis funcional del promotor EgCBF-1 mediante transformación transitoria en plantas de *N. benthamiana*

Los resultados obtenidos para los ensayos de transformación transitoria en tabaco no permitieron establecer conclusiones con respecto a la funcionalidad del promotor en condiciones de estrés. Esto se debió principalmente a que el promotor fue capaz de dirigir la expresión del gen reportero en ausencia de estrés (Figura 22 y Figura 23). Dado que la hipótesis a evaluar es que el

promotor se activa selectivamente en condiciones de frío, los ensayos en tabaco estarían poniendo en duda esta hipótesis.

Es importante señalar que la literatura sugiere que el sistema de infiltración de plantas de *N. benthamiana* podría ser un buen modelo para estudiar la funcionalidad del promotor EgCBF-1. Por ejemplo, ensayos de infiltración en *N. benthamiana* con promotores de genes CBF de trigo han verificado la activación del gen reportero GFP exclusivamente en presencia de la proteína ICE de trigo⁷⁵.

Una causa que explicaría los resultados obtenidos, es que las plantas de *N. benthamiana* estuvieran previamente estresadas por algún factor, biótico o abiótico, que no fue identificado. De esta forma, al momento de someter las plantas a los estímulos, estas ya tenían activada la vía de señalización de los genes CBF y por esta razón siempre se observó activación del promotor EgCBF-1. La posible activación del promotor EgCBF-1 mediada por la presencia de algún patógeno se sustenta en que dicho promotor posee tres elementos de respuesta a estrés biótico (Figura 17), por lo tanto el promotor podría ser activado efectivamente a través de esta vía.

Además del comportamiento aparentemente constitutivo del promotor EgCBF-1 en los ensayos de transformación transitoria en plantas de *N. benthamiana*, es importante señalar que no se lograron resultados reproducibles. Esto se manifestó principalmente en el anormal comportamiento del control positivo. El problema puede estar relacionado con la cantidad de *A. tumefaciens* que se infiltró a cada planta. Se observó que incluso, hojas de una misma planta exhiben diferencias en cuanto al volumen de *A. tumefaciens* que son capaces de aceptar. Por lo tanto, la diferencia en la expresión del reportero pudo deberse a que hay hojas que estuvieron en contacto con mayor cantidad de *A. tumefaciens*, y por lo tanto se transformaron con mayor eficiencia. Para minimizar este problema, se uniformó tanto la densidad óptica de todos los cultivos con los que se infiltró, como el volumen a infiltrar. Sin embargo, esta fuente de error debe ser considerada.

El hecho de que para cada tratamiento a evaluar se deban utilizar plantas independientes, agregó una variable de incertidumbre al ensayo. Esto debido a que a pesar de que todas las plantas se cultivaron de la misma forma en el laboratorio, es imposible asegurar que todas ellas tuvieran igual metabolismo, o igual capacidad de ser transformadas, o una vez transformadas, igual capacidad de expresar el gen reportero.

A pesar de lo discutido anteriormente para las pruebas en *N. benthamiana*, la realización del ensayo se justifica y es importante en el contexto general de este trabajo de tesis. Las razones radican principalmente, en que mediante este ensayo fue posible corroborar que la construcción molecular desarrollada fue capaz de dirigir la expresión del reportero. De esta forma se ratificó que la proteína codificada en el vector binario pGWB3 fue traducida en un sistema heterólogo y que corresponde a una proteína funcional. Se probó también que la metodología propuesta para los ensayos de detección

de GUS mediante reacción histoquímica (sección 2.12.3) son compatibles con la actividad ambas isoformas de la enzima GUS utilizadas.

Dado que los resultados obtenidos para los ensayos de transformación transitoria en *N. benthamiana* no permitieron alcanzar resultados concluyentes en cuanto a la hipótesis a evaluar, se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* para realizar nuevos estudios de funcionalidad.

Estos estudios incluyeron la evaluación de la actividad GUS en condiciones de frío y además, de exposición a ABA. Los estudios de la actividad GUS bajo exposición a ABA se realizaron para apreciar si el promotor en estudio puede ser inducido por otros factores, en el caso que la vía activada por los factores de transcripción CBF estuviera siendo bloqueada de alguna manera. Es importante recordar que el análisis bioinformático arrojó que existen cuatro elementos de respuesta a esta hormona (Figura 16).

4.3.3 Análisis funcional del promotor EgCBF-1 en plantas transgénicas de *A. thaliana*

Se transformaron plantas de *A. thaliana* mediante inmersión floral, generando tres líneas transgénicas para el promotor EgCBF-1::GUS, cuatro líneas transgénicas para el vector pGWB3 vacío y seis líneas transgénicas para el vector pCAMBIA 1305.1 vacío. La eficiencia de transformación obtenida fue de un 0,2 % para las líneas del promotor en estudio, 0,48 % para el control negativo y 0,3 % para el control positivo (Tabla 12). Estas eficiencias están levemente bajo el rango descrito en la literatura, que va entre un 0,5 % y un 3 % de eficiencia⁵⁶.

Las plantas de *A. thaliana* transgénicas que poseen el promotor EgCBF-1 regulando la expresión del gen reportero GUS, se sometieron a frío y a ABA para evaluar la funcionalidad del promotor en estudio. No se observó activación del promotor bajo estos estímulos, para ninguna de las tres repeticiones realizadas para cada experimento. Se descartaron problemas con la metodología del ensayo GUS, ya que los controles positivos y negativos se comportaron adecuadamente en todos los experimentos.

Diversas razones podrían explicar la ausencia de actividad GUS en las plantas transgénicas de *A. thaliana*. Una alternativa es que la proteína ICE endógena de *A. thaliana* no es capaz de reconocer los elementos de respuesta en el promotor EgCBF-1 bajo estos estímulos, o que los estímulos de frío y ABA no son capaces de promover las modificaciones post-traduccionales que la proteína ICE requiere para ser activa. Sin embargo, es poca la información que entregan los ensayos GUS para dilucidar la interrogante y aportar al desarrollo de la hipótesis. Por estas razones, se realizaron ensayos de expresión del gen GUS en las plantas transgénicas de *A. thaliana*, con la finalidad de evaluar la expresión del reportero a nivel de mRNA.

4.3.4 Estudios de expresión del gen GUS mediante RT-PCR en plantas transgénicas de *A. thaliana*

Los estudios de expresión para las plantas de *A. thaliana* transformadas con la construcción promotor EgCBF-1::GUS muestran que los transcritos de este gen se acumularon principalmente cuando la planta fue expuesta a 4 °C pero no a ABA. Esto se manifiesta en que para amplificar mediante reacción de PCR el gen GUS, se requirió usar como templado 2 µl directos de cDNA y 45 ciclos de extensión para los ensayos con ABA, mientras que para los ensayos en frío sólo se requirieron 2 µl de cDNA en una dilución 1:10 y 25 ciclos de extensión. Esto indica que existe una acumulación relativa de transcritos mayor del gen GUS en plantas sometidas frío que en las plantas sometidas a ABA.

Para los ensayos en frío, las tres líneas transgénicas evaluadas presentaron una evidente acumulación de transcritos desde los 30 min de exposición a frío (Figura 30 C, Figura 31 C y Figura 32 C). Sin embargo, los puntos máximos de acumulación de transcritos difieren entre la línea transgénica uno y las líneas transgénicas dos y tres. Para la línea transgénica uno, el máximo de acumulación de transcritos se observó a los 60 min de exposición a frío, mientras que para las líneas dos y tres se observó a los 90 min de exposición frío.

En el caso de los ensayos con ABA, las tres líneas transgénicas evaluadas presentaron una evidente acumulación de transcritos desde la primera hora de exposición a ABA (Figura 35 C, Figura 36 C y Figura 37 C). Sin embargo, para las líneas transgénicas uno y dos existen intervalos de tiempo variables en los que no se observaron transcritos. Para la línea transgénica uno sólo se observaron transcritos en los tiempos de tratamiento de 1, 4 y 24 h, para la línea dos en los tiempos 1, 2 y 4 h, mientras que en la línea tres se observaron transcritos en todos los tiempos de tratamiento. Al igual que lo observado para los ensayos en frío, los puntos máximos de acumulación de transcritos difieren entre las líneas transgénicas evaluadas. Para la línea transgénica uno, el máximo de acumulación de transcritos se observó a las 24 h de exposición a ABA, para la línea dos a las 4 h y para la línea tres a las 2 h de exposición a ABA.

Los ensayos de expresión para el gen GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana* permitieron corroborar la presencia de transcritos del gen GUS. Este hecho indica que el promotor EgCBF-1 es capaz de desencadenar la expresión del gen reportero selectivamente en condiciones de estrés, principalmente bajo estímulos de frío. Por lo tanto, a través de los ensayos de RT-PCR se obtuvo una fuerte evidencia que avala la hipótesis planteada. Sin embargo, no aportan información que permita explicar la ausencia de actividad GUS en los ensayos realizados a plantas transgénicas de *A. thaliana*.

La diferencia en los patrones de expresión observados para las tres líneas transgénicas estudiadas puede explicarse por algún tipo de efecto de inserción. Esto porque además de la variabilidad de la expresión inherente a los elementos reguladores presentes en el promotor, los efectos causados por la posición cromosómica de inserción son inciertos, dado el carácter aleatorio de la inclusión del fragmento foráneo en el genoma de *A. thaliana*. Por ejemplo, si la inserción ocurrió en una región de baja actividad transcripcional, probablemente el nivel de expresión será menor que si ocurre en una zona de alta actividad transcripcional. Además, se debe tener en cuenta que la presencia de secuencias reguladoras adyacentes al lugar de inserción también pueden afectar el nivel de expresión.

Se ha reportado que la inserción de DNA foráneo en un genoma incluye la interacción con una muy compleja estructura de la cromatina, que controla la ubicación y accesibilidad de las distintas regiones genéticas de una manera que no se comprende en detalle. Esto se ha hecho evidente en investigaciones que revelan que el envasado de ciertos genes en una matriz cromosómica está regulado por sofisticados mecanismos de remodelación de la cromatina, que son capaces de definir cuándo un gen se convierte en accesible a la maquinaria transcripcional⁷³. De esta forma, el efecto de inserción podría explicar la variación en la expresión del gen GUS en las distintas líneas de plantas transgénicas sometidas a estímulos de frío y ABA.

Por otra parte, la presencia de transcritos y ausencia de actividad proteica, permite inferir que podrían existir componentes post-transcripcionales que interactúan en desmedro de la actividad GUS. Estos componentes post transcripcionales podrían ser de dos tipos principalmente. En primer lugar, y lo más probable, es que se deba al efecto de la transformación de las plantas de *A. thaliana*. La segunda alternativa es que el procesamiento del gen EgCBF-1, regulado por el promotor EgCBF-1, implique intrínsecamente la presencia de modificaciones post transcripcionales. Sin embargo no existe información en la literatura que sustente esta teoría. Por el contrario, ensayos con promotores ortólogos de *A. thaliana*⁷⁴ y trigo⁷⁵ similares al de este trabajo, han logrado dirigir la expresión de genes reporteros funcionalmente activos y selectivamente en condiciones de estrés.

De esta forma, la ausencia de actividad GUS se podría deber a que *A. thaliana* ha impulsado algún mecanismo de silenciamiento post-transcripcional en respuesta a la construcción foránea que ha sido introducida en su genoma. En la literatura se encuentra evidencia que manifiesta que un alto de número de copias de transgenes es capaz de gatillar el silenciamiento génico en plantas transgénicas de *A. thaliana*⁷⁶. Estos ensayos indican que tres copias del gen reportero GUS controlado por el promotor constitutivo CaMV 35S son suficientes para provocar una disminución significativa del nivel de transcritos, hecho que reafirma la teoría del silenciamiento génico o de modificaciones post transcripcionales que desencadenen la degradación de los mensajeros. Por otra parte, en el mismo ensayo se confirma que distintos genes reporteros (GUS, GFP Green fluorescent protein y SPT Streptomycin phosphotransferase) bajo el control del mismo promotor (CaMV 35S), presentan distintos “umbrales” de tolerancia antes de gatillar el silenciamiento génico. El gen

reportero GUS es el que menor número de copias requiere para activar los mecanismos de silenciamiento.

Por estas razones resulta importante determinar el número de copias en que se ha insertado el promotor EgCBF-1::GUS, para las distintas líneas transgénicas, en el genoma de *A. thaliana*.

4.3.5 Determinación del número de copias de la construcción promotor EgCBF-1::GUS en líneas transgénicas de *A. thaliana* mediante *Southern blot*

El análisis de número de copias en que se insertó la construcción promotor EgCBF-1::GUS en el genoma de *A. thaliana*, se realizó mediante la técnica de *Southern blot* (sección 2.14). Los resultados sugieren que todas las líneas transgénicas incorporaron un alto número de copias de la construcción realizada. Para la línea transgénica uno, los resultados señalan que se incorporaron al menos cuatro copias de la construcción desarrollada. Para la línea dos existirían al menos cinco copias, mientras que para la línea tres habrían al menos tres copias del promotor EgCBF-1::GUS.

La diferencia en el número de copias en que se insertó la construcción desarrollada en el genoma de *A. thaliana*, podría explicar las diferencias observadas en los estudios de expresión GUS en estas tres líneas transgénicas. Sin embargo, no sería suficiente para probar la teoría del silenciamiento génico.

Un posible ensayo que podría ayudar a dilucidar la presencia de transcritos y ausencia de actividad GUS, sería el *Western blot*. De esta forma sería posible evaluar si existe proteína GUS y determinar si los transcritos fueron traducidos. La presencia de proteína indicaría que la tesis del silenciamiento génico a nivel post transcripcional es errada y sentaría precedentes para pensar que la proteína GUS traducida no es funcional.

VI. CONCLUSIONES

Se concluye que el contexto económico, asociado a la introducción de *E. globulus* tolerantes a las bajas temperaturas en la industria forestal chilena, es auspicioso. A través de la cadena de valor, se concluye que las condiciones son propicias para el desarrollo cada una de las etapas requeridas. Se concluye que las principales ventajas para el desarrollo de este proyecto son las políticas gubernamentales favorables que incentivan el desarrollo biotecnológico del sector forestal y la consistencia de la industria forestal chilena. Se concluye que las principales desventajas para el desarrollo del proyecto son la carencia de una metodología para la transformación de especies de eucaliptos y la escasez de información a nivel social y legislación relativa al uso de organismos genéticamente modificados.

Se aisló y secuenció el promotor del gen CBF-1 de *E. globulus*, obteniéndose una secuencia de 776 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen, correspondiente al promotor de dicho gen. En este promotor existen, entre otros, cinco sitios de unión al factor de transcripción EgICE-1. Este elemento de respuesta está directamente relacionado con la respuesta a estrés por frío. Se concluye que los sitios de unión al factor de transcripción ICE1 están presentes también en promotores de genes ortólogos al promotor EgCBF-1. La existencia de estos elementos de respuesta permite concluir que, desde el punto de vista estructural, el promotor EgCBF-1 es potencialmente controlado por frío.

En cuanto a la funcionalidad del promotor, se concluye que el promotor EgCBF-1 es capaz de desencadenar la expresión del gen reportero GUS, selectivamente en condiciones de estrés. Lo anterior se probó mediante RT-PCR en plantas transgénicas de *A. thaliana*, transformadas con el gen reportero bajo el control del promotor EgCBF-1. De esta forma, se concluye que la hipótesis propuesta en el presente trabajo de tesis, fue probada.

Se concluye que la transformación transitoria de plantas de *N. benthamiana*, como método para probar la funcionalidad del promotor, no es un buen sistema. Esto debido a la aparente expresión constitutiva del gen reportero GUS, bajo el control del promotor EgCBF-1.

No se logró evaluar la funcionalidad del promotor EgCBF-1 mediante ensayos de actividad GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Esto porque en ningún caso fue posible detectar la actividad del reportero.

Se determinó que el gen reportero GUS, bajo la regulación del promotor EgCBF-1, se insertó en el genoma de *A. thaliana* en un número alto y variable de copias para las 3 líneas transgénicas evaluadas. Por esta razón, la presencia de transcritos y ausencia de actividad GUS hace presumir que *A. thaliana* gatilló un mecanismo de silenciamiento post transcripcional en respuesta al DNA foráneo introducido en su genoma.

VII. ANEXOS

A. Protocolos adicionales

A.1 Preparación de Células competentes de *E. coli*

Se cultivaron células de *E. coli* cepa NovaBlue en medio LB (100 µl de células en 5 ml de medio) durante toda la noche a 37 °C con agitación constante. Al día siguiente se agregó este cultivo bacteriano a 500 ml de medio LB, incubándose a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,6-0,8. El cultivo se centrifugó a 3500 xg por 10 min a 4 °C y las células se resuspendieron en 250 ml de NaCl 10 mM frío. Las células se centrifugaron nuevamente en las condiciones antes descritas y luego se resuspendieron en 250 ml de $CaCl_2$ 75 mM. El cultivo se mantuvo en hielo durante 30 min para posteriormente ser centrifugado. Las células se resuspendieron en 60 ml de $CaCl_2$ 75 mM y glicerol 15 % v/v, a 4 °C, manteniéndose en hielo por 3 h, distribuyéndose posteriormente en tubos Eppendorf estériles. A continuación los tubos se congelaron rápidamente en hielo seco con etanol y se almacenaron a -80 °C⁷⁷.

A.2 Preparación de Células competentes de *A. tumefaciens*

Se creció un cultivo bacteriano de 3 ml hasta su fase logarítmica (aproximadamente 36 h) a 28 °C en medio LB con antibióticos apropiados. Se inocularon 2 ml de éste cultivo en 50 ml de medio LB fresco y se creció a 28 °C hasta obtener una DO_{600nm} de 0,5. Una vez alcanzada ésta densidad óptica, las bacterias se enfriaron en hielo por 10 min y luego se centrifugaron a 3000 xg por 5 min. Luego las bacterias se resuspendieron en 1 ml de $CaCl_2$ 20 mM y se prepararon alícuotas de 200 µl en tubos de 1,5 ml preenfriados. Finalmente los tubos se almacenaron a -80 °C⁷⁸.

A.3 Transformación de células competentes de *E. coli*

Se mezclaron 100 µL de células competentes con 5-10 µL de un vector recombinante. Esta mezcla se dejó en hielo por 30 min, siendo posteriormente incubada a 42 °C por 1 min, luego del cual se vuelve a colocar en hielo por otros 2 min. A continuación se agregó 1 ml de medio de crecimiento SOC, y se mantuvo en agitación constante por 1 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, la suspensión se centrifugó a 10000 xg por 1 min, descartándose casi por completo el sobrenadante, dejando aproximadamente 200 µL de medio para permitir la resuspensión de las bacterias. Las bacterias se siembran en placas de LB-agar que contienen un antibiótico de selección pertinente al vector en uso, Amp 50 µg/ml para pGEM-T Easy. Se realiza además una selección por alfa complementación, agregando 20 µl de X-GAL 50 mg/ml y 10 µl de IPTG 1M⁷⁹.

B. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de las proteínas GusPlus-His 6 y GusA

Dos puntos [:] significa sustitución conservada, mientras que un punto [.] significa sustitución semi conservada.

| | | | |
|---------|-----|---|-----|
| gusPlus | 1 | MVDLRNRRTSLYPINTETRGVFDLNGVWNFKLDYGK-GLEEKWYESKLTD | 49 |
| gusA | 1 | MLRPVETPTREIKKLDGLWAFSLDRENCGIDQRWWESALQE | 41 |
| gusPlus | 50 | TISMAVPSSYNDIGVTKEIRNHIGYVWYEREFYTPAYLKDQRIVLRFSGA | 99 |
| gusA | 42 | SRAIAVPGSFNDQFADADIRNYAGNVVYQREVFIKQWAGQRIVLRFDAV | 91 |
| gusPlus | 100 | THKAIVYVNGELVVEHKGFLPFEAIEINNSLRDGMN-RVTVAVDNILDDS | 148 |
| gusA | 92 | THYGVVWNNQEVMEHQGQYTPFEADVTPYVIAGKSVRITVCVNNELNQW | 141 |
| gusPlus | 149 | TLPVGLYSERHEEGLGVIRNKPNE--DFFNAGLHRPVKITYTTPFTYVE | 196 |
| gusA | 142 | TIPPGMVI-TDENG-----KQKSYFHDFFNYAGIHRVSVMLYTTTPTWVD | 185 |
| gusPlus | 197 | DISVVT----DFNGPTGTVTYTVDVQKGAE-TVKVSVDDEEGKVASTEG | 241 |
| gusA | 186 | DITVVTHVAQDCNHA-----SVDWQVAVANGDVSVELRDADQQVAVATGQG | 229 |
| gusPlus | 242 | LSGNVEIPNVILWEPLNTYLYQIKVELVNDGLTIDVYEEPPGVRTVEVND | 291 |
| gusA | 230 | TSGLTQVVNPHLWQPGEGYLYELCV-TAKSQTECDIYPLRVGIRSVAVKG | 278 |
| gusPlus | 292 | GKFLINNKPFYFKGFGKHEDTPINGRGFNEASVMDFNILKWIANSFRT | 341 |
| gusA | 279 | EQFLINHKNPFYFTGFGRHEDADLRGKGFVNLVMDVHDMWIGANSYRT | 328 |
| gusPlus | 342 | AHYPYSEELMRLADREGLVVIDETPAVGVHILNFMATGLGEGSERVSTWE | 391 |
| gusA | 329 | SHYPYAEEMLDWADEHGIIVVIDETAAVGFNLSLGLGFAGNKPKEYLSEE | 378 |
| gusPlus | 392 | KI--RTFEHHQDVLRELVSRLDKNHPSVVMWSIANEAATEEEGAYEYFKPL | 439 |
| gusA | 379 | AVNGETQQAHLQAIAKELIARDKNHPSVVMWSIANEPDTRPQGAREYFAPL | 428 |
| gusPlus | 440 | VELTKELDPQKRPVTIVLVMATPETDKVAELIDVIALNRYNGWYFDGGD | 489 |
| gusA | 429 | AEATRKLDP-TRPITCVNMFCDAHTDTISDLFDVLCNLNRYNGWYVQSGD | 477 |
| gusPlus | 490 | LEAAKVHLRQEFHAWNKRCPGKPIMITEYGADTVAGFHIDPVMFTEEYQ | 539 |
| gusA | 478 | LETAEKVLEKELLAWQEKL-HQPIIITEYGVDTLAGLHSMYTMWSEEYQ | 526 |
| gusPlus | 540 | VEYYQANHVVFDEFENFVGEQAWNFAFATSQGVMRVQGNKKGVFTRDRK | 589 |
| gusA | 527 | CAWLDMYHRVDFRVSAVVGQVWNFAFATSQGILRVGGNKKGIFTRDRK | 576 |
| gusPlus | 590 | PKLAAHVFRERWTNI-----PDFGYKNASHHHHHHV | 620 |
| gusA | 577 | PKSAAFLQKRWTGMNFGEKPKQQGGKQ | 603 |

C. Análisis de dominios conservados en proteínas GusPlus-His 6 y GusA

En la Tabla 13 se presenta el análisis de las regiones conservadas de las proteínas, que fue realizado utilizando la información entregada por el programa InterPro Scan.

| N° InterPro | Clasificación | Dominios | N° Dominios | |
|-------------|---|----------------------|-------------|----------|
| | | | GusPlus | GusA |
| IPR006101 | Glycoside hydrolase, family 2 | GLHYDRLASE2 4 | 4 | 5 |
| | | GLYCOSYL_HYDROL_F2_2 | 1 | 1 |
| | | GLYCOSYL_HYDROL_F2_1 | 1 | 1 |
| IPR006102 | Glycoside hydrolase family 2, immunoglobulin-like beta-sandwich | Glyco_hydro_2 | 1 | 1 |
| IPR006103 | Glycoside hydrolase family 2, TIM barrel | Glyco_hydro_2_C | 1 | 1 |
| IPR006104 | Glycoside hydrolase family 2, carbohydrate-binding | Glyco_hydro_2_N | 1 | 1 |
| IPR013781 | Glycoside hydrolase, catalytic core | Sin descripción | 1 | 1 |
| IPR013812 | Glycoside hydrolase, families 2 and 20, immunoglobulin-like beta-sandwich | Sin descripción | 1 | 1 |

Tabla 13: Análisis de regiones conservadas en proteínas GUS

El análisis arrojó como resultado, que ambas proteínas pertenecen a la misma familia (glicosil hidrolasas) y que poseen una alta homología en sus dominios conservados.

Es más, la única diferencia entre las proteínas, es que la proteína GusA posee un dominio adicional, en comparación a la proteína GusPlus-His6.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Gamboa MC, Rasmussen-Poblete S, Valenzuela PD and Krauskopf E. (2007) Isolation and characterization of a cDNA encoding a CBF transcription factor from *E. globulus*. *Plant Physiology Biochemistry* 45(1):1-5.
- ² Instituto Forestal de Chile (INFOR) (2003), Estadísticas 2003
- ³ Instituto Forestal de Chile (INFOR) (2003) Desarrollo de Opciones Productivas de Mayor Valor para Plantaciones de *Eucalyptus nitens* en la IX y X Región, Proyecto FDI-CORFO
- ⁴ Instituto Forestal de Chile (INFOR) (2000) Captura de Genotipos para el Desarrollo de una raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío, Proyecto Fondef D00I1036.
- ⁵ Consultative Group on International Agricultural Research, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2003) Applications of Molecular Biology and Genomics to Genetic Enhancement of Crop Tolerance to Abiotic Stress. Discussion Document, Annex II.
- ⁶ Langridge P, Paltridge N and Fincher G (2006) Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Genomic Proteomic* 4:343-54.
- ⁷ Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 571–599.
- ⁸ Heino P and Palva ET (2003) Signal transduction in plant cold acclimation. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 151–186.
- ⁹ Welling A, Moritz T, Palva ET and Junttila O (2002) Independent activation of cold acclimation by low temperature and short photoperiod in hybrid aspen. *Plant Physiology* 129: 1633–1641.
- ¹⁰ Welling A and Tapio Palva E (2006) Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiologia Plantarum* 127: 167–181.
- ¹¹ Coleman GD, Chen THH, Ernst SG and Fuchigami L (1991) Photoperiod control of poplar bark storage protein accumulation. *Plant Physiology* 96: 686–692.
- ¹² Sauter JJ and Wellenkamp S (1998) Seasonal changes in content of starch, protein and sugars in the twig wood of *Salix caprea* L. *Holzforschung* 52: 255–262.
- ¹³ Stitt M and Hurry V (2002) A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Biology* 5: 199–206.
- ¹⁴ McCourt P (1999) Genetic analysis of hormone signaling. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 219–243.
- ¹⁵ Xiong L, Schumaker KS and Zhu J-K (2002) Cell signaling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell* 14: 165–183.
- ¹⁶ Rinne P, Welling A and Kaikuranta P (1998) Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA deficient genotype. *Plant, Cell and Environment* 21: 601–611.
- ¹⁷ Lang V, Mäntylä E, Welin B, Sundberg B and Palva ET (1994) Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 104: 1341–1349.
- ¹⁸ Vaultier M, Cantrel C, Vergnolle C, Justin A, Demandre C, Benhassaine-Kesri G, Çiçek D, Zachowski A and Ruelland E (2006) Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells. *FEBS Letters* 580: 4218–4223.

-
- ¹⁹ Komatsu S, Yang G, Khan M, Onodera H, Toki S and Yamaguchi M (2007) Over-expression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants. *Molecular Genetics and Genomics* 227: 713–723.
- ²⁰ Xiong L, Ishitani M, Lee H and Zhu J-K (2001) The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13: 2063–2083.
- ²¹ Lee B-H, Lee H, Xiong L and Zhu J-K (2002) A mitochondrial complex I defect impairs cold regulated nuclear gene expression. *Plant Cell* 14: 1235–1251.
- ²² Hannah M.A, Wiese D, Freund S, Fiehn O, Heyer A. G and Hinch D. K (2006) Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142: 98–112.
- ²³ Van Buskirk HA and Thomashow MF (2006) *Arabidopsis* transcription factors regulating cold acclimation. *Plant Physiology* 126: 72–80.
- ²⁴ Pearce R. (1999) Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation* 29: 47-76.
- ²⁵ Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM and Thomashow MF (1998) Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant Journal* 16: 433-42.
- ²⁶ Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y and Shinozaki K (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61-72.
- ²⁷ Lee BH, Henderson DA and Zhu J-K (2005) The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* 17: 3155–3175.
- ²⁸ Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee B-H, Hong X, Agarwal M and Zhu J-K (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 17: 1043–1054.
- ²⁹ Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirn V, Miura T, Ashworth EN, Bressan RA, Yun D-J and Hasegawa PM (2007) SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* DOI: 10.1105/tpc.106.048397.
- ³⁰ Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q and Zhu JK (2006) The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 103(21): 8281-8286.
- ³¹ Menkens A.E, Schindler U and Cashmore A.R. (1995) The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochemistry Science* 20: 506–510.
- ³² Hobo T, Asada M, Kowyama Y and Hattori T (1999) ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant Journal* 19: 679–689.
- ³³ Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD and Walker-Simmons MK (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiology* 130: 837–846.
- ³⁴ Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251–264.
- ³⁵ Massari ME and Murre C (2000) Helix–loop–helix proteins: regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Molecular Cell Biology* 20: 429–440.
- ³⁶ Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review Plant Biology* 53: 247–273.

-
- ³⁷ Shen Q and Ho TH (1995) Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell* 7: 295–307.
- ³⁸ Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63–78.
- ³⁹ Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1994) A novel *cis*-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251–264.
- ⁴⁰ Stockinger EJ, Gilmour SJ and Thomashow MF (1997) Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 94: 1035–1040.
- ⁴¹ Jiang C, Iu B and Singh J (1996) Requirement of a CCGAC *cis*-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter Brassica napus. *Plant Molecular Biology* 30: 679–684.
- ⁴² Zarka DG, Vogel JT, Cook D and Thomashow MF (2003) Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiology* 133: 910–918.
- ⁴³ Chinnusamy V, Zhu J and Zhu JK (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants, *Trends Plant Science* (12)10: 444–451.
- ⁴⁴ Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T and Thomashow MF (2001) Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology* 127: 910–917.
- ⁴⁵ Pino M-T, Skinner J, Park E, Jeknić Z, Hayes P, Thomashow MF and Chen T (2007) Use of a stress inducible promoter to drive ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. *Plant Biotechnology Journal* 5(5): 591–604.
- ⁴⁶ Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC and Chan MT (2002) Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology* 129: 1086–1094.
- ⁴⁷ Kasuga M, Miura S, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2004) A Combination of the Arabidopsis DREB1A Gene and Stress-Inducible *rd29A* Promoter Improved Drought- and Low-Temperature Stress Tolerance in Tobacco by Gene Transfer. *Plant Cell Physiology* 45(3): 346–350.
- ⁴⁸ OLIGO 4.1. Primer analysis software, National Biosciences Inc. ©1989-92
- ⁴⁹ Stange C, Prehn D and Arce-Johnson P (1998) Isolation of *Pinus radiata* genomic DNA suitable for RAPD analysis. *Plant Molecular Biology Report* 1:1-8.
- ⁵⁰ Sanger F and Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* (94)3: 441-446.
- ⁵¹ Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang, Miller W and Lipman D (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- ⁵² Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M and Korenaga T (1999) Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* (27)1: 297-300.
- ⁵³ Shahmuradov IA, Gammerman AJ, Hancock JM, Bramley PM and Solovyev VV (2003) PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Research* 31(1): 114-117.

-
- ⁵⁴ BIOBASE, Biological Database, TRANSFAC 7.0 Public
Página Web: <http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>
Última visita: 09.08.07
- ⁵⁵ GENOMATIX
Página Web: <http://www.genomatix.de>
Última visita: 09.08.07
- ⁵⁶ Clough S and Bent A (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* – mediated transformation of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 16: 734-743.
- ⁵⁷ Knight H, Zarka D, Okamoto H, Thomashow MF and Knight M (2004) Abscisic Acid Induces CBF Gene Transcription and Subsequent Induction of Cold-Regulated Genes via the CRT Promoter Element. *Plant Physiology* 135:1710-1717.
- ⁵⁸ Jefferson RA, Kavanagh TA and Bevan MW (1987) Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.
- ⁵⁹ Corporación chilena de la madera (CORMA), MAILING EJECUTIVO / Biotecnología Forestal: La Llave de la Competitividad Futura (año 9, n° 2)
- ⁶⁰ Mercado Forestal N° 32 Enero-Marzo 2008, Unidad de Economía y Mercado, Sede Metropolitana INFOR
- ⁶¹ Ministerio de Agricultura, Agencia MINAGRI 23.07.08
- ⁶² Corporación chilena de la madera (CORMA), Recurso Forestal/Antecedentes generales
- ⁶³ Arborgen www.arborgen.com, Última visita: 03.08.08
- ⁶⁴ Wei L, Pordesimo L, Igathinathane C, Batchelor W (2008) Process engineering evaluation of ethanol production from wood through bioprocessing and chemical catalysis, *Biomass and Bioenergy* doi:10.1016/j.biombioe.2008.05.017
- ⁶⁵ Oksman-Caldentey KM and Barz W (2002) *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*, CRC Press 9: 201-232
- ⁶⁶ “Informe al Presidente de la República”, Comisión Nacional para el desarrollo de la Biotecnología, Junio del 2003
- ⁶⁷ Corporación chilena de la madera (CORMA), Temas de interés/Patrimonio forestal: “*Eucalyptus nitens*: protagonismo merecido”
- ⁶⁸ “Prospectiva Chile 2010: Biotecnología aplicada a la Industria forestal” Programa de Prospectiva tecnológica Chile Innova, Ministerio de Economía, 2001.
- ⁶⁹ Manual Instructivo sobre Certificación Forestal; INFOR, Grupo de Medio Ambiente, Diciembre 2000
- ⁷⁰ Greenpeace <http://www.greenpeace.org/espana/campaigns/transgenicos> Última visita: 03.08.08
- ⁷¹ Leyman B, Avonce N, Matthew R, Van Dijck P, Iturriaga G and Thevelein J (2005) Trehalose-6-phosphate synthase as an intrinsic selection marker for plant transformation, *Journal of Biotechnology* 121:3: 309-317.
- ⁷² El Kayal W, Navarro M, Marque G, Keller G and Teulieres C (2006) Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. *Journal of Experimental Botany* 57:10: 2455-2469.
- ⁷³ Meyer P (2000) Transcriptional transgene silencing and chromatin components. *Plant Molecular Biology* 43(2-3):221-34.

-
- ⁷⁴ Novillo F, Medina J and Salinas J (2007) *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* (104)52: 21002-21007
- ⁷⁵ Badawi M, Venkat Y, Agharbaoui Z, Tominaga Y, Danyluk J, Sarhan F and Houde M (2008) Structure and functional analysis of wheat ICE (Inducer of CBF Expression) genes. *Plant and Cell Physiology Advance Access* published July 16, 2008
- ⁷⁶ Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S and Schmidt R (2004) Silencing in *Arabidopsis* T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. *Plant Cell* 16: 2561-2572.
- ⁷⁷ Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition.
- ⁷⁸ Chen H, Nelson R and Sherwood J (1994) Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotech.* 16: 664-669.
- ⁷⁹ Inoue H, Nojima H and Okayama H (1991) High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene* 30: 96: 23-28.