



**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN TIPO-CBF DE *EUCALYPTUS*
GLOBULUS”**

Memoria de título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MARÍA CECILIA GAMBOA GARRIDO

Director de la Memoria de Título

Dr. Pablo Valenzuela Valdés

Firma manuscrita en azul de Pablo Valenzuela Valdés sobre una línea horizontal.

Dr. Erwin Krauskopf Poblete

Firma manuscrita en azul de Erwin Krauskopf Poblete sobre una línea horizontal.

Dr. Mario Roseblatt Silber

Firma manuscrita en azul de Mario Roseblatt Silber sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Liliana Cardemil
Presidenta de la Comisión

Firma manuscrita en azul de Liliana Cardemil sobre una línea horizontal.

Dr. Michael Handford

Firma manuscrita en azul de Michael Handford sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Agosto 2005



VCH.FC
Biotecnología
G 187
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO**



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN TIPO-CBF

(C-Repeat Binding Factor) DE *EUCALYPTUS GLOBULUS*

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

María Cecilia Gamboa Garrido

Directores de Memoria: Dr. Pablo Valenzuela Valdés

Dr. Erwin Krauskopf Poblete

Profesor patrocinante: Dr. Mario Roseblatt Silber

FUNDACIÓN CIENCIA PARA LA VIDA

Santiago, Chile 2005



Hace exactamente 10 años yo ingresaba a la Universidad de Chile a esta hermosa, difícil y en ese momento desconocida carrera. Tenía 18 años, acababa de salir del colegio y ya llevaba 2 años pololeando con la persona que hoy es mi marido y el papá de nuestro hijo, Cristiancito. Mi interés siempre estuvo relacionado con la ciencia, especialmente con el área vegetal y aunque siempre pensé que iba a ser agrónoma, terminé siendo Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Hoy después de muchos esfuerzos, horas de estudio, experiencias nuevas y gratificantes, después de muchos altos y bajos finalmente se cierra este capítulo, pero a la vez comienza una nueva etapa, la cual me enorgullece y estimula a seguir creciendo en este particular estilo de vida de hacer ciencia.

En este minuto trabajo en lo que siempre quise, investigación y desarrollo en el área vegetal y espero que esto sea el comienzo de una larga y fructífera carrera científica.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Fundación Ciencia Para la Vida por haberme dado las oportunidades necesarias para terminar esta tesis, especialmente al Dr. Pablo Valenzuela y al Dr. Mario Roseblatt. Además quiero agradecer al Dr. Erwin Krauskopf por su guía, ayuda y por ser un buen amigo; a Esteban Engel y a Consuelo Bruno por su colaboración y buenas ideas; a Andrea González por su buena voluntad y a Sebastián Valenzuela por su amistad y por alegrarme el día a día.

También quiero agradecer a cada uno de mis compañeros y muchos de ellos amigos por hacer más grato el trabajo diario en este largo proceso.

Finalmente mis mayores agradecimientos son para mi familia: mi papá, mi mamá, Cristian y mi pequeño hijo por su gran paciencia y ayuda y porque sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE FIGURA Y TABLAS	vi
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cultivo de <i>Eucalyptus</i>	1
1.2 Estrés abiótico en plantas	3
1.3 Factores de transcripción, genes CBF (C-Repeat Binding Factor)	5
1.4 Hipótesis	10
1.5 Objetivo general	10
1.6 Objetivos específicos	10
2. MATERIALES Y METODOS	11
2.1 Reactivos y enzimas	11
2.2 Cepas bacterianas	11
2.3 Medios de cultivo	11
2.4 Antibióticos	12
2.5 Material vegetal y condiciones de crecimiento	12
2.6 Desinfección, germinación de semillas y cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
2.6.1 Mezcla de tierra para el cultivo de plantas	13

2.28	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.29	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante inmersión floral	26
2.30	Selección de semillas transformadas	26
2.31	Análisis de secuencias	27
3.	RESULTADOS	28
3.1	Aislamiento de un gen CBF de <i>Eucalyptus globulus</i>	28
3.1.1	Aislamiento de un gen CBF de <i>Eucalyptus globulus</i> a partir de ADN complementario	28
3.1.2	Obtención de los extremos del gen CBF de <i>Eucalyptus globulus</i>	29
3.1.3	Aislamiento del gen CBF de <i>Eucalyptus globulus</i> a partir de ADN genómico	32
3.2	Análisis bioinformático	33
3.2.1	Análisis de la secuencia del gen <i>EgCBF</i>	33
3.2.2	Análisis de los dominios de la proteína <i>EgCBF</i>	39
3.2.3	Árbol filogenético	36
3.3	Caracterización del gen CBF de <i>Eucalyptus globulus</i>	41
3.3.1	Copias del gen <i>EgCBF</i> dentro del genoma de <i>Eucalyptus globulus</i>	41
3.3.2	Estudio de la expresión del gen <i>EgCBF</i>	43
3.3.3	Estrategia de clonamiento del vector binario pBIN19 con el gen <i>EgCBF</i> bajo el promotor fuerte CaMV 35S	42
3.3.4	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> y selección de semillas transgénicas	49
4.	DISCUSIÓN	55
5.	CONCLUSIONES	63
6.	PROYECCIONES Y TRABAJO FUTURO	63
7.	REFERENCIAS	64

2.6.2	Cultivo de plantas	13
2.7	Mantenimiento y crecimiento de cepas bacterianas	14
2.8	Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> Novablue	14
2.9	Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> Novablue	14
2.10	Vectores	15
2.11	Purificación de ADN plasmidial	16
2.12	Digestión de ADN mediante endonucleasas de restricción	17
2.13	Desfosforilación de ADN	17
2.14	Ligación de fragmento de ADN	17
2.15	Purificación de fragmentos de ADN de un gel	18
2.16	Partidores	18
2.17	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
2.18	Purificación del ADN amplificado mediante PCR	20
2.19	Preparación de ARN total de <i>Eucalyptus globulus</i>	20
2.20	Transcripción reversa	21
2.21	Obtención de los extremos del gen <i>EgCBF</i> mediante 5' y 3' RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)	21
2.22	Preparación de ADN genómico de <i>Eucalyptus globulus</i>	22
2.23	Preparación de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.24	Análisis de ADN y ARN mediante electroforesis en geles de agarosa	23
2.25	Preparación de la sonda radiactiva	23
2.26	<i>Southern blot</i>	23
2.27	Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	25

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Esquema del proceso de percepción y transducción de señal involucrado en el estrés abiótico	8
Figura 2	Vectores utilizados durante el desarrollo de esta memoria	16
Figura 3	Amplificación del gen CBF de <i>E. globulus</i> mediante PCR a partir de ADN complementario	30
Figura 4	Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la región codificante del gen CBF de <i>E. globulus</i>	31
Figura 5	Amplificación del gen CBF de <i>E. globulus</i> mediante PCR a partir de ADN genómico	32
Figura 6	Secuencia y dominios de la proteína CBF de <i>E. globulus</i>	34
Figura 7	Alineación de diferentes proteínas CBF	3
Figura 8	Alineación correspondiente al extremo carboxilo terminal de diferentes proteínas CB	38
Figura 9	Relación filogenética generada a partir de secuencias aminoacídicas de las proteínas CBF	40
Figura 10	Análisis de ADN genómico de <i>E. globulus</i> con la sonda <i>EgCBF</i>	42
Figura 11	Análisis electroforético de ARN y de la expresión del gen <i>EgCBF</i> en plantas de <i>E. globulus</i> sometidas a diferentes tipos de estrés abióticos	45
Figura 12	Estrategia de construcción del vector binario pBIN19 con el gen <i>EgCBF</i>	47
Figura 13	Confirmación de la integridad del constructo promotor CaMV 35S/ <i>EgCBF</i> /ter CaMV 35S en PUCpSS y en pBIN19	48
Figura 14	PCR del gen <i>EgCBF</i> a partir del vector binario pBIN19 transformado	50
Figura 15	Selección de semillas	50

Figura 16	Análisis mediante PCR de plantas transgénicas	52
Figura 17	Plantas de <i>A. thaliana</i> silvestres y transformadas	53
Tabla 1	Descripción de plasmidios utilizados en este trabajo	15
Tabla 2	Partidores	19
Tabla 3	Relación de identidad de secuencias CBF de diferentes especies	36
Tabla 4	Recuento de transformación de <i>A. thaliana</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
BrEt	Bromuro de etidio
CTAB	Bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio
DO	Densidad óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EgCBF</i>	Gen CBF de <i>Eucalyptus globulus</i>
EDTA	Acido etilen-diaminotetraacético
Gen	Gentamicina
g	Fuerza de gravedad
H ₂ O	Agua
h	Hora
IPTG	Isopropil tio-β-D-galactósido
Kan	Kanamicina
kb	Kilobases
mL	Mililitro
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
mM	Milimolar
MS	Medio Murashige-Skoog

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVP	Polivinilpirrolidona
Rif	Rifampicina
RNA	Acido ribonucleico
seg	Segundos
TAE	Amortiguador Tris-acetato-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Temperatura de hibridización
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad
µg	Microgramo
µL	Microlitro
UV	Ultravioleta
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

RESUMEN

Las proteínas CBF pertenecen a una pequeña familia de factores de transcripción que juegan un papel importante en la capacidad que tienen las plantas de tolerar distintos tipos de estrés abiótico. Se ha demostrado que las proteínas CBF1, CBF2 y CBF3 de *Arabidopsis thaliana* están involucradas en la tolerancia a bajas temperaturas. Estas proteínas que poseen una relativa homología, desencadenan, una serie de eventos que permite que la planta sobreviva a bajas temperaturas. Los genes CBF han sido descritos en especies como maíz, arroz y trigo, cumpliendo en todas ellas una función similar.

En el desarrollo de este trabajo se aisló un gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus*, especie forestal de gran importancia comercial en nuestro país. El gen aislado posee una región codificante de 672 pares de bases correspondientes a 223 aminoácidos, encontrándose en esta secuencia un dominio de unión al ADN, denominado AP2, una secuencia de localización nuclear y la secuencia señal CBF.

Los resultados obtenidos indican que el gen *EgCBF* está presente en más de una copia en el genoma de *Eucalyptus globulus*. Experimentos de expresión de este gen bajo diferentes condiciones de estrés medioambiental demostraron un aumento de su expresión cuando la planta es expuesta a bajas temperaturas con un nivel máximo a los 30 minutos de tratamiento a 4°C.

Para comenzar a estudiar la función del gen *EgCBF*, se transformó *Arabidopsis thaliana*, con un vector binario conteniendo este gen bajo el promotor CaMV 35S. Se confirmó el carácter transgénico de las plantas por su resistencia a kanamicina y por la amplificación del gen *EgCBF* a partir de ADN genómico de *A. thaliana*. La generación T1 de plantas transgénicas presentó un tamaño menor con respecto a plantas control, las cuales se mantendrán en condiciones de crecimiento hasta obtener la generación de plantas T3, en las cuales se realizarán los experimentos fenotípicos de resistencia al frío.

SUMMARY

Plants can tolerate abiotic stress due to a small family of transcription factors known as CBF proteins. The over expression of CBF genes in *Arabidopsis thaliana* results in an increased tolerance to freezing temperatures, water deficit and high salinity. It has been shown that *Arabidopsis thaliana* CBF1, CBF2 and CBF3 proteins are involved in the tolerance to low temperature. These highly similar proteins trigger, independently, a series of events that allow the plants to survive to low temperature. These CBF genes have been described in many plant species including tomato, maize, rice and wheat.

During this project, a CBF-like gene was isolated from *Eucalyptus globulus*, one of the most commercially important forestry species. This gene has a coding region of 672 base pairs that encode 223 amino acids. Within the protein sequence there is a DNA binding domain, named AP2, a nuclear localization signal and a CBF signature sequence. The results obtained showed that this *EgCBF* gene is present in more than one copy within the *Eucalyptus globulus* genome. Expression studies of this gene under different environmental stress conditions showed an increased expression when the plant was exposed to low temperature, with an expression peak at 30 min of cold exposure.

As a first approach to establish the function of this gene, *Arabidopsis thaliana* was transformed with a binary vector containing *EgCBF* under the control of CaMV 35S. Transgenic plants were confirmed by their resistance to kanamycin and by the amplification of *EgCBF* from *A. thaliana* genomic DNA. The T1 transgenic plants produced showed a reduction in their rate of growth. Currently, the transgenic plants are being grown in order to collect seeds from T2 and T3 plants in order to confirm their cold resistant phenotype.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Cultivo de *Eucalyptus*

Más de 600 son las especies de eucaliptos reconocidas en el mundo. Éstas se ubican principalmente en Australia, al sureste del continente, y en la isla de Tasmania, donde crecen asociadas a especies que pertenecen a la familia botánica de los robles y coigües (*Nothofagus*).

En el año 2002 las plantaciones de *Eucalyptus* en Chile alcanzaron las 387000 hectáreas, de éstas el 80% corresponden a *E. globulus* y el 20% a *E. nitens* (INFOR, 2003), siendo éstas las dos especies de *Eucalyptus* cultivadas en nuestro país a nivel comercial. El *Eucalyptus* presenta ventajas comparativas respecto a otras especies forestales, tales como su mayor tasa de crecimiento, adaptabilidad y calidad de su madera, las cuales lo hacen una especie muy atractiva para el desarrollo comercial. El mercado generado alrededor de la producción de *Eucalyptus*, se ha incrementado en los últimos años. De esta manera, se ha establecido que los requerimientos de madera pulpable aumentará radicalmente desde 4,6 millones de metros cúbicos en el año 2003 a 7,4 millones de metros cúbicos para el año 2010, correspondiendo de esta última cifra 4,4 millones a *Eucalyptus globulus* solamente (INFOR, 2003). Esta variedad es la especie forestal que se utiliza principalmente en la producción forestal en Chile ya que presenta ventajas comparativas con respecto a *E. nitens* en relación con la calidad de la celulosa producida. *E. globulus* se utiliza como materia prima en la producción de celulosa de fibra corta, material apto para la fabricación de papeles de impresión y elaboración de pulpa. Sin embargo, esta variedad presenta una gran limitación en su producción comercial debido a su poca tolerancia a la sequía prolongada y a las bajas temperaturas, sobre todo en árboles jóvenes menores de 2 años, lo cual restringe la disponibilidad de los terrenos aptos para el desarrollo de esta plantación. Es por estas

razones que al analizar la distribución por regiones de las hectáreas destinadas a la producción forestal de *Eucalyptus*, se puede apreciar que ésta se concentra principalmente entre la octava y novena región de nuestro país, mientras que en la zona norte prácticamente no hay un desarrollo forestal comercial.

Debido a la sensibilidad de *E. globulus* a temperaturas bajo 0°C y a periodos de sequías prolongadas se provocan pérdidas importantes a los productores forestales, en años que son particularmente fríos o secos.

Todas estas características, hacen sumamente interesante desarrollar una investigación sobre una posible vía de tolerancia frente a los cambios medioambientales que pudiese tener esta especie. Los resultados en este campo, en los que este estudio constituye un importante aporte inicial, podrían constituir un aporte en la recuperación de terrenos marginales, degradados o en franco proceso de desertificación, como también en la incorporación de zonas precordilleranas y terrenos del Norte de Chile.

La manipulación genética de especies leñosas presenta ciertas dificultades tales como largos ciclos reproductivos y tiempos de regeneración, por lo cual el desarrollo de un sistema *in vitro* para realizar estudios bajo condiciones de laboratorio controladas y el desarrollo de un sistema de transformación han centrado grandes esfuerzos el último tiempo. Recientemente se publicó una patente (EP1050209A2) donde se describe un método de transformación, además de un estudio donde se describe la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* de segmentos nodales de *Eucalyptus* cultivados *in vitro* (Spokevicius y col. 2005), lo cual constituye un importante avance en el área de investigación forestal.

1.2 Estrés abiótico en plantas

El medioambiente presenta condiciones estresantes para las plantas tales como sequía, alta salinidad y frío, las cuales causan grandes daños en la producción de los cultivos alrededor del mundo. Aunque hay diferentes tipos de estrés, 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 esto el causante del daño fisiológico que sufre la planta llegando a causar la muerte de los cultivos en casos extremos de estrés abióticos. Al ser las plantas inmóviles es fundamental la forma en que responden a los cambios medioambientales, los cuales generalmente son desfavorables para ella, es así como los procesos de adaptación que desarrollan las plantas son muy importantes para su sobrevivencia.

En las últimas décadas se han publicado numerosos trabajos, en los cuales se describen genes de plantas que son inducidos por sequía, salinidad y frío (Shinozaki y col., 1996; Shinzaki y col., 1997; Ingram y col., 1996; Bray, 1997). Estos genes se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a la función que cumplen (Liu y col., 2000).

El primer grupo comprende genes que codifican para proteínas que protegen macromoléculas y membranas celulares (como proteínas LEA, proteínas anticongelantes y chaperonas), proteínas que mantienen el flujo de agua a través de las membranas (como canales de agua y proteínas transportadoras), enzimas que catalizan la biosíntesis de osmoreguladores (como prolina y trehalosa) y enzimas detoxificantes capaces de mantener un metabolismo normal en la célula vegetal (como glutatión S-transferasa y superóxido dismutasa).

El otro grupo incluye proteínas que están envueltas en transducción de señal del estrés y el control de la expresión de genes involucrados en la tolerancia al estrés como factores de

transcripción (genes CBF y MYC) (Figura 1), proteínas quinasas (como MAP quinasas y CDP quinasas) y proteinasas (fosfoesterasas y fosfolipasa C).

Análisis de expresión de genes inducidos por sequía, alta salinidad y frío han mostrado la existencia de distintos sistemas regulatorios de respuesta a estrés, algunos dependientes y otros independientes de ABA (ácido absísico) (Bray 1997; Shinozaki y col., 1996; Shinozaki y col., 1997; Thomashow ,1999), lo cual indica la existencia de mecanismos regulatorios complejos entre percepción de la señal de estrés abiótico y expresión génica.

A pesar de conocerse algunos de los posibles genes participantes, aún no es claro el mecanismo molecular mediante el cual la planta percibe el estrés medioambiental al cual está siendo sometida, ni como esta señal de estrés es traducida en una respuesta de adaptación en la planta.

1.3 Factores de transcripción, genes CBF (*c-Repeat Binding Factor*)

Las plantas de regiones tropicales no tienen la capacidad de sobrevivir a bajas temperaturas, sin embargo las plantas herbáceas de regiones mas templadas si la tienen, estas plantas pueden soportar rangos de temperaturas muy bajos una vez que la planta es expuesta a bajas temperaturas sin ser éstas extremas, conociéndose este fenómeno como aclimatación al frío (Hughes y col., 1996). La tolerancia al congelamiento implica cambios fisiológicos y bioquímicos, y está muy íntimamente ligada a la tolerancia al estrés por falta de agua, ya que, durante el congelamiento, la formación de hielo extracelular disminuye el potencial de agua fuera de la célula lo que causa que el agua fluya fuera de ésta. Por lo tanto, el daño causado por el congelamiento es inducido por la deshidratación que sufre la célula vegetal. Es por esto que las plantas responden a las bajas temperaturas y a la desecación a nivel molecular, de forma muy similar (Pearce, 1999; Shinozaki y col., 2000).

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 sequía (Ingram y col., 1996; Pearce, 1999; Thomashow, 1999) (Figura 1). Estas proteínas de función desconocida en general presentan regiones con capacidad para formar α -hélices anfipáticas, siendo algunas de ellas parte de la familia de proteínas LEA, como *COR47*, la cual codifica un polipéptido altamente hidrofílico, el que participa durante el proceso de deshidratación de la planta (Thomashow 1999). También se ha descrito la función del gen *COR15* en la tolerancia a estrés por frío actuando sobre la conformación lipídica de la membrana de los cloroplastos (Steponkus y col., 1998).

Recientemente se ha establecido que un importante componente en la aclimatización al frío en *Arabidopsis* es la cascada de eventos regulada por los genes CBF/DREB (C-repeat-binding factor o dehydration-responsive element-binding protein) (Figura 1). Estos genes son inducidos dentro de los primeros 15 min de exposición al frío de la planta, (Gilmour y col.,

1998; Medina y col., 1999; Stockinger y col., 1997). En el genoma de *Arabidopsis 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 frío (Gilmour y col., 1998; Medina y col., 1999; Haake y col., 2002). 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 plantas (Seki y col., 2001). El blanco inmediato de las proteínas codificadas por los genes CBF tienen un elemento en su promotor denominado CRT (C-repeat)/DRE (dehydration responsive element), elemento que contiene una secuencia consenso de 5 pares de bases rica en citosina, CCGAC, repetida múltiples veces en dichos promotores. Esta secuencia regulatoria del ADN es a la cual se unen los factores de transcripción CBF por medio del dominio de unión AP2 (Baker y col. 1994; Stockinger y cols. 1997; Yamaguchi-Shiozaki y col. 1994). Esta familia de proteínas de unión al ADN llamadas AP2/ERF (Stockinger y col. 1997), comprende más de 140 miembros en *A. thaliana*, teniendo todas en común el motivo de unión al ADN AP2/ERF (Okamura y col. 1997; Riechmann y col. 1998). Sin embargo, existen secuencias aminoacídicas conservadas que distinguen a las proteínas CBF del resto de las proteínas que poseen este dominio. Las secuencias PK(K/R)PAGRxKfxETRHP y DSAWR que se encuentran río arriba y río abajo del dominio AP2/ERF, denominándose "secuencia señal CBF", siendo su función aún no determinada (Jaglo y col., 2001). También hacia el extremo carboxilo terminal de la proteína CBF1 de *A. thaliana* se han descrito motivos de aminoácidos hidrofóbicos, como LWSY, los cuales serían fundamentales en la función como activador transcripcional de las proteínas CBF (Zhibin y col. 2005).

Cuando en plantas de *A. thaliana* se sobre-expresan en forma constitutiva los genes CBF nativos se induce la expresión de otros genes que confieren tolerancia al congelamiento, sequedad y altas concentraciones de sales a estas plantas.(Jaglo-Ottosen y col., 1998), como por ejemplo el gen COR15 (Baker y col., 1994), COR78/RD29A (Horvath y col., 1993), COR6.6 (Wang y cols., 1995) y KIN1 (Wang y col., 1995), sin embargo, cuando las plantas sobre expresan algún gen CBF bajo el control de un promotor constitutivo, como el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S), las plantas sufren problemas de retardación del crecimiento y disminución de la floración. Por otro lado cuando se sobre expresan los genes CBF bajo un promotor inducible, como el rd29A, el cual es activado por frío, se minimizan los efectos negativos sobre el crecimiento de la planta, pero se mantiene el aumento de la tolerancia al estrés abiótico (Kasuga y col., 1999).

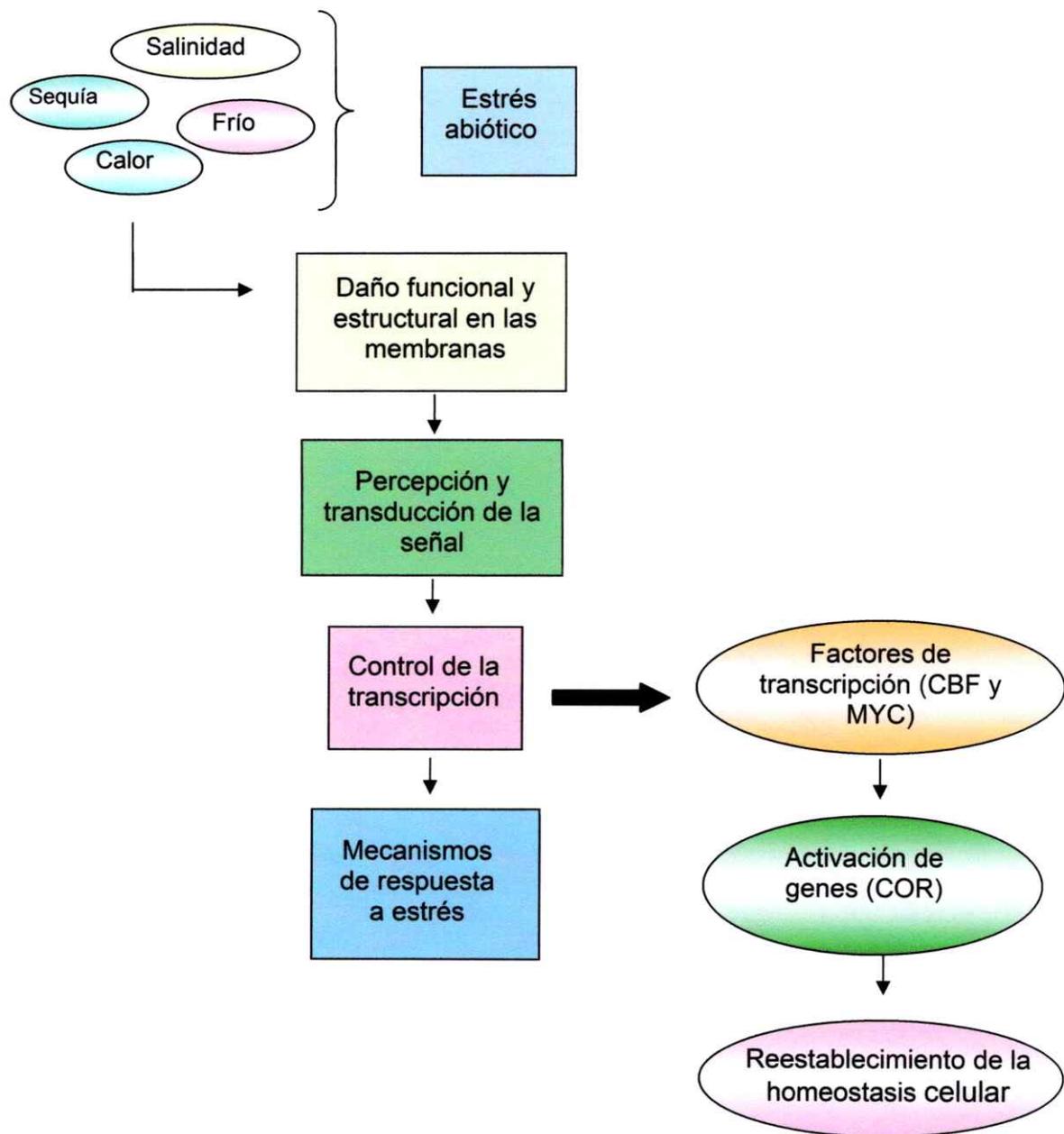


Figura1. Esquema del proceso de percepción y transducción de señal involucrada en el estrés abiótico

Los genes CBF se han descrito en diferentes especies vegetales de interés comercial como arroz (*Oryza sativa*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Zhang y col., 2004), trigo (*Triticum aestivum* L. cv *Norstar*) (Jaglo y col., 2001), cebada (*Hordeum vulgare*) (Choi y col., 2002) y maíz (*Zea mays*) (Qin y col., 2004) presentando entre ellos una alta homología de secuencia, especialmente en el dominio de unión al DNA, AP2. En muchos de ellas se ha observado que al sobre expresar estos genes, las plantas se hacen mas tolerantes a los cambios medioambientales desfavorables. Por ejemplo, en el caso de tomate y maíz, se realizaron estudios donde se aislaron los genes CBF nativos y su función fue estudiada en un sistema heterólogo utilizando *Arabidopsis thaliana* como planta modelo, observándose los mismos resultados descritos anteriormente, es decir, mayor tolerancia al frío y la sequía (Qin y col., 2004; Zhang y col., 2004).

Para facilitar la nomenclatura me referiré como genes tipo-CBF a aquellos genes que a pesar de tener una elevada identidad con genes CBF, no se les ha comprobado una función dentro de la respuesta a estrés en la planta.

1.4 Hipótesis

Postulamos que *Eucalyptus globulus* posee un gen tipo CBF que está involucrado en la respuesta a estrés abiótico

1.4 Objetivo General

- Aislar y caracterizar un gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus*

1.5 Objetivos Específicos

- Diseño de partidores en base a secuencias conocidas de genes CBF pertenecientes a otras especies y amplificación de un gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus*
- Estudio del número de copias del gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus* mediante *Southern blot*
- Estudio de expresión del gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus* bajo diferentes condiciones de estrés medioambiental
- Clonación del gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus* en un vector binario
- Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con vector binario que contiene el gen tipo-CBF
- Transformación de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus*

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos y enzimas

Los reactivos utilizados en el desarrollo de este trabajo fueron de grado pro análisis o grado molecular y se adquirieron en los siguientes laboratorios: Sigma Chemical, Merck y Phytotechnology. Las enzimas de restricción, Taq ADN polimerasa, T4 ADN ligasa, DNasa I y los desoxiribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, la fosfatasa alcalina de camarón, RNasin, transcriptasa reversa, y los estándar de peso molecular de ácidos nucleicos (1Kb, DNA/*Hind* III y una mezcla de λ DNA/*Hind* III y Φ X 174 RF DNA/*Hae* III), se obtuvieron en Invitrogen. Triptona, extracto de proteína y agar fueron adquiridos en Laboratorios Difco. Los kits comerciales que se utilizaron para la purificación de ADN plasmidial y de ADN a partir de geles son de E. Z. N. A. Omega Bio-tek. Para la purificación de productos de PCR se utilizó el kit de Qiagen.

2.2 Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa *Nova blue* de *Escherichia coli* para la mantención y multiplicación de los vectores recombinantes y la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de *Arabidopsis thaliana*.

2.3 Medios de cultivo

LB: Bactotripton 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L. Para medio sólido se adiciona agar 15g/L.

SOC: Bactotripton 20g/L, extracto de levadura 5g/L; NaCl 0,5g/L, glucosa 1M y MgCl₂ 0,1M

MS: Sales MS (macroelementos, microelementos y quelatos de fierro) 4,3g/L, mioinositol 0,1g/L, sacarosa 50g/L. Para medio sólido se usa sacarosa 30g/L y agar-agar 7g/L.

2.4 Antibióticos

Las soluciones de antibióticos se prepararon en H₂O (agua desionizada bidestilada) y fueron esterilizados por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22µm de diámetro de porosidad (Millipore). Los antibióticos se prepararon en las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp, 100mg/mL), gentamicina (Gen, 100mg/mL), kanamicina (Kan, 50mg/mL) y rifampicina (Rif, 100mg/mL en dimetil sulfóxido).

2.5 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Plantas de *Eucalyptus globulus* fueron cultivadas en el laboratorio a partir de semillas adquiridas en el vivero Antumapu de la Universidad de Chile. Además se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia cultivadas en el laboratorio.

2.6 Desinfección, germinación de semillas y cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Semillas de *A. thaliana* se desinfectaron según el protocolo descrito a continuación. Las semillas se lavaron en 1ml de una solución de hipoclorito de sodio al 20% y TWEEN 10% durante 5 min, seguido de un lavado con etanol 95% durante 3 min. Finalmente se realizaron 3 a 4 lavados con agua destilada estéril para luego depositar 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

crecimiento con un foto periodo de 16/8 h de luz / oscuridad y un rango de temperatura entre 20-25°C. Las semillas germinadas fueron luego transferidas a tierra.

2.6.1 Mezcla de tierra para el cultivo de plantas

La mezcla de tierra utilizada fue la siguiente: 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)

2.6.2 Cultivo de plantas

Las plantas de *A. thaliana* germinadas *in vitro* se trasplantaron a macetas con la mezcla de tierra descrita previamente (sección 2.6.1), 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 y cada 2 semanas con urea (Ergo) 10g/L. Las condiciones de crecimiento son las mismas descritas en la sección 2.6. Para la obtención de las semillas, las plantas se mantienen 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, estas son terminadas de secar y almacenadas a temperatura ambiente.

En el caso de *E. globulus* las semillas fueron puestas directamente sobre una maceta con tierra, siendo regadas con agua potable y urea 10g/L alternadamente, dos veces a la semana. Las condiciones de crecimiento son iguales que para *A. thaliana*, descrita en la sección 2.6

2.7 Mantención y crecimiento de cepas bacterianas

Cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C con agitación constante durante 16 h en medio líquido LB suplementado con el antibiótico apropiado. A partir de estos cultivos se tomaron inóculos con los que se prepararon stocks al 20% de glicerol los que fueron almacenados a -80°C.

La cepa de *A. tumefaciens* se creció a 28°C en medio líquido o placas con LB suplementado con Gen (100µg/mL), Kan (100µg/mL) y Rif (10µg/mL) durante 48h. El método de almacenaje fue similar al anterior.

2.8 Preparación de células competentes de *Escherichia coli* Novablue

El método utilizado fue el descrito por Sambrook (Sambrook y col., 1989). Brevemente, se cultivaron células de *E. coli* Novablue en medio LB (100µL de células en 5mL de medio) durante toda la noche a 37°C con agitación constante. Al día siguiente se agregó este cultivo bacteriano a 500mL de medio LB, incubándose a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,6-0,8. El cultivo se centrifugó a 3500xg por 10 min a 4°C y las células fueron resuspendidas en 250mL de NaCl 10mM frío. Las células se centrifugaron nuevamente en las condiciones antes descritas y luego se resuspendieron en 250mL de $CaCl_2$ 75mM. El cultivo se mantuvo en hielo durante 30 min para posteriormente ser centrifugado. Las células se resuspendieron en 60mL de $CaCl_2$ 75mM 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 almacenados a -80°C.

2.9 Transformación de células competentes de *Escherichia coli* Novablue

El protocolo de transformación utilizado fue el descrito por Inoue (Inoue y col.,1991). Este método consiste en mezclar 100µL de células competentes con 5 - 10µL 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 1mL 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 10000xg por 1 min, descartándose casi por completo el sobrenadante, dejando aproximadamente 200µL 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 50µg/mL para pGEM-T y PUCpSS y Kan 50µg/mL para pBIN19. En el caso del vector pGEM-T y pBIN19, se realiza una selección por alfa complementación agregando 20µL de X-GAL 50mg/mL y 10µL de IPTG 1M.

2.10 Vectores

Los plasmidios utilizados durante el desarrollo de esta tesis se describen en la Tabla 1 y sus estructuras se esquematizan en la Figura 2.

Tabla 1. Descripción de plasmidios utilizados en este trabajo

Nombre	Tamaño (Kb)	Selección	Características	Referencia
pGEM-T	3,0	Amp	Vector utilizado para clonar productos de PCR	Promega
PUCpSS	3,6	Amp	Vector utilizado para clonar nuestro gen de interés bajo un doble promotor CaMV 35S	Dr. Patricio Arce U. Católica de Chile
pBIN 19	11,7	Kan/Kan	Vector binario utilizado en la transformación mediada por <i>Agrobacterium</i>	Dr. Patricio Arce U. Católica de Chile

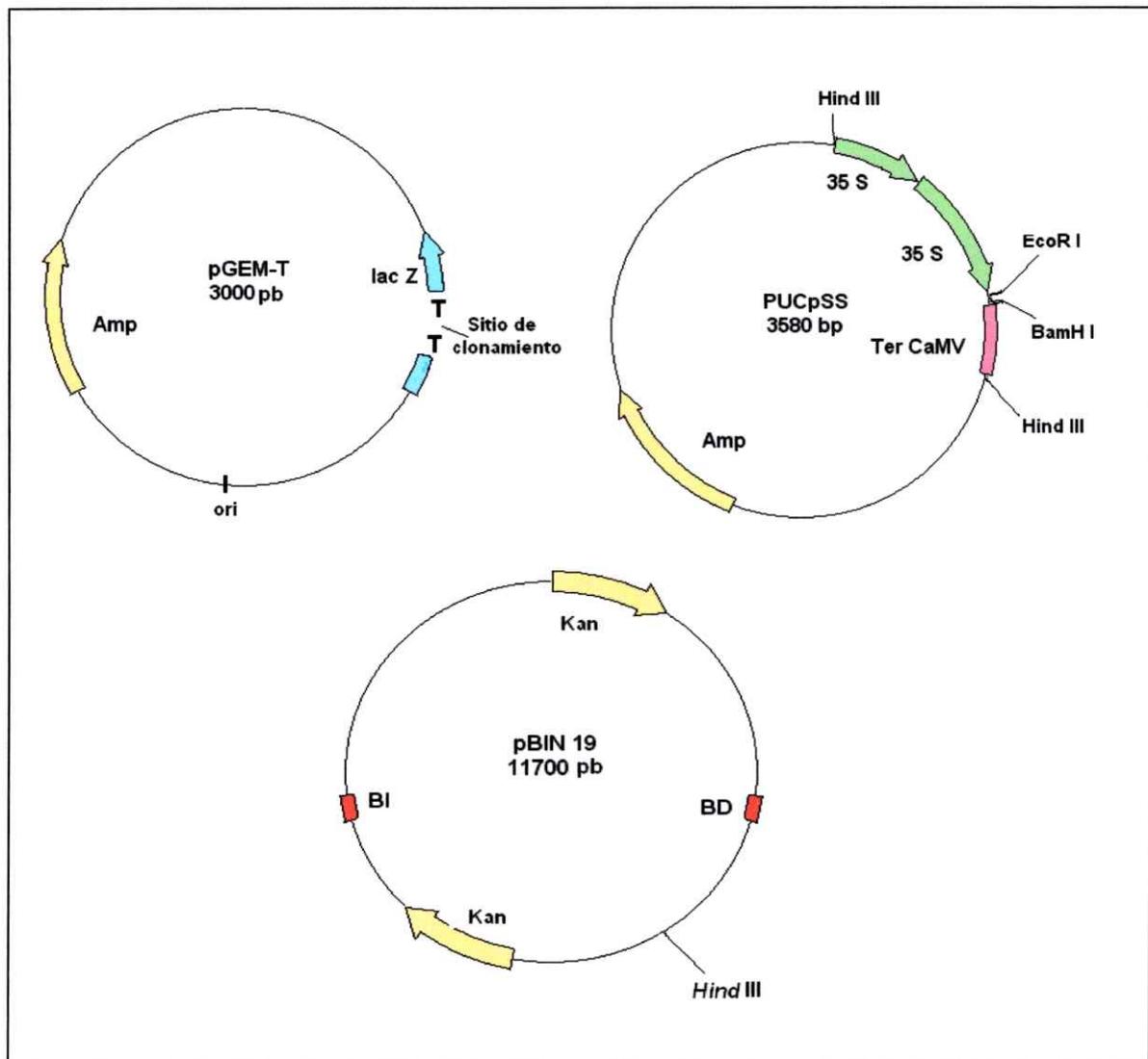


Figura 2. Plásmidos utilizados durante el desarrollo de esta memoria de tesis

pGEM-T. ampicilina (Amp), *lac Z* (región codificante para la β -galactosidasa) interrumpida por el sitio de clonamiento. **PUCpSS.** Amp, doble promotor CaMV 35S, Ter CaMV 35S, un origen de replicación (*ori*). **pBIN19.** BD y BI (bordes derecho e izquierdo respectivamente) en esta zona se encuentra una resistencia a kanamicina (Kan), además de un sitio de clonamiento múltiple, fuera de los bordes se encuentra otra resistencia a Kan. Se indica en cada caso los sitios de restricción utilizados para el clonamiento del gen tipo-*EgCBF*.

2.11 Purificación de ADN plasmidial

Para la extracción de ADN plasmidial se utilizó un cultivo bacteriano (2-5 mL) crecido durante la noche a 37°C con agitación constante. El cultivo se centrifugó a 5000xg por 1 min

obteniéndose una pella de bacterias. A partir de esta pella el ADN plasmidial se obtuvo siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante del Kit E.Z.N.A. Plasmid Miniprep, Omega Bio-tek.

2.12 Digestión de ADN mediante endonucleasas de restricción

ADN fue digerido usando 1-5 U de enzima por μg de ADN con el tampón de reacción 10x apropiado, según las instrucciones del fabricante. La mezcla se incubó a 37°C durante 1-4 h. Inactivándose la enzima cuando corresponda a 65°C por 15 min.

2.13 Desfosforilación de ADN

Los vectores plasmidiales previamente digerido con endonucleasas de restricción fueron desfosforilados para evitar su recirculación. Para esto se utilizó la enzima fosfatasa alcalina de camarón (Invitrogen). Brevemente, a 5-10 μg de ADN plasmidial previamente cortado, se le agregó 10 μL de la solución tampón 10X suministrada con la enzima, 2 U de dicha enzima y agua bidestilada hasta completar volumen final. Esta mezcla se incubó durante 1 h a 37°C, luego se procede a inactivar la enzima agregando EDTA (10mM) e incubando durante 15 min a 75°C.

2.14 Ligación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR o extraídos desde geles de agarosa, fueron ligados a los vectores de clonación en una relación 1:10 de vector con respecto al inserto de ADN. Para esto se mezclaron 5 μL de solución tampón de ligasa 2X, entre 10-55ng de vector, ADN para obtener la razón molar ya descrita y 1 μL de la enzima ADN T4 ligasa (Invitrogen).

Se completó con agua bidestilada hasta un volumen final de 10 μ L y la mezcla se incubó durante la noche a 4°C o durante 1 h a temperatura ambiente.

2.15 Purificación de fragmentos de ADN de un gel

Una vez finalizada la digestión la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 50V. Luego el gel se tiñó con una solución de BrEt 1 μ g/mL para visualizar los fragmentos de ADN. El trozo de agarosa que contenía el fragmento deseado se extrajo del gel con un bisturí y se colocó 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.

2.16 Partidores

Los partidores fueron diseñados y analizados mediante el programa computacional OLIGO, para confirmar su calidad siendo sintetizados por Invitrogen. La temperatura de hibridación (T_m), de cada partidor se calculó en base a la fórmula:

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

En la Tabla 2 se muestra la secuencia y la T_m de cada partidor.

Tabla 2. Partidores.

Listado de partidores utilizados en el desarrollo de esta memoria. En color rojo se encuentra indicado el sitio de restricción *EcoR* I y en color azul el sitio de restricción *BamH* I incorporados en estas secuencias.

Nombre del partidor	Secuencia	T _m (°C)
1- PR4F	5' aag aaa ccg gca ggc cgg aag aag aa 3'	56
2- PR9R	5' cca agc cga gtc agc gaa gtt 3'	56
3- G775	5' gac tcg agt cga cat cga ttt ttt ttt tt 3'	42
4- G702	5' gac tcg agt cga cat cg 3'	52
5- CBF1 <i>Eg</i> PUC F	5' ata gaa ttc cct ccc atg aac tct tcc t 3'	58
6- CBF1 <i>Eg</i> PUC R	5' ata gga tcc tac tta cta agt ggg gca tc 3'	58
7- histona H4 F	5' gaa gcg gca cag aaa ggt c 3'	58
8- histona H4 R	5' ccc aca agt tca ttt cgt ctg 3'	58
9- 5' <i>Eg</i> CBF1 F	5' ctg ctt cat tcc aac tca ac 3'	58
10- 3' <i>Eg</i> CBF1 R	5' ccc taa tga caa aat tga gaa a 3'	58
11- CaMV 35S F	5' ccc cca ccc acg agg agc 3'	64
12- Ter CaMV 35S	5' tac aaa tca ata cta agg gtt tc 3'	60

2.17 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción se realizó en tubos Eppendorf autoclavados de 500 μ L, mezclando los siguientes componentes: 2 μ L de tampón PCR 10X, 0,6 μ L de MgCl₂ 50mM, 1,6 μ L de la mezcla de dNTPs 10mM, 1 μ L de cada partidor a una concentración de 10 μ M, 50-200ng de ADN templado, 0,2 μ L de Taq DNA polimerasa 5U/ μ L y se completó a un volumen final de 20 μ L con agua bidestilada. Se utilizó un termociclador modelo PTC-200 (MJ Research) con un programa que consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 4 min, 30 ciclos

de amplificación, consistente en una etapa de desnaturación a 95°C por 1 min, una etapa de hibridación a 50-60°C, dependiendo de la T_m de los partidores utilizados, durante 30 seg y una etapa de extensión a 72°C durante 1-2 min. Finalmente se realizó una etapa de elongación por 10 min a 72°C.

2.18 Purificación del ADN amplificado mediante PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó con el propósito de remover sales y enzimas, para esto se utilizó el Kit Qiaquick de Qiagen siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

2.19 Preparación de ARN total de *Eucalyptus globulus*

El método se basó en el protocolo descrito por Chang (Chang y cols.,1993). Todas las soluciones se prepararon con agua tratada con DEPC. Aproximadamente 100mg de tejido de *E. globulus* obtenido a partir de hojas sin nervaduras fue molido hasta un polvo fino en nitrógeno líquido, para luego ser incubado un mínimo de 5 min a 65°C con 600uL de tampón de extracción (CTAB 2%, PVP30 2%, Tris-HCl 100mM pH8,0, EDTA 25mM, NaCl 2M, espermidina 0,5g/L) previamente calentado a 65°C y adicionado con β-mercaptoetanol al 2% y ácido ascórbico 8mM. Dos extracciones con 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) se realizaron centrifugando cada vez a 13000xg por 5 min, recuperando la fase superior luego de cada centrifugación. A continuación el ARN se precipitó con ¼ de volumen de LiCl 2,5M durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente el precipitado se centrifugó a 20000xg durante 25 min a 4°C eliminándose el sobrenadante y secando el tubo a temperatura ambiente sobre papel filtro. Una vez seca, la pella se resuspendió en SDS 5% y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego de realizar una nueva extracción con

cloroformo alcohol isoamílico, la fase acuosa recuperada se precipitó con etanol absoluto a -20°C durante 2 h y a continuación se centrifugó en las mismas condiciones antes descritas. Finalmente la pella se secó a temperatura ambiente, siendo resuspendida en 30µL de agua bidestilada tratada con DEPC.

2.20 Transcripción reversa

La transcripción reversa se realizó utilizando como templado 2µg ARN total. Se utilizó 1µL del partidor reverso (oligo dT o 3'Eg CBF1 R) a una concentración de 10µM. El ARN 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 le agregaron 5µL del tampón 5X, 1µL de la enzima M-MLV (Invitrogen), 4µL de dNTP (10µM), 25 unidades de inhibidor de RNasa (RNasin), y agua hasta completar 25µL finales. Esta mezcla se incubó a 42°C durante 1h.

2.21 Obtención de los extremos del gen tipo-EgCBF mediante 5' y 3' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Para la obtención del extremo 5' del gen se utilizó el kit First Choice™ RLM-RACE (Ambion) siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante.

En el caso del extremo 3' se realizó un procedimiento basado en la estrategia del kit mencionado anteriormente pero con partidores extraídos de la publicación de Frohman y col. (1988), denominados G775 y G702 (Tabla 2). La hebra de ADN complementario se generó con el partidor G775 y el PCR se realizó utilizando el partidor G702 y 5'CBF1 F (Tabla 2).

2.22 Preparación de ADN genómico de *Eucalyptus globulus*

El procedimiento se basó en el método descrito por Stange (Stange y cols., 1998). Para esto se tomaron 100mg de tejido, los que fueron pulverizados en nitrógeno líquido utilizando un mortero. Este pólvó fue incubado a 60°C durante 30 min en 800µL del tampón de extracción de ADN (NaCl 1,42M, EDTA 20mM, ácido ascórbico 5mM, DIECA 4mM, CTAB 2%, PVP40 2%, Tris-HCl pH8,0 100mM) suplementado con 3µL de β-mercaptoetanol. Luego de la incubación se realizaron dos extracciones con 500µL de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) centrifugando cada vez a 13000xg 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 13000xg durante 10 min a 4°C concentrándose la pella en el fondo del tubo y eliminando el sobrenadante por inversión. La pella se lavó con etanol frío al 70% y se secó a temperatura ambiente. A continuación, la pella se resuspendió en 50µL de agua bidestilada y se trató con 5µL de RNasa (10mg/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. La pella se lavó con etanol 70% frío, se dejó secar a temperatura ambiente sobre un papel filtro y se resuspendió finalmente en 50µL de agua.

2.23 Preparación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

La preparación se realizó a partir de hojas de la roseta de *A. thaliana* siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante del kit Genomic DNA Purification de Wizard.

2.24 Análisis de ADN y ARN mediante electroforesis en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa (Sigma) de una concentración ajustada según el tamaño del fragmento a observar (entre 0,8% y 2,0%) en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM pH 8,3) y BrEt 0,2 µg/mL. Se utilizó como estándar de peso molecular una mezcla de fragmentos de ADN. Antes de ser cargados en el gel, se agregó a la muestra solución de carga 10x (azul de bromofenol 0.25% p/v y glicerol 50% v/v en TE). El gel se corrió en tampón TAE 1X durante el tiempo necesario para resolver los componentes de la muestra (30-60 min) a un voltaje aproximado de 90 volts. El gel fue observado y fotografiado mediante el uso de un transiluminador de luz UV.

2.25 Preparación de una sonda radiactiva

La sonda se realizó amplificando un gen con partidores específicos (Tabla 2) a través de una reacción de PCR (sección 2.17) cambiando la concentración de los dNTPs usados. Las cantidades de dNTPs utilizados fueron las siguientes: 4µL α -³²P dCTP (3,33µM), 3µL dCTP (0,1mM) y 3µL de una mezcla de dNTPs sin dCTP (0,33mM). Los volúmenes descritos fueron para reacciones con un volumen final de 50µL. El producto de PCR fue purificado a través de una columna con resina G50 para eliminar los remanentes de dNTPs que no se incorporaron a la sonda.

2.26 Southern blot

Se usó el protocolo descrito por Sambrook (Sambrook y col., 1989). Se realizaron digestiones con enzimas que no cortaran en la secuencia a analizar. Un total 10µg de ADN genómico de *E. globulus* fue utilizado para cada digestión. Luego los fragmentos de ADN fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa (sección 2.24)

Una vez concluida la electroforesis el gel se colocó en una solución despurinizante (HCl 0,25M) agitando suavemente durante 15 min. Transcurrido este tiempo se desechó la solución y se añadió la solución desnaturalante (NaCl 1,5M y NaOH 0,5M) incubando en las mismas condiciones del paso anterior. Nuevamente se desechó la solución anterior y se agregó una solución neutralizante (NaCl 1,5M y Tris-HCl 0,5M pH8,0) incubándose por otros 15 min.

El sistema de transferencia consiste en una bandeja con solución tampón SSC 20x (NaCl 3M y citrato de sodio 0.3M), de la siguiente manera: dentro de la bandeja se coloca un soporte, sobre éste se pone papel Whatman 3MM de tal manera que los extremos del papel estén en contacto con la solución tampón. Luego se pone el gel de agarosa sobre el papel filtro cuidando que no queden burbujas de aire entre el gel y el papel filtro, para a continuación poner sobre el gel la membrana de nitrocelulosa del tamaño justo para cubrir la superficie del gel evitando la formación de burbujas de aire. Luego sobre la membrana se ponen 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 toda la noche. Al día siguiente se desmontó recuperando la membrana de nitrocelulosa. Por último la membrana se secó en papel Whatman y se fijó el ADN con luz UV durante 3 min.

La membrana de nitrocelulosa se prehibridó durante 1 h a 42°C con la solución de hibridación (SSC 6x, Denhardt's 5x, formamida 50%, SDS 0,5%, ADN de carpa 0,05%).

A continuación la membrana se hibridó con la sonda marcada radiactivamente, descrita en la sección 2.25 durante 16 h, a 42°C y con agitación constante, en la misma solución antes descrita. Posteriormente la membrana se lavó con una solución que contiene: SDS 0,1% y una concentración variable de SSC, desde 2x hasta 0.1x, dependiendo del grado de estrictez

que se requiera en el lavado. Luego la membrana se expuso a una placa fotográfica durante aproximadamente 72 h a -80°C . Finalmente la placa fotográfica se reveló siguiendo el siguiente procedimiento: 5 min en solución reveladora Scientific Imaging Film Biomax de Kodak, enjuague en agua potable por un minuto y 1,5 min en solución fijadora Scientific Imaging Film Biomax de Kodak.

2.27 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó el método descrito por Chen (Chen y col. ,1994). Este consistió en crecer un cultivo bacteriano de 3mL hasta fase logarítmica (aproximadamente 36 horas) a 28°C en medio LB. Se inocularon 2mL de éste cultivo en 50mL de medio LB fresco y se creció a 28°C hasta obtener una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5. Una vez alcanzada ésta densidad óptica, las bacterias se enfriaron en hielo por 10 min previo a ser centrifugadas a $3000\times g$ por 5 min. Luego las bacterias se resuspendieron en 1mL de CaCl_2 20mM y se prepararon alícuotas de $200\mu\text{L}$ en tubos de 1,5mL preenfriados. Finalmente los tubos se almacenaron a -80°C .

2.28 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para transformar *Agrobacterium* se utilizó el método descrito por Chen y col (1994), en el cual $100\mu\text{L}$ de células competentes se mezclaron con el ADN de interés a una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ congelándose en nitrógeno líquido por 5 min. Posteriormente se descongelaron y mantuvieron a 37°C durante 25 min. Transcurrido este tiempo se agregó 1mL de medio LB y se incubó por 3 horas a 28°C con agitación suave. Finalmente se centrifugó la mezcla durante 1 min a $10000\times g$, descartando la mayoría del sobrenadante y resuspendiendo las bacterias en el sobrenadante residual (aproximadamente $200\mu\text{L}$) para plaquearlas en placas que contenían LB-agar más los antibióticos para la selección (Gen $100\mu\text{g}/\text{mL}$ y Rif $10\mu\text{g}/\text{mL}$,

resistencias aportadas por la cepa de *A. tumefaciens*, y Kan 100µg/mL, resistencia aportada por el vector utilizado para la transformación).

2.29 Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión floral

La transformación fue realizada según el protocolo descrito por Clough (Clough y col., 1998). Se utilizó *A. tumefaciens* transformada con la construcción molecular deseada, que fue cultivada hasta una DO_{600nm} de 0,6-0,8 en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Las células fueron precipitadas en una centrifuga refrigerada a 4°C a 3500xg 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 cosechar las semillas.

2.30 Selección de semillas transformadas

Las semillas de las plantas sometidas al método de transformación descrito previamente, fueron evaluadas para establecer los porcentajes de eficiencia de transformación obtenidos. Para determinar el número de semillas aproximado con las que se trabaja se utiliza la siguiente relación: un volumen de 50µl corresponde aproximadamente a 1250 semillas de *A. thaliana*. Las semillas se esterilizaron (sección 2.6) y luego se sembraron en placas de MS-agar suplementado con 75µg/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.

2.31 Análisis de secuencia

Las secuencias fueron analizadas y ensambladas utilizando el programa computacional Vector NTI Suite 8.0 (Invitrogen). Las comparaciones de secuencias se realizaron utilizando las bases de datos disponibles en la red como Swiss-Prot and TrEMBL de ExPASy Server (Gasteiger y col., 2003) y NCBI mediante los algoritmos BLASTN, BLASTX y BLASTP (Altschul y col., 1997). Los alineamientos se hicieron utilizando el programa Clustal W. La búsqueda de dominios con función conocida se realizó mediante el sitio <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/> y el árbol filogenético se construyó con el programa MEGA versión 3.0 (Kumar y col., 2004).

3 RESULTADOS

3.1 Aislamiento e identificación de un gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus*

3.1.1 Aislamiento de un gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus* a partir de ADN complementario

Con el propósito de obtener un gen tipo-CBF de *E. globulus* se comenzó este trabajo alineando secuencias nucleotídicas disponibles en la base de datos GenBank. Se utilizaron secuencias de genes CBF de otras especies como arábidopsis (*A. thaliana*), tomate (*L. esculentum*) y trigo (*T. aestivum*). Todas éstas presentan una zona muy conservada en la región central, correspondiente al dominio de unión al ADN AP2. Aprovechando esta particularidad se diseñaron varios partidores para esta región a partir de la secuencia consenso obtenida a través de ClustalW. Como templado se utilizó ADN complementario producido por transcripción reversa de ARN de una planta de *E. globulus* que fue sometida a 4°C durante 30 min, según procedimiento descrito en la sección 2.20. El PCR se realizó con los partidores específicos PR4F-PR9R (Tabla 2) que amplificaron el fragmento esperado de aproximadamente 200pb (Figura 3A). Este producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T, el cual se utilizó para transformar *E. coli*, siendo dos de los clones recombinantes obtenidos secuenciado en ambas direcciones. El resultado de la secuencia obtenida confirmó la identidad de este fragmento del gen tipo-CBF de *E. globulus*, indicando la correspondencia de este fragmento, de 230 pares de bases, con la región central de los genes CBF descritos en otras especies. Por lo tanto, a continuación se comenzó a trabajar en la obtención de la secuencia completa de nuestro gen tipo-CBF de *E. globulus*, focalizándonos en las secuencias de los extremos 5' y 3' del gen.

3.1.2 Obtención de los extremos del gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus*

El método descrito anteriormente no nos permitió obtener las secuencias de los extremos 5' y 3' del gen, ya que estas zonas son poco conservadas dentro de las secuencias de los genes CBF. Por lo tanto, con el fin de completar la secuencia del gen tipo-CBF de *E. globulus* se utilizó la técnica RACE como se describió en materiales y métodos (sección 2.21), utilizando ADN complementario generado a partir de ARN total de plantas de *E. globulus* sometidas a 4°C durante 30 min.

El extremo 5' del gen tipo-*Eg*CBF se obtuvo utilizando el kit First Choice™ RLM-RACE (Ambion) y el partidor interno PR9R. El resultado fue la amplificación de un fragmento de aproximadamente 450 pb (Figura 3B), el cual se clonó en pGEM-T y dos clones fueron secuenciados por ambos extremos, para confirmar dicha secuencia. A partir de la secuencia obtenida se diseñó un partidor específico para *E. globulus* en el extremo 5' del gen, denominado 5'*Eg*CBF1 F (Tabla 2). Para la obtención del extremo 3' del gen tipo-*Eg*CBF, basado en la técnica RACE, se generó el ADN complementario con el partidor G775, el cual se une a la cola de poli A del ARN mensajero aislado de una planta de *E. globulus* sometida durante 30 min a 4°C, además de tener una secuencia adaptadora. El PCR posterior se realizó con el partidor G702 que es complementario a la secuencia adaptadora del partidor G775 más el partidor diseñado en el extremo 5' del gen, 5'*Eg*CBF1 F (Tabla 2). De esta manera se amplificó un fragmento que poseía la zona codificante completa del gen de *E. globulus*. Dicho fragmento amplificado, de aproximadamente 900 pb (Figura 3C), se clonó y dos clones fueron secuenciados. A partir de esta secuencia se diseñó el partidor específico para el extremo 3' del gen tipo-CBF de *E. globulus*, denominado 3'*Eg*CBF1 R (Tabla 2). Utilizando este partidor más el del otro extremo del gen, 5'*Eg*CBF1 F, se pudo amplificar un fragmento de aproximadamente 750 pb del gen tipo-CBF de *E. globulus* (Figura 3D) y posteriormente obtener la secuencia completa de dicho gen (Figura 4). Finalmente se

estableció que el gen tipo-CBF de *E. globulus* está compuesto por 672 pb, que codifican para 224 aminoácidos. El 3' UTR de este gen está formado por 85 pb y el 5'UTR consiste de 54 pb.

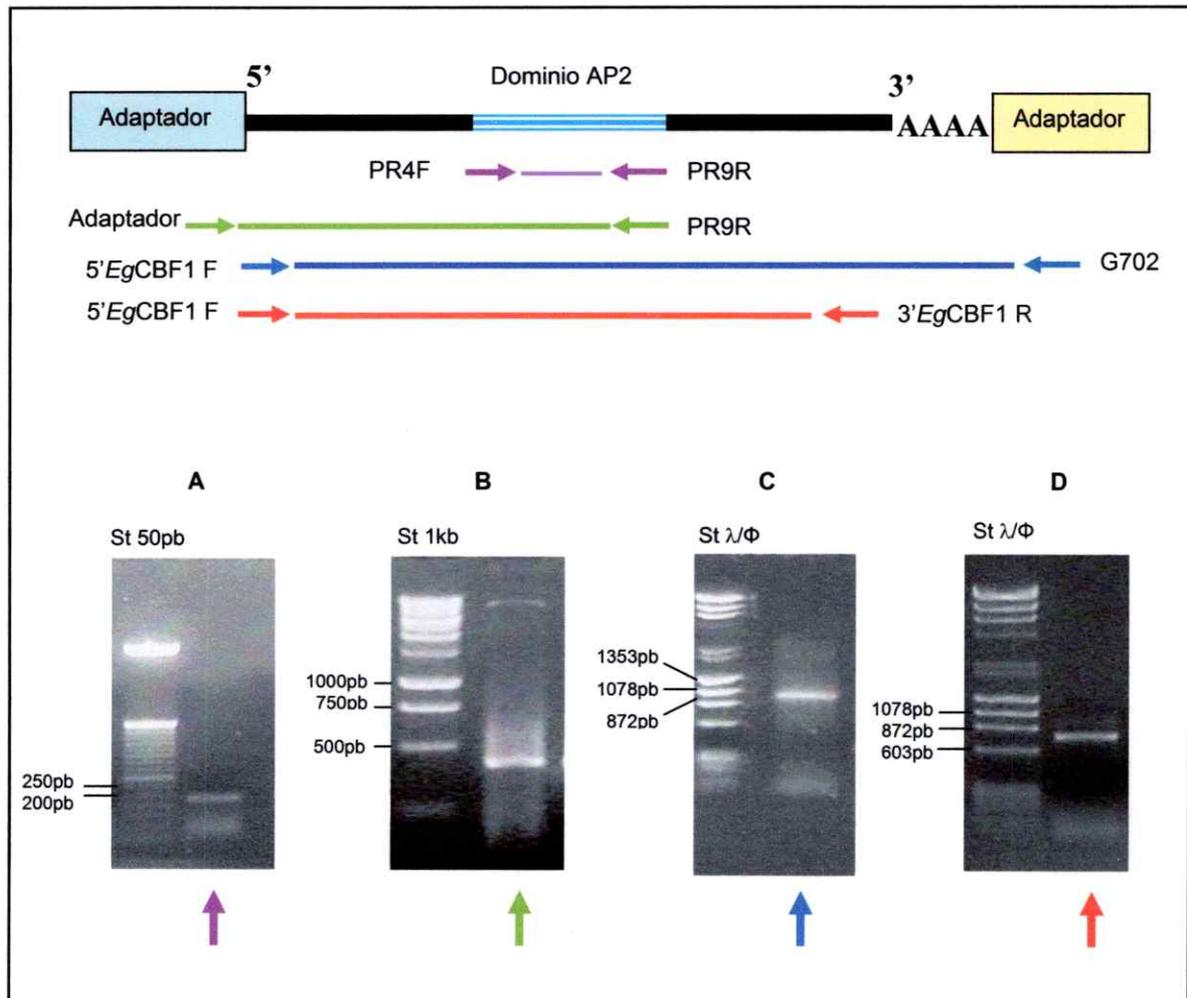


Figura 3. Amplificación del gen tipo-CBF de *E. globulus* mediante PCR a partir de ADN complementario

Electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Esquema del procedimiento utilizado para obtener cada uno de los fragmentos del gen tipo-*EgCBF*. **A.** Producto amplificado de aproximadamente 200pb al utilizar los partidores PR4F y PR9R; **B.** Producto amplificado de aproximadamente 450pb con los partidores Adaptador y PR9R; **C.** Producto amplificado de aproximadamente 900pb con los partidores 5'*EgCBF1 F* y G702; **D.** Producto amplificado de aproximadamente 750pb al utilizar los partidores específicos para el gen tipo-*EgCBF*, 5'*EgCBF1 F* y 3'*EgCBF1 R*.

```

atgaactcttctcttataatctcccaccccaactccttttagcttcgacttcgccgagccg
M N S S S Y I S H P N S F S F D F A E P
cctttctcgttgctgctgtcccacgaccggagtgagcgcccgggaacttctctggggaa
P F S L L L S H D R S A A P G N F S G E
gaggtgcgcctcgcgtccgaccacccgaagaaaccggcaggccggaagaagtccgggag
E V R L A S D H P K K P A G R K K F R E
acacgccaccccggtgtaccgggggggtgctggctgctgcgactcgggaaagtgggtctgcgag
T R H P V Y R G V R L R D S G K W V C E
gtccgagcccagaaagaagtgcgagatctggctcggcaccttcccaccgtagacatg
V R E P R K K S R I W L G T F P T V D M
gccgcaagggcacacgatgtggcggcgctcgcgctgaggggcccgggtccgcctgcctcaac
A A R A H D V A A L A L R G R S A C L N
ttcgcggactccgcgtggcggctgctcgtgccggcgctcacccaacaccaaggacatacag
F A D S A W R L L V P A S P N T K D I Q
agggcagcagccaaggccgcggaggcattccagctggtggaatccgaggatgtatgtcgg
R A A A K A A E A F Q L V E S E D V C R
gaacgagaagaagttgcattcgggaagagggagtgttgtcgacaaggaggacatcttcggg
E R E E V A F G R G S V V D K E D I F G
atgccggggttgctcgccaatatggcggaggggatgctcttgtttccaccggaatgcagc
M P G L L A N M A E G M L L F P P E C S
ggagatatatatgccggactggacgacgggaacttggacgcatacgcgctcattatggagc
G D I Y A G L D D G N L D A Y A S L W S
tattccatgtga
Y S M -

```

Figura 4. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la región codificante del gen tipo-CBF de *E. globulus*.

Secuencia completa de la región codificante del gen tipo-CBF de *E. globulus*, en negro se encuentra la secuencia nucleotídica compuesta por 672 pb y en rojo la secuencia aminoacídica formada por 223 residuos de aminoácidos.

3.1.3 Aislamiento del gen tipo-CBF de *Eucalyptus globulus* a partir de ADN genómico

Una vez que se aisló el gen tipo-CBF desde ADN complementario de *E. globulus*, se procedió a aislar dicho gen desde ADN genómico. Con los partidores específicos para el gen tipo-EgCBF, 5'EgCBF1 F y 3'EgCBF1 R (Tabla 2) se realizó un PCR a partir de ADN genómico extraído desde hojas de plantas jóvenes de 2 meses de vida (Figura 5A). El fragmento amplificado de aproximadamente 750 pares de bases, presentó el mismo tamaño del fragmento amplificado a partir del ADN complementario (Figura 5B). Este fragmento fue aislado desde el gel (sección 2.15) y clonado en el vector pGEM-T para su posterior secuenciación. El análisis de la secuencia sentido y antisentido del fragmento amplificado tuvo un 100% de identidad con la secuencia obtenida a partir de ADN complementario (Figura 4), por lo tanto, en base a este resultado se puede afirmar que el gen tipo-CBF de *E. globulus* no posee intrones en su estructura.

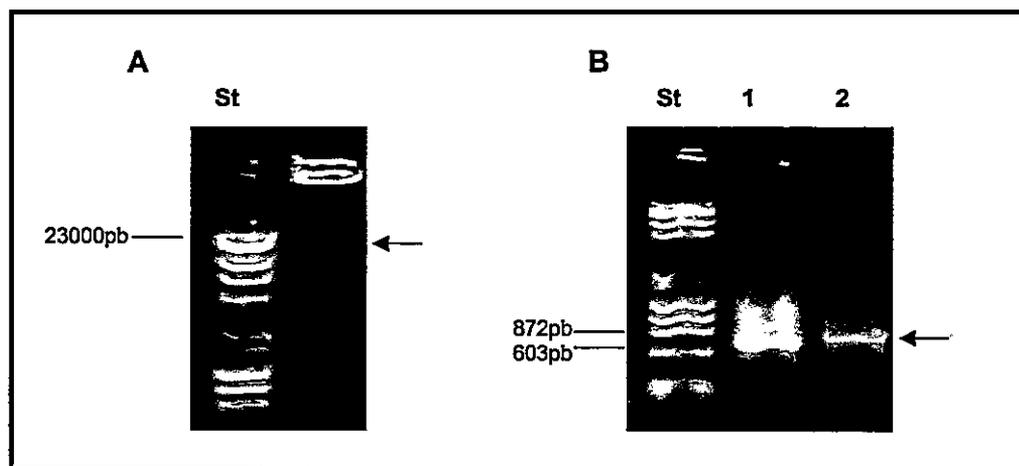


Figura 5. Amplificación del gen tipo-CBF de *E. globulus* mediante PCR a partir de ADN genómico

Geles de agarosa al 1%, estándar $\lambda\Phi$. A. ADN genómico de *E. globulus* B. En el carril 1 se muestra el control (+) correspondiente a la banda amplificada con los partidores específicos 5'EgCBF1 F y 3'EgCBF1 R a partir del gen tipo-EgCBF aislado desde ADN complementario clonado en pGEM-T. En el carril 2 se muestra la banda amplificada por PCR con los partidores específicos 5'EgCBF1 F y 3'EgCBF1 R a partir de ADN genómico de *E. globulus*.

3.2 Análisis bioinformático

3.2.1 Análisis de la secuencia del gen tipo-EgCBF

Al analizar la secuencia obtenida, por el procedimiento descrito en la sección 3.1, se confirmó que la secuencia de 672 pares de bases, aislada a partir de *E. globulus*, corresponde a un gen tipo-CBF. Al comparar la secuencia aminoacídica de tipo-EgCBF con las secuencias CBF de *A. thaliana* se obtiene una identidad de 55.4% con CBF3 de dicha especie y al realizar un *BLAST* directo en la base de datos GenBank se obtiene que la mayor identidad de secuencia la tiene con el gen CBF1 de *L. esculentum* con un 57.8% (Tabla 3).

En la secuencia aminoacídica de tipo-EgCBF, aislado durante esta memoria se encontró una señal de localización nuclear (RKKFRETRHPVYRGVRLR) en el extremo amino terminal de la proteína. Además en la región carboxilo terminal de ésta se encontró una secuencia característica de las proteínas CBF (LWSY), la que en conjunto con otros motivos hidrofóbicos de este extremo son importantes dentro de la función de la proteína CBF como activador transcripcional (Figura 8). El análisis de la secuencia obtenida indica que en la parte central, la región codificante posee un dominio AP2, constituido por 58 aminoácidos correspondiente a una zona altamente conservada en diferentes genes CBF de diferentes especies (Figura 6).

MNSSSYISHPNSFSFDFAEPPFSLLLSHDRSAAPGNFSGEEVRLASDHPKKPAG
RKKFRETRHPVYRGVRLRDSGKWVCEVREPRKKSRIWLGTFPTVDMAARAHD
 VAALALRGRSACLNFADSAWRLLVPASPNTKDIQRAAAKAAEAFQLVESEDVCR
 EREEVAFGRGSVVDKEDIFGMPGLLANMAEGMLLFPPECSGDIYAGLDDGNLDA
 YASLWSYSM

Figura 6. Secuencia y dominios de la proteína CBF de *E. globulus*.

Se muestra la secuencia aminoacídica de la proteína tipo-*Eg*CBF de *E. globulus* de 223 aminoácidos. Se destaca en azul el dominio conservado AP2, dentro de éste se destacan en celeste los residuos valina 14 y ácido glutámico 19. En rojo las secuencias señales CBF y subrayado se destaca la secuencia de localización nuclear. En morado se indica la secuencia conservada del extremo carboxilo terminal.

3.2.2 Análisis de los dominios de la proteína tipo-*Eg*CBF

La secuencia aminoacídica de tipo-*Eg*CBF obtenida durante esta memoria, posee un dominio AP2, el cual tiene sobre un 84,5% de identidad a nivel aminoacídico con el dominio AP2 de los diferentes genes CBF de *A. thaliana* y *L. esculentum*, resultado que se encuentra detallado en la Tabla 3. Dentro de este dominio se encuentra una secuencia conservada, la cual ha sido descrita en todas las proteínas que contienen un dominio AP2 en su secuencia (WLG) (Sakuma y col., 2002) (Figura 7), además de dos aminoácidos, los cuales presentan un alto nivel de conservación en diferentes especies, como son: valina 14 y ácido glutámico19 (Figura 6 y7).

Al analizar la secuencia aminoacídica correspondiente a tipo-*Eg*CBF se observó la presencia de las “secuencias señal CBF”, constituidas por los 16 aminoácidos que se encuentran

inmediatamente río arriba del dominio AP2 y los 5 aminoácidos río abajo a este dominio (Figura 6 y 7).

Para hacer un análisis más acabado, se realizó un alineamiento mediante el programa ClustalW, de todas las secuencias CBF disponibles en GenBank que tuvieran una publicación asociada donde demostraran su función como un gen CBF (Figura 7). El resultado del alineamiento muestra claramente el dominio AP2 altamente conservado en todas las secuencias analizadas al igual que la secuencia señal ubicada río arriba a este dominio, sin embargo, la secuencia señal río abajo del dominio AP2 es menos conservada, lo cual queda en evidencia en las secuencias *HvCBF1* (*Hordeum vulgare*), *LpCBF3* (*Lolium perenne*), *SaCBF3* (*Schedonorus arundinaceus*) y *ZmDREB1A* (*Zea mays*).

Las secuencias utilizadas en este análisis fueron: CBF1, 2 y 3 de *Arabidopsis thaliana* (AF076155); CBF4 de *Arabidopsis thaliana* (Q9FJ93); CBF1, 2 y 3 de *Lycopersicon esculentum* (AY497899); CBF1 de *Hordeum vulgare* (AF298230); CBF2 de *Hordeum vulgare* (AF442489); CBF3 de *Hordeum vulgare* (AF298231); CBF1 de *Triticum aestivum* (AF376136); CBF2 de *Triticum aestivum* (AY572831); CBF1 de *Oryza sativa* (AF494422); DREB1 de *Thellungiella salsuginea* (AY514018); DREB1 de *Prunus avium* (AB121674); CBF3 de *Lolium perenne* (AY960831); CBF25 de *Capsella bursa-pastoris* (AY491498), CBF1 de *Gossypium hirsutum* (AY321150); CBF1 de *Capsicum annuum* (AY368483), DREB1A de *Schedonorus arundinaceus* (AJ717399) y DREB1A de *Zea mays* (AF450481).

Tabla 3. Relación de identidad de secuencias CBF de diferentes especies

Secuencias comparadas	% de identidad nucleotídica total	% de identidad aminoacídico total	% de identidad dominio AP2
<i>EgCBF / AtCBF1</i>	52,1	51,8	84,5
<i>EgCBF / AtCBF2</i>	55,5	54,5	86,2
<i>EgCBF / AtCBF3</i>	52,5	55,4	87,9
<i>EgCBF / AtCBF4</i>	51,6	53,3	91,4
<i>EgCBF / LeCBF1</i>	53,5	57,8	84,5
<i>EgCBF / LeCBF2</i>	53,5	54,5	86,2
<i>EgCBF / LeCBF3</i>	52,5	55,5	87,9

```

AtCBF1      ---GDYCP TLATS-----C P K K P A G R K K F R E T R H P I Y R G V R Q R - N S G K W V S E V R E P 66
CbpCBF25   ---GDYCP TLATS-----C P K K P A G R K K F R E T R H P I Y R G V R Q R - N S G K W V S E L R E P 72
TsDREB1    ---GDYCP TLATS-----C P K K P A G R K K F R E T R H P I Y R G V R R R - N S G K W V C E V R E P 69
AtCBF4     ---SECSPLASS-----C P K K R A G R K K F R E T R H P I Y R G V R Q R - N S G K W V C E V R E P 72
LeCBF3     ANHSDEEVILASN-----N P K K P A G R K K F R E T R H P V Y R G V R K R - N S G K W V C E V R E P 69
AtCBF3     ANHSDEEVILASN-----N P K K P A G R K K F R E T R H P V Y R G V R K R - N S G K W V C E V R E P 69
CaCBF1     AIFSDEEVILASN-----N P K K P A G R K K F R E T R H P V Y R G V R K R - N S G K W V C E V R E P 79
LeCBF2     YSPNEEVIIILASN-----N P K K P A G R K K F R E T R H P V Y R G I R K R - N S G K W V C E V R E P 81
AtCBF2     YSPNEEVIIILASN-----N P K K P A G R K K F R E T R H P V Y R G I R K R - N S G K W V C E V R E P 81
LeCBF1     -SFSEEEVILASN-----N P K K P A G R K K F R E T R H P I Y R G I R K R - N S G K W V C E V R E P 73
GhCBF1     VNFSD EYV MLASS-----Y P K R P A G R K K F R E T R H P V Y R G V R R R - N P G K W V S E V R E P 74
EgCBF      N-FSGEEVRLASD-----H P K K P A G R K K F R E T R H P V Y R G V R L R - D S G K W V C E V R E P 84
PaDREB1    ASCSDGDVILASS-----R P K K R A G R R V F K E T R H P V Y R G V R R R - N N D K W V C E M R E P 79
HvCBF1     --GFSTYMTVSSA-----P P K R R A G R T K F K E T R H P V Y K G V R R R - N P G R W V C E V R E P 74
LpCBF3     -----QTVWT-----K R P A G R T K F R E T R H P V Y R G V R R R R G N A G R W V C E V R V P 72
SaCBF3     ---HSQKQTAWM-----K R P A G R T K F R E T R H P V F R G V R R R R G N A G R W V C E V R V P 77
OsCBF1     -----QTVWTA-----P P K R P A G R T K F R E T R H P V F R G V R R R R G N A G R W V C E V R V P 70
ZmDREB1A   -----RKAAWPPSTASSPQQPPK R P A G R T K F R E T R H P V F R G V R R R R G A A G R W V C E V R V P 83
HvCBF3     ---SPSSSSVSSSSPEHAARRASP A K R P A G R T K F R E T R H P V Y R G V R R R R G N T E R W V C E V R V P 111
TaCBF1     -----HRTVCSE-----P P K R P A G R T K F R E T R H P L Y R G V R R R R G L G Q W V C E V R V R 57
TaCBF2     -----HRTVWSE-----P P K R P A G R T K F K E T R H P L Y R G V R R R R G P A G R W V C E V R V L 57
HvCBF2     -----YRTVWSE-----P P K R R A G R I K L Q E T R H P V Y R G V R R R R G K V G Q W V C E L R V P 69
          *: *** :*****:::* * :*:*:*

```



```

AtCBF1      -N K K T - R I W L G T F Q T A E M A A R A H D V A A L A L R G R -----S A C L N F A D S A W R L R I P E S ---115
CbpCBF25   -N K K T - R I W L G T F Q T A E M A A R A H D V A A I T L R G R -----S A C L N F A D S A W R L R I P E S ---121
TsDREB1    -N K K S - R I W L G T F P T A E M A A R A H D V A A I A L R G R -----S A C L N F A D S A W R L R I P E S ---118
AtCBF4     -N K K S - R I W L G T F P T V E M A A R A H D V A A L A L R G R -----S A C L N F A D S A W R L R I P E T ---121
LeCBF3     -N K K T - R I W L G T F P T A E M A A R A H D V A A I A L R G R -----S A C L N F A D S A W R L P T P D S ---118
AtCBF3     -N K K T - R I W L G T F P T A E M A A R A H D V A A I A L R G R -----S A C L N F A D S A W R L P T P D S ---118
CaCBF1     -N K K S - R I W L G T F P T A E M A A R A H D V A A I A L R G R -----S A C L N F A D S A W R L P V P A S ---128
LeCBF2     -N K K T - R I W L G T F P T A E M A A R A H D V A A I A L R G R -----S A C L N F A D S V W R L P I P A S ---130
AtCBF2     -N K K T - R I W L G T F P T A E M A A R A H D V A A I A L R G R -----S A C L N F A D S V W R L P I P A S ---130
LeCBF1     -N K K T - R I W L G T F P T A E M A A R A H D V A A L A L R G R -----S A C L N F S D S A W R L P I P A S ---122
GhCBF1     -N K K S - R I W L G T F P K A D M A A R A H D V A A I A L R G K -----S A C L N F A D S A W K L P V P A S ---123
EgCBF      -R K K S - R I W L G T F P T V D M A A R A H D V A A L A L R G R -----S A C L N F A D S A W R L L V P A S ---133
PaDREB1    N K K S - R I W L G T Y P T A E M A A R A H D V A A L A F R G K -----L A C I N F A D S A W R L P V P A S ---129
HvCBF1     -H S K Q - R I W L G T F E T A E M A A R A H D V A A L A L R G R -----A A C L N F A D S P R R L R V P A V G --124
LpCBF3     G R R G S - R L W V G T F D T A E I A A R A H D A A M L A L A A G -----D V C L N F A D S A E L L D M - P A S S ---123
SaCBF3     G R R G S - R L W V G T F D T A E I A A R A H D A A M L A L A A G -----D A C L N F A D S A E L L A V - P A S --127
OsCBF1     G R R G C - R L W L G T F D T A E G A A R A H D A A M L A I N A G G G G G G A C C L N F A D S A W L L A V - P R S --126
ZmDREB1A   G R R G A - R L W L G T Y L A E A A A R A H D A A I L A L Q G R G -----A G R L N F P D S A R L L A V P P P S A -136
HvCBF3     G K R G A - R L W L G T Y T A E V A A R A N D A A M L A L G G R S -----A T C L N F A D S A W L L A V --P S A -162
TaCBF1     G A Q G Y - R L W L G T F T T A E M A A R A H D S A V L A L L D R -----A A C L N F A D S A W R M L P V L A A G S 110
TaCBF2     G M R G S - R L W L G T F T T A E M A A R A H D A A V L A L S G R -----A A C L N F A D S A W R M L P V L A G --108
HvCBF2     V S R G Y S R L W L G T F A N P E M A A R A H D S A A L A L S G H -----D A C L N F A D S A W R M M P V H A T G S 123
          *:*:*:* : *:*:* * * :*: :*:*:* :*:*:* :

```

Figura 7. Alineación de diferentes proteínas CBF.

Comparación de una parte de las secuencias aminoacídicas de los genes CBF de diferentes especies: At: *Arabidopsis thaliana*, Cpb: *Capsella bursa-pastoris*, Ts: *Thellungiella salsuginea*, Le: *Lycopersicon esculentum*, Ca: *Capsicum annum*, Gh: *Gossypium hirsutum*, Eg: *Eucalyptus globulus*, Pa: *Prunus avium*, Hv: *Hordeum vulgare*, Lp: *Lolium perenne*, Sa: *Schedonorus arundinaceus*, Os: *Oryza sativa*, Zm: *Zea mays*, Ta: *Triticum aestivum*. Los residuos de color azul representan al dominio AP2, la zona amarilla a las secuencias señal CBF, los residuos dentro de la caja azul corresponden a val 14 y glu 19 y en rojo se destaca una secuencia altamente conservada dentro del dominio AP2. "." indica aminoácidos conservados, ":" indica sustituciones conservadas, "." indica sustituciones semi-conservadas

AtCBF1 --ETMVEAIYT-----PEQSEGA**FYMDEETMFGMPTLLDNMAEGMLLPPPSVQWNHNYDG** 202
 CbpCBF25 --ETMVEATVT-----PEQSD-SLYIDEEAM**FGMPSFLDSMAEGMLLPPPSVQWNTNYDV** 212
 TsDREB1 --ETTVEVIVT-----EEEQSEG**FYMDEEAMFGMPRLLANMAEGMLLPPPSVQWGHNYDC** 205
 AtCBF4 --EAAGEGVREGERRAEEQNGGV**FYMDEEALLGMPNFFENMAEGMLLPPPEVQWNHN-DF** 211
 LeCBF3 ---TTPDDM-----**FFMDEEALFCMPGLLTNMAEGLMVPPPQCTEMGDH-V** 193
 AtCBF3 ---TTPDDM-----**FFMDEEALFCMPGLLTNMAEGLMVPPPQCTEMGDH-V** 193
 CaCBF1 ---STPESM-----**FFMDEEALFCMPGLLTNMAEGLMLPPPQCAEIGDH-V** 201
 LeCBF2 ---NVQESS-----DFVDEEAL**FMPGLLANMAEGLMLPPPQCLEIGDHV** 204
 AtCBF2 ---NVQESS-----DFVDEEAL**FMPGLLANMAEGLMLPPPQCLEIGDHV** 204
 LeCBF1 ---NVQESS-----DFVDEEAI**FMPGLLANMAEGLMLPPPQCAEMGDHCV** 196
 GhCBF1 ---TEMEKG-----**FYLDEEALFGTQRFWANMAAGMMSPPRS**GHDDGGWEE 202
EgCBF --EVAFGRG-----SVVDKEDI**FGMPGLLANMAEGMLLFPPECSGDIYAGL** 207
 PaDREB1 KGSVNLERSRS-----LSLSY**WDEEEVFHMPRLLDHMAEGLLLSPSQCLGG-YMNL** 224
 HvCBF1 ---MQFAGDP-----YYGMDDGMD**FGMQGYLD-MAQGMLIAPPPLVGPSATAG** 204
 LpCBF3 --ESS-----TPFELD-----VLSDMG--WDL--YYASLAQG-**MLMSSPFLAASAALG** 206
 SaCBF3 --EASSQADNSPFELE-----VLSDMG--WDL--YYSSLAQ**GMMLMAPPFLAASAALG** 221
 OsCBF1 GDESSSPASDLAFELD-----VLSDMG--WDL--YYASLAQG-**MLMEPP----**SAALG 223
 ZmDREB1A EHVVPVKADEAVALDLGDVDFGPDWFGDMG--LELDAYYASLAEG-**LLVEPPPPPAAWDHG** 251
 HvCBF3 STGTSEPSANGVFEGPVVMDSEMFRLLDFPEMDLGSYYMSLAEAL**LMDDPPPTATI IHAYE** 275
 TaCBF1 --TPSELSTSSDLLDEH-----WFGGMD----AGSYYASLAQ**GMLEPPSARTWSE**DGG 201
 TaCBF2 --APSALFMSSELLNEH-----WFGGMD----AGSFYS---EGLFMESPDTRPWRED-L 199
 HvCBF2 --TPITSSDLSGLDDEH-----WIGGMD----AGSYYASLAQ**GMLEPPAAGGWREDDG** 206

. : .

AtCBF1 EGDGD----V**SLWSY**---- 213
 CbpCBF25 DGDDD----L**SLWSY**---- 223
 TsDREB1 DGDAD----V**SLWSY**---- 216
 AtCBF4 DGVGD----V**SLWSFDE**-- 224
 LeCBF3 EAD-----DM**PLWSYSI**-- 205
 AtCBF3 EAD-----DM**PLWSYSI**-- 205
 CaCBF1 ETADA---DT**PLWSYSI**-- 215
 LeCBF2 ELADVHAYMP-**LWNYSI**-- 220
 AtCBF2 ELADVHAYMP-**LWNYSI**-- 220
 LeCBF1 ETD---AYMIT**LWNYSI**-- 210
 GhCBF1 HEVDD---YV**PLWSYSI**-- 216
EgCBF DDGNL-DAYAS**LWSYSM**-- 223
 PaDREB1 DDMGT-DADV**KLWSFSI**-- 240
 HvCBF1 DGDDD--GEV**SLWSY**---- 217
 LpCBF3 DYGEANLADV**PLWSYLS**-- 223
 SaCBF3 DYGEVNLADV**PLWSYQS**-- 238
 OsCBF1 DDGDAILADV**PLWSY**---- 238
 ZmDREB1A DCCDSGAADVA**LWSYY**--- 267
 HvCBF3 DNGDGG-ADV**LWSYSVDM** 293
 TaCBF1 EYSA---VYTP**LWN**----- 212
 TaCBF2 ELCG---VETPP**WSY**LFD- 214
 HvCBF2 EHDDGFSTST**SLWSY**---- 221

* .

Figura 8. Alineación correspondiente al extremo carboxilo terminal de diferentes proteínas CBF.

Comparación del extremo carboxilo terminal de las secuencias aminoácidas de los genes CBF de diferentes especies: At: *Arabidopsis thaliana*, Cpb: *Capsella bursa-pastoris*, Ts: *Thellungiella salsuginea*, Le: *Lycopersicon esculentum*, Ca: *Capsicum annum*, Gh: *Gossypium hirsutum*, Eg: *Eucalyptus globulus*, Pa: *Prunus avium*, Hv: *Hordeum vulgare*, Lp: *Lolium perenne*, Sa: *Schedonorus arundinaceus*, Os: *Oryza sativa*, Zm: *Zea mays*, Ta: *Triticum aestivum*. Los residuos de color rojo representan los motivos hidrofóbicos conservados con respecto a la secuencia CBF1 de *A. thaliana*. "." indica aminoácidos conservados, ":" indica sustituciones conservadas, "." indica sustituciones semi-conservada

3.2.3 Árbol filogenético

Con el fin de estudiar la relación filogenética de la proteína del gen tipo-CBF de *E. globulus* con respecto a otras proteínas CBF descritas en la literatura, se construyó un árbol filogenético. Se consideraron para este análisis las mismas secuencias aminoacídicas de genes CBF descritas en la sección 3.2.2. Los alineamientos de las secuencias se realizaron mediante el programa ClustalW y el árbol filogenético fue construido con el programa MEGA 3.0, por el método de neighbour-joining con 15000 réplicas (Figura 9). El árbol filogenético construido mostró una clara separación entre las especies monocotiledóneas, agrupadas en la parte inferior del árbol, de las especies dicotiledóneas ubicadas en la parte superior. La secuencia de la proteína tipo-EgCBF se ubicó entre las dicotiledóneas, pero en una rama independiente, junto a la secuencia DREB1 de cerezo (*PaDREB1*, *Prunus avium*). Cabe destacar que estas son las únicas secuencias proteicas disponibles en bases de datos publicados, provenientes de especies leñosas.

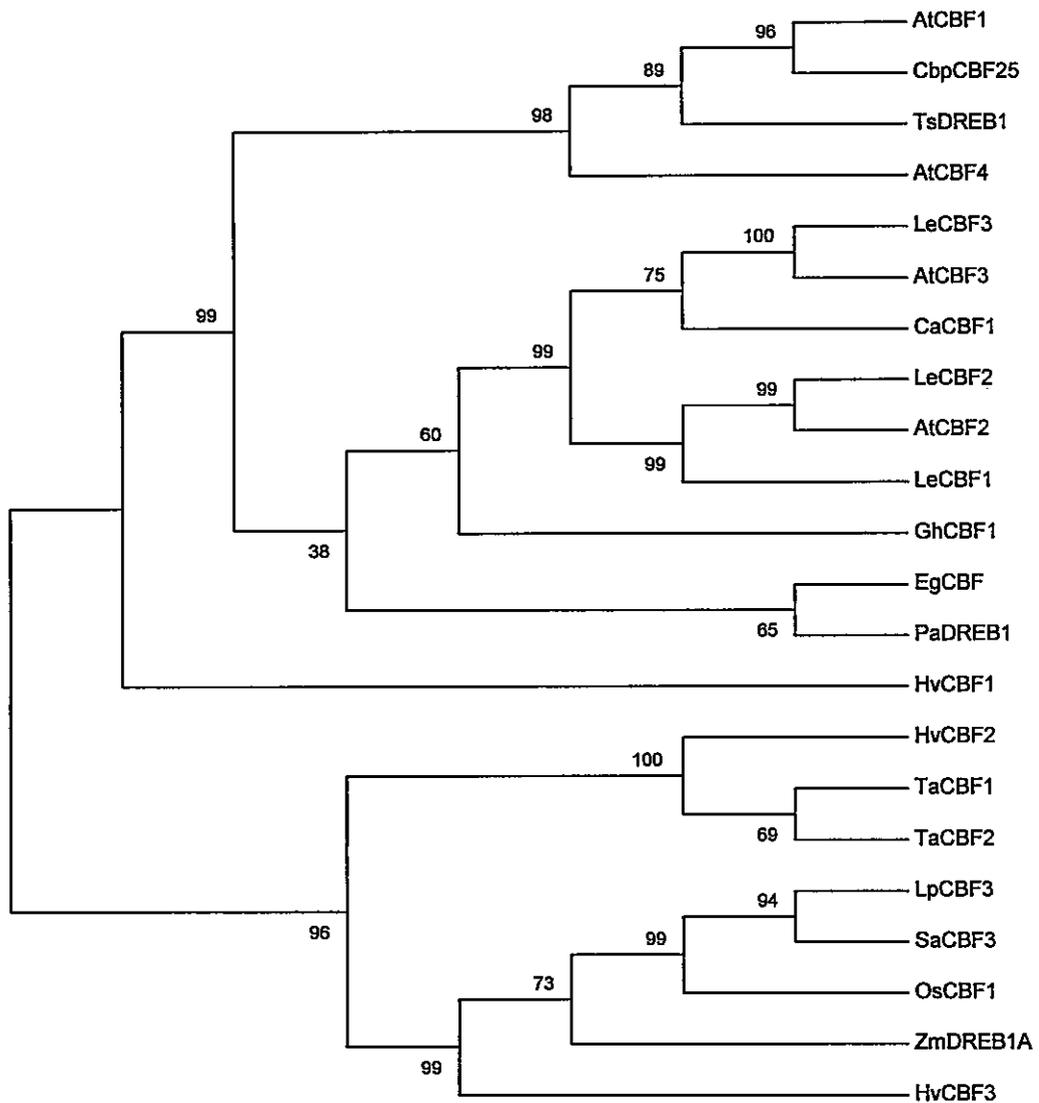


Figura 9. Relación filogenética generada a partir de secuencias aminoacídicas de las proteínas CBF

Le: *Lycopersicon esculentum*, At: *Arabidopsis thaliana*, Gh: *Gossypium hirsutum*, Cpb: *Capsella bursa-pastoris*, Ts: *Thellungiella salsuginea*, Pa: *Prunus avium*, Eg: *Eucalyptus globulus*, Hv: *Hordeum vulgare*, Lp: *Lolium perenne*, Sa: *Schedonorus arundinaceus*, Os: *Oryza sativa*, Ta: *Triticum aestivum*, Zm: *Zea mays*, Ca: *Capsicum annum*. Los números indican los resultados del bootstrap

3.3 Caracterización del gen tipo- CBF de *Eucalyptus globulus*

Una vez que se obtuvo el gen tipo-*Eg*CBF y se confirmó su secuencia, se consideró de interés realizar experimentos con el objeto de estudiar su grado de expresión bajo diferentes condiciones de estrés abiótico, analizar el número de copias presentes en el genoma de *E. globulus* y clonar este gen bajo el control de un promotor fuerte dentro de un sistema heterólogo tal como *A. thaliana*. Estos experimentos se consideran como un primer paso para futuros estudios relacionados con la funcionalidad del gen tipo-*Eg*CBF en *E. globulus*.

3.3.1 Copias del gen tipo-*Eg*CBF dentro del genoma de *Eucalyptus globulus*

El número de copias del gen tipo-*Eg*CBF en el genoma de *E. globulus*, se estableció mediante la técnica de *Southern blot*. Como se describió en la sección 2.26, 10µg de ADN genómico de *E. globulus* se digirieron con tres endonucleasas de restricción que no cortaran dentro de la secuencia del gen tipo-*Eg*CBF, escogiendo *EcoR* I, *Hind* III y *BamH* I (Figura 10A). La sonda utilizada para realizar el *Southern blot* fue el mismo gen tipo-CBF de *E. globulus* amplificado por PCR con los partidores específicos, 5'*Eg*CBF1 F y 3'*Eg*CBF1 R (Tabla 2), sección 2.25. La membrana de nitrocelulosa se hibridó con la sonda marcada radiactivamente por 16 h a 42°C para posteriormente ser lavada, aumentando en cada lavado la estrictez, de acuerdo a las siguientes condiciones:

1. 1x SSC, SDS 0,1%, 20min a 42°C
2. 0,1x SSC, SDS 0,1%, 20min a 42°C
3. 0,1x SSC, SDS 0,1%, 20min a 50°C

A continuación de cada lavado la membrana se expuso a una placa fotográfica durante 72 h, observándose en todos los casos el mismo resultado, la presencia de más de una banda en cada carril (Figura 10B). En la digestión con *EcoR* I las bandas obtenidas son de aproximadamente 4300 y 1300 pares de bases, mientras que en la digestión con *Hind* III, las

bandas obtenidas son de aproximadamente 2500 y 1000 pares de bases, considerándose la banda de mayor peso molecular como digestión parcial del ADN genómico. Por último en la digestión con *BamH* I, las bandas generadas son de aproximadamente 4500 y 2300 pares de bases (Figura 10B). Este resultado sugiere la presencia de más de una copia del gen tipo-*EgCBF* en el genoma de *E. globulus*

Como un control de la sensibilidad del *Southern blot* se realizó un *Dot blot* (Figura 10C). Para esto se depositó sobre la membrana de nitrocelulosa 1µL de diluciones crecientes de ADN plasmidial que contenía el gen tipo-*EgCBF* utilizado como sonda (1, 1/10, 1/100 y 1/1000), con lo cual se estimó que nuestro *Southern blot* fue capaz de detectar hasta una concentración de 2,5 ng/µL de ADN, es decir, aproximadamente 1000 veces menos de la cantidad inicial de ADN que se utilizó en la digestión.

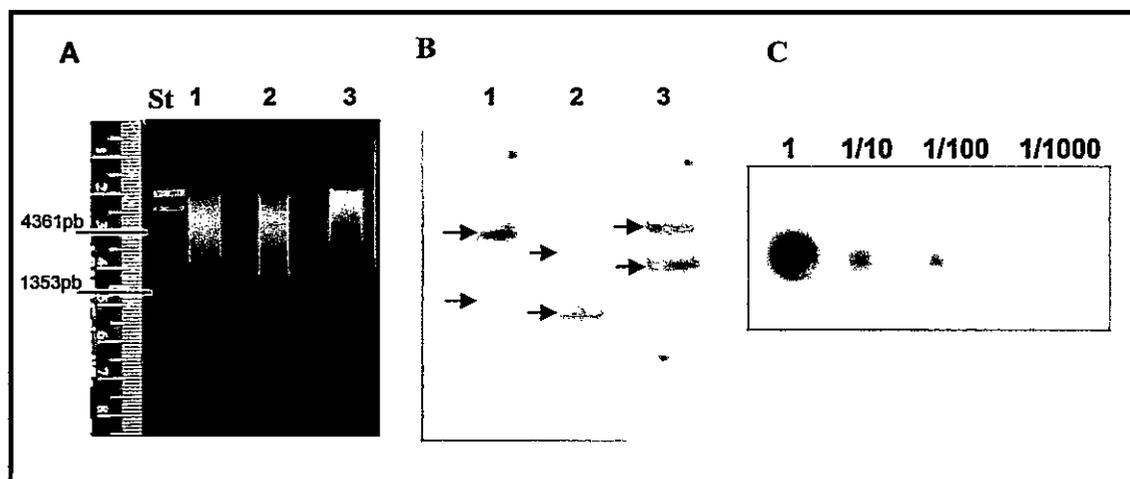


Figura 10. Análisis de ADN genómico de *E. globulus* con la sonda tipo-*EgCBF*

A. Gel de agarosa al 1%, estándar de peso molecular $\lambda\Phi$. **B.** Placa fotográfica luego de realizada la hibridación de la membrana de nitrocelulosa con la sonda de tipo-*EgCBF*. **C.** *Dot blot*, con las diferentes cantidades de ADN plasmidial conteniendo el gen tipo-*EgCBF*. Carriles 1, 2 y 3 ADN genómico de *E. globulus* digerido con las enzimas de restricción *EcoR* I, *Hind* III y *BamH* I respectivamente.

3.3.2 Estudio de la expresión del gen tipo-*EgCBF*

Una vez que se identificó el gen tipo-CBF de *E. globulus*, fue interesante estudiar como se expresaban los transcritos de éste gen, por lo tanto, se utilizó la técnica de RT-PCR como una forma semi cuantitativa de estudio de la expresión de los transcritos del gen tipo-*EgCBF* en plantas de *E. globulus* sometidas a diferentes condiciones de estrés medioambiental. Se extrajo ARN de plántulas de 2 meses de vida de *E. globulus* bajo tres condiciones diferentes: 30 min de frío (4°C), 30 min de sequía (exponiendo las raíces de las plántulas al aire) y 30 min de sal (las raíces de las plántulas fueron sumergidas en una solución de NaCl 250mM). Este ARN fue cuantificado en un gel de agarosa, con el propósito de establecer su calidad y concentración aproximada mediante el análisis de la intensidad de las bandas ribosomales observadas. La transcripción reversa se realizó con el partidador específico 3'*EgCBF1 R* (Tabla 2), utilizando cantidades similares de ARN (Figura 11A). Para confirmar la calidad del ADN complementario generado, se realizó una amplificación con partidores específicos para el gen constitutivo histona H4 (Tabla 2)(Figura 11B). Posteriormente el PCR se realizó con los partidores específicos de *E. globulus*, 5'*EgCBF1 F* y 3'*EgCBF1 R*. El PCR fue realizado como se describió en la sección 2.17, con 35 ciclos de amplificación. El número de ciclos fue previamente establecido por medio de una serie de reacciones de PCR con distintos números de ciclos hasta obtener una banda amplificada, correspondiente al gen tipo-*EgCBF*, que no presentara saturación.

El resultado del RT-PCR bajo distintos tipos de estrés abiótico, dio un fragmento amplificado de 750 pares de bases correspondiente al tamaño del gen tipo-*EgCBF* solamente en la muestra sometida a 4°C durante 30 min, con lo cual se demostró que el gen tipo-*EgCBF* se expresó únicamente en las plántulas sometidas a frío y no a las otras condiciones de estrés, sequía y salinidad (Figura 11C).

Por lo tanto, el siguiente paso fue estudiar la expresión del gen tipo-*EgCBF* en plántulas de *E. globulus* sometidas a diferentes tiempos de frío: 0, 15, 30 y 45 min a 4°C. Para esto se realizó una extracción de ARN en estas condiciones (Figura 11D) y el RT se llevó a cabo utilizando la misma cantidad de ARN en cada reacción de transcripción reversa con el partidor específico 3'*EgCBF1* R. A partir del ADN complementario generado se realizó la amplificación del gen de histona H4 con partidores específicos (Tabla 2)(Figura 11E).El PCR posterior se realizó utilizando los partidores 5'*EgCBF1* F y 3'*EgCBF1* R (Tabla 2). El resultado de este RT-PCR dio la amplificación de bandas del tamaño esperado, es decir 750 pares de bases, en los carriles 2 y 3, a partir de lo cual se puede concluir que el transcrito del gen tipo-*EgCBF* aumentó su expresión a los 15 min de estar la planta sometida a frío con un máximo en la expresión a los 30 min, decayendo a los 45 min de tratamiento (Figura 11F). Cada reacción de RT-PCR en ambos experimentos fue realizada en triplicado a partir de un ARN original, obteniéndose resultados idénticos en cada caso.

Finalmente, en base a nuestros resultados se puede concluir que la expresión del gen tipo-*EgCBF* está sujeta a activación a baja temperatura y que se expresa durante la primera media hora de ser sometidas las plantas de *E. globulus* a estrés de frío.

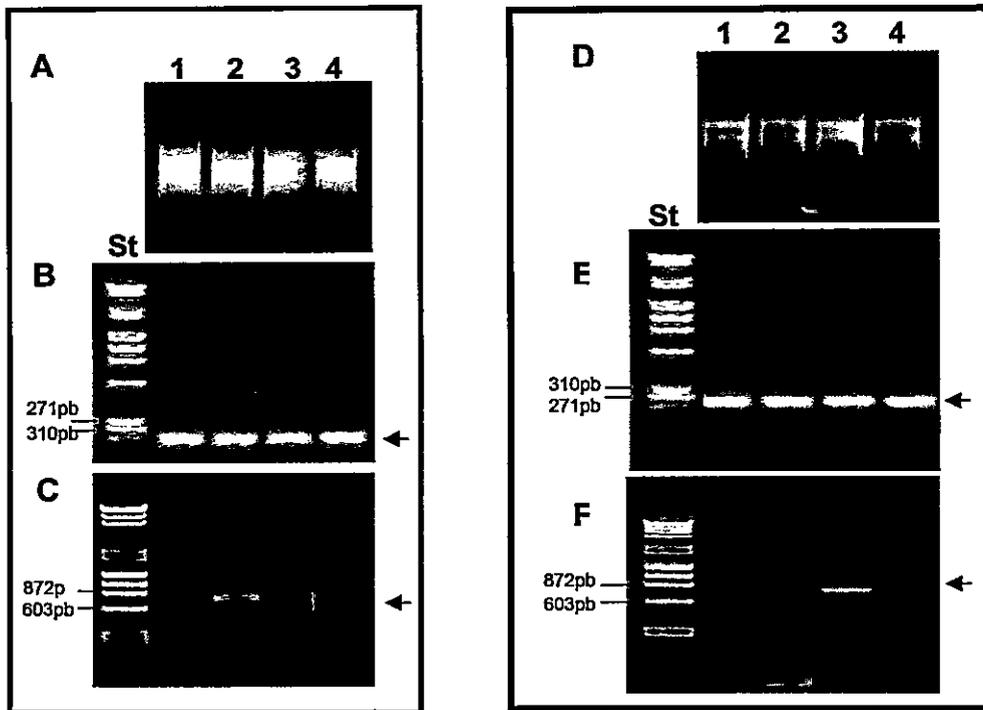


Figura 11. Análisis electroforético de ARN y de la expresión del gen tipo-EgCBF en plantas de *E. globulus* sometidas a diferentes tipos de estrés abióticos.

Electroforesis en geles de agarosa al 1%, estándar de peso molecular λ/Φ

A. ARN de plántulas de *E. globulus* extraído bajo diferentes condiciones, carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a la muestra control, sometida a 30 min de frío, sequía y exceso de sal, respectivamente. **B.** RT-PCR con los partidores específicos para el gen histona H4, a partir del ADN complementario generado a partir del ARN extraído en las diferentes condiciones descritas en A. **C.** RT-PCR con los partidores específicos para el gen tipo-EgCBF **D.** ARN de plántulas de *E. globulus* sometidas a diferentes tiempos de exposición al frío, carril 5, 6, 7 y 8 corresponden a 0, 15, 30, y 45 min de frío (4°C). **E.** RT-PCR con los partidores específicos para el gen histona H4, a partir del ADN complementario generado a partir del ARN extraído en las diferentes condiciones descritas en D. **F.** RT-PCR del ADN complementario generado a partir del ARN extraído en los diferentes tiempos de frío descritos en D.

3.3.3 Estrategia de clonamiento del vector binario pBIN19 con el gen tipo-EgCBF bajo el promotor fuerte CaMV 35S

Con el propósito de estudiar la posible función del gen tipo-CBF de *E. globulus* aislado en este trabajo, se planteó como objetivo la transformación de una planta heteróloga y estudiar el efecto producido por la expresión del gen tipo-EgCBF en ella. Para esto se utilizó como

planta modelo *A. thaliana*, con el gen tipo-*EgCBF* bajo el control de un promotor constitutivo. Con este fin se diseñó una estrategia de clonamiento (Figura 12) con el propósito de crear un constructo donde el gen tipo-*EgCBF* estuviera bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) dentro de un vector binario. Con este objetivo se utilizó el vector PUCpSS (Figura 2), el cual posee un doble promotor CaMV 35S y a continuación el terminador CaMV. Se diseñaron partidores basados en la secuencia tipo-*EgCBF* que incluyen en sus extremos sitios de reconocimiento para las endonucleasas *EcoR* I y *BamH* I respectivamente (Tabla 2). Con estos partidores se realizó un PCR y el amplificado obtenido fue clonado en pGEM-T, confirmando mediante la secuenciación a partir de ambos extremos la correcta amplificación del gen tipo-*EgCBF*. A partir de éste se extrajo el gen tipo-*EgCBF* a través de una digestión con las enzimas de restricción antes mencionadas, para posteriormente clonarlo en la orientación correcta en el vector PUCpSS entre el doble promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S.

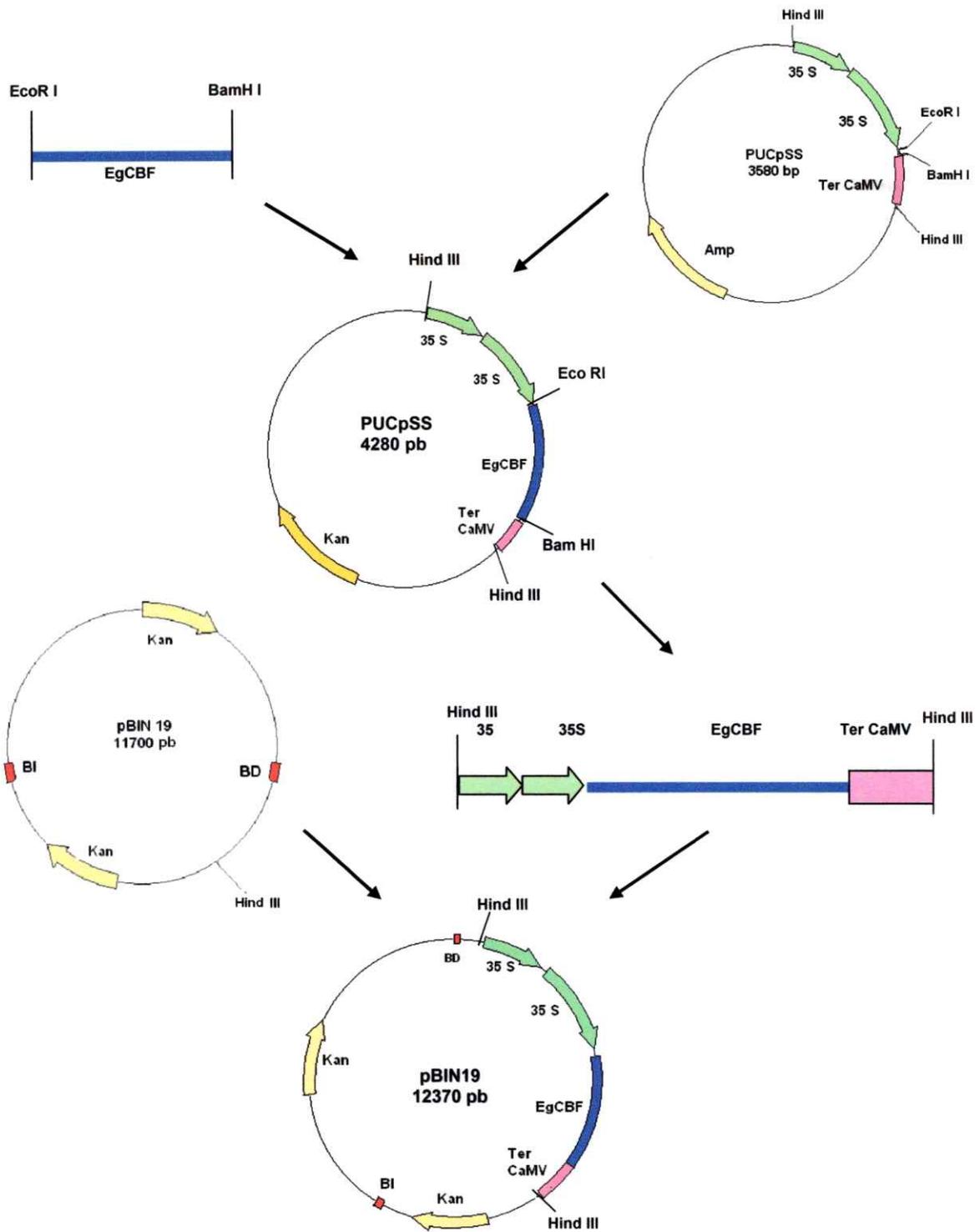


Figura 12. Estrategia de construcción del vector binario pBIN19 con el gen *EgCBF*.

Estrategia seguida para la construcción del vector binario pBIN19 conteniendo el gen tipo-*EgCBF* bajo el control de un promotor fuerte *CaMV 35S*

Una vez confirmada la orientación del gen tipo-*EgCBF* en el vector PUCpSS, mediante PCR utilizando un partidador específico para el promotor más el partidador específico para el extremo 3' del gen (Tabla 2), se realizó una digestión de dicho vector utilizando la endonucleasa de restricción *Hind* III. El resultado de esta digestión produjo la liberación del constructo de interés, es decir, promotor CaMV 35S /tipo-*EgCBF*/ terminador CaMV 35S, correspondiente a una banda de aproximadamente 1700 pares de bases (Figura 13A)

El constructo de interés fue clonado en el vector binario pBIN19 previamente digerido con la endonucleasa de restricción *Hind* III y desfosforilado. La integridad del constructo dentro del vector binario fue confirmada mediante digestión con la enzima *Hind* III, con lo cual se obtuvo una banda de alto peso molecular correspondiente al vector lineal más una banda de 1700 pares de bases correspondiente al inserto liberado (Figura 13B).

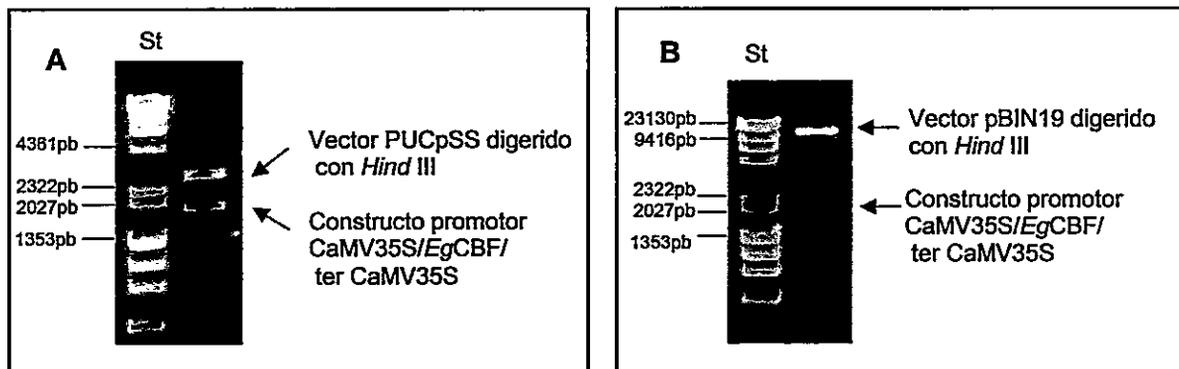


Figura 13. Confirmación de la integridad del constructo promotor CaMV 35S/tipo-*EgCBF*/ter CaMV 35S en PUCpSS y en pBIN19.

Electroforesis en geles de agarosa al 1%, st λ Φ. **A.** Digestión del vector PUCpSS que contenía el gen tipo-*EgCBF* bajo el control del promotor CaMV 35S con la enzima de restricción *Hind* III, que permite la liberación del cassette completo. **B.** Digestión del vector pBIN19 transformado con el constructo de interés con la enzima *Hind* III.

3.3.4 Transformación de *Arabidopsis thaliana* y selección de semillas transgénicas

Una vez que el constructo de interés, es decir, el gen tipo-EgCBF bajo el control del promotor CaMV 35S, fue clonado en el vector binario pBIN19, se transformó *A. tumefaciens* como se describió en la sección 2.28, para posteriormente transformar *A. thaliana*. La integridad del gen tipo-EgCBF dentro de *A. tumefaciens* fue confirmada mediante PCR con los partidores específicos para el gen tipo-CBF de *E. globulus* 5'EgCBF1 F y 3'EgCBF1 R (Tabla 2), obteniéndose el fragmento amplificado del tamaño esperado de 750 pares de bases (Figura 14). Posteriormente *A. tumefaciens* conteniendo el vector binario con el constructo de interés, se utilizó para transformar *A. thaliana* por el método de inmersión floral (sección 2.29). Un total de 16250 semillas desarrolladas por las plantas sometidas a transformación, fueron seleccionadas en medio suplementado con Kan (75µg/mL) (Figura 15), como control de la transformación se utilizó un vector binario pBIN19 vacío, con el cual se transformó plantas de *A. thaliana* y se recolectaron sus semillas, sin embargo, hasta la fecha aún no se realiza la selección de éstas. Como resultado de la selección de las semillas de las plantas transformadas con el constructo que contiene el gen tipo-CBF de *E. globulus* se obtuvieron 85 plantas resistentes al antibiótico, lo cual representa una eficiencia de transformación del 0,5%, (Tabla 4).

Tabla 4. Recuento de transformación de *A. thaliana*

Resumen del número de semillas transformadas y resistentes al antibiótico de selección (Kan 75ug/mL).

Construcción	# de semillas sometidas a selección	# de plantas resistentes a Kan (T1)	% de eficiencia en la transformación
pBIN19 / <i>EgCBF</i>	16250	85	0,5

A partir de 10 plantas, escogidas al azar, que fueron resistentes al antibiótico (Kan 75µg/mL) y 2 plantas silvestres, se amplificó mediante PCR (Figura 16), con el fin de confirmar en las plantas resistentes la presencia del transgen y en las silvestres la ausencia de éste. Para esto se amplificó el constructo de interés a partir de ADN genómico extraído de hojas de la roseta de las plantas (sección 2.23). Se utilizaron las siguientes combinaciones de partidores para la confirmación del transgen en *A. thaliana*:

- CaMV 35S F + 3'*EgCBF1* R (1), cuyo amplificado fue un fragmento de aproximadamente 840 pares de bases correspondiente al tamaño del gen tipo-*EgCBF* más 170 pares de bases del promotor CaMV 35S.
- 5'*EgCBF1* F + Ter CaMV35S R (2), los que dan un amplificado de aproximadamente 1000 pares de bases correspondientes al gen tipo-*EgCBF* más 241 pares de bases del terminador CaMV 35S

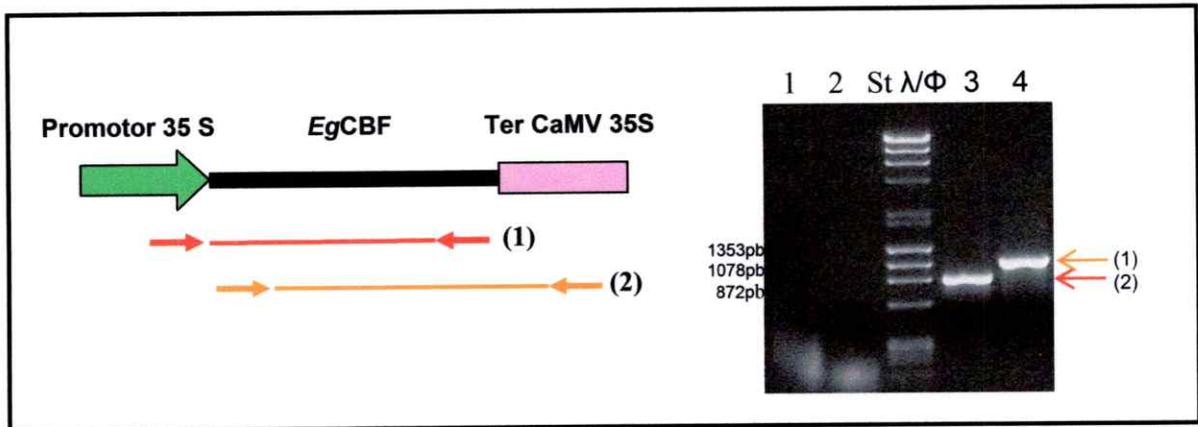


Figura 16. Análisis mediante PCR de plantas transgénicas

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, estándar $\lambda\Phi$. Carriles 1 y 2, amplificación de plantas silvestres mediante PCR (controles negativos de amplificación). Carriles 3 y 4, plantas transformadas resistentes a Kan fueron corroboradas mediante PCR. Las parejas de partidores utilizados fueron: 35S / 3'EgCBF R (1) y 5'EgCBF F / Ter CaMV35S (2)

Las plantas capaces de crecer en medio de selección y cuya condición de transgénica fue confirmada mediante PCR en algunas de ellas, fueron traspasadas a tierra y mantenidas en condiciones de invernadero (Figura 17). Como se puede apreciar en esta figura, las plantas transgénicas de 4 semanas de crecimiento muestran un desarrollo aparentemente normal tanto en color y forma, sin embargo, el tamaño de dichas plantas es mucho menor en comparación a una planta de *A. thaliana* silvestre. Todas las plantas transgénicas presentaron el mismo fenotipo descrito en la figura 17, a partir de lo cual podemos concluir que este fenotipo es producto de la sobre expresión del gen tipo-CBF de *E. globulus* y no debido a la interrupción de un gen de crecimiento producto de la inserción al azar del gen tipo-EgCBF.

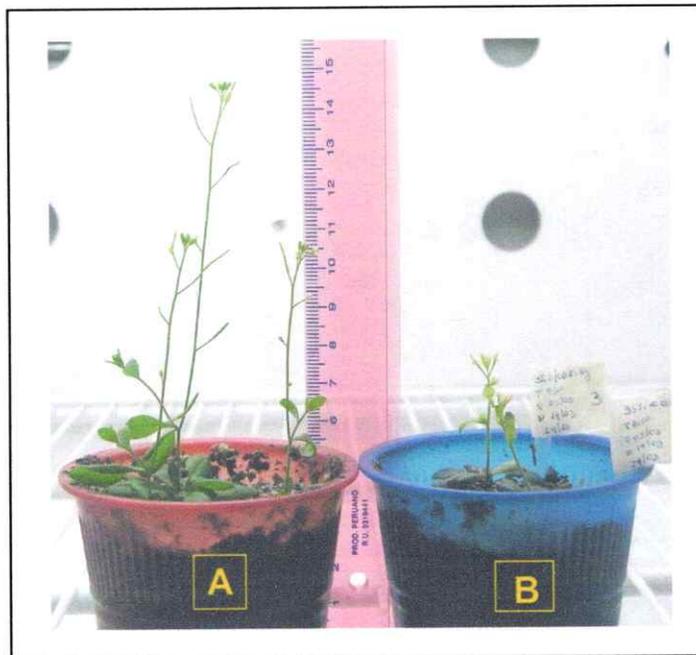


Figura 17. Plantas de 4 semanas de crecimiento de *A. thaliana* silvestres y transformadas

(A) Plantas de *A. thaliana* silvestre y en (B) plantas de *A. thaliana* transformadas con el constructo promotor CaMV 35S/tipo-EgCBF/ Terminador CaMV 35S. Las condiciones de invernadero son 16 h de luz a 22°C.

Las plantas de *A. thaliana* transformadas con el constructo de interés confirmadas como transgénicas, han sido mantenidas en condiciones de invernadero en tierra, con el fin de que éstas desarrollen las vainas con semillas maduras para su recolección. Posteriormente las semillas recolectadas (T2), se deben crecer hasta que las plantas T2 formen sus semillas maduras, las cuales nuevamente deben ser recolectadas, siendo éstas últimas las semillas que darán origen a la generación T3 de plantas transgénicas de *A. thaliana*. Es en esta generación de plantas transgénicas en donde se deben realizar los experimentos de estudios fenotípicos de respuesta a condiciones medioambientales estresantes y estudios de

expresión de genes blanco de los factores de transcripción CBF, con el fin de probar la posible función del gen tipo-*EgCBF* en *A. thaliana*.

Estos experimentos requieren en forma mínima 120 días adicionales y es por esto que se decidió completar esta memoria con los resultados obtenidos en la generación T1 de *A. thaliana*, sin embargo, esta investigación sigue en curso en el laboratorio.

4 DISCUSIÓN

En distintas especies se ha demostrado que la aclimatación al frío involucra la acción de la vía activada por los genes CBF. Estos genes tienen una alta homología de secuencia especialmente en el dominio de unión al ADN denominado AP2. Cabe destacar que este dominio no es único de las proteínas CBF sino que está presente en muchas proteínas de unión al ADN, encontrándose en *A. thaliana* más de 140 proteínas que poseen este dominio (Okamuro y col., 1997; Riechmann y col., 1998).

La secuencia de la proteína tipo-CBF de *E. globulus* deducida del gen correspondiente durante el desarrollo de esta memoria, está compuesta por 223 aminoácidos, posee una identidad de 55,4% con la proteína CBF3 de *A. thaliana*. Este grado de identidad es similar a lo ya descrito anteriormente para proteínas CBF de otras especies, tales como, arroz y trigo que muestran un 30% y 34% de identidad respectivamente con la proteína CBF1 de *A. thaliana* (Jaglo y col., 2001), mientras que las proteínas CBF de tomate tienen entre 51 y 59% de identidad con las proteínas CBF de *A. thaliana* (Zhang y col., 2004). En el caso de proteínas CBF de *Brassica napus* se observa aproximadamente un 76% de identidad con CBF1 de *A. thaliana* (Jaglo y col., 2001), lo que es esperable ya que *Arabidopsis* pertenece a la familia de las Brassicaceas. Por el contrario dentro de las especies analizadas en este estudio, las monocotiledóneas arroz y maíz son las que presentan valores de identidad más bajos.

Dentro del dominio AP2 de la proteína tipo-CBF de *E. globulus* se encuentran dos aminoácidos altamente conservados, valina 14 y ácido glutámico 19 (Figura 6 y7). Se ha descrito que estos residuos juegan un rol fundamental en el reconocimiento y unión del dominio AP2 a la secuencia blanco de ADN (Sakuma y col., 2002). Sin embargo, el residuo 19 en algunas especies, especialmente monocotiledóneas, es reemplazado por una valina

(Figura 7). Este resultado concuerda con publicaciones que han descrito que valina 14 es más importante durante el reconocimiento del ADN que el residuo 19 (Sakuma y col., 2002).

Existen secuencias aminoacídicas ubicadas río arriba y río abajo del dominio AP2, las cuales están presente sólo en las proteínas CBF, denominadas "secuencias señal CBF" (Jaglo y col., 2001). Estas secuencias son altamente conservadas en la mayoría de las especies donde se ha descrito un gen tipo-CBF, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas. La proteína tipo-CBF de *E. globulus* también posee estas secuencias señal CBF. Cabe destacar que las proteínas de especies monocotiledóneas como CBF1 de cebada (*Hordeum vulgare*), CBF3 de una variedad de pasto (*Lolium perenne*), CBF3 de festuca (*Schedonorus arundinaceus*) y DREB1A de maíz (*Zea mays*) presentan la "secuencia señal CBF" río abajo al dominio AP2 con algunas sustituciones poco conservadas (Figura 7). La función de estas secuencias señal aún no ha sido determinada, no obstante, la función de los genes CBF señalados anteriormente ha sido confirmada mediante la transformación en *A. thaliana*, siendo en todos los casos capaz de generar una mayor respuesta a estrés e inducir la expresión de genes blanco de los factores de transcripción CBF. Por lo tanto, se podría inferir que los cambios en estas secuencias señal CBF río abajo del dominio AP2 no tendrían un efecto fundamental en estos procesos.

En el extremo carboxilo terminal de la proteína tipo-*Eg*CBF se encuentran varios motivos hidrofóbicos, como por ejemplo el formado por los residuos LWSY, los cuales ha sido recientemente descrito que son fundamentales su función como activador transcripcional dentro de la proteína CBF1 de *A. thaliana* (Wang y col., 2005). Al realizar un análisis de las secuencias se puede observar que algunos de estos motivos no presentan una conservación elevada en las diferentes proteínas CBF de las diferentes especies, sin embargo, los aminoácidos son reemplazados por otros que mantienen la misma característica funcional

(Figura 9). Estos motivos se han descrito con una función redundante dentro de la proteína CBF1 de *A. thaliana*, siendo necesario mutar por lo menos 3 de estos motivos para eliminar la función activadora de la proteína CBF. Finalmente en base a esto se podría decir que estos motivos son importantes para la unión de otros factores y de la proteína RNA polimerasa II para comenzar la transcripción.

Como resultado del PCR a partir de ADN genómico (Figura 5), se obtuvo un fragmento amplificado que al ser secuenciado presentó la misma la secuencia obtenida a partir de ADN complementario. Este resultado nos lleva a concluir que el gen tipo-CBF de *E. globulus* no posee intrones en su estructura, característica que es compartida con otros genes CBF, como en *Arabidopsis thaliana* y *Lycopersicon esculentum*, donde estos genes, se encuentran en tandem sin presentar intrones en ninguna de sus secuencias, dato que puede comprobarse analizando las secuencias en los números de acceso AF076155 y AY497899 respectivamente.

Al analizar el resultado obtenido del árbol filogenético (Figura 9) se observó que la proteína tipo-CBF de *E. globulus* formó una rama independiente dentro de las dicotiledóneas junto con la proteína DREB1 de cerezo (*Prunus avium*), con la cual tiene un 51,0% de identidad aminoacídica. Este resultado es esperable ya que estas son las dos únicas secuencias de especies leñosas presente en este estudio. Cabe destacar que estas dos especies agrupadas en una misma rama del árbol filogenético, presentan las secuencias señal CBF completamente conservadas (Figura 7). Otro aspecto interesante es la presencia en ramas distintas de las diferentes proteínas CBF de *A. thaliana*, *L. esculentum* y *H. vulgare*. Esto puede deberse a que existe mayor similitud entre genes ortólogos que parólogos, lo que sugeriría que los genes CBF provendrían de un gen ancestral común que se duplicó

tempranamente durante el proceso evolutivo, previo a la separación de las especies monocotiledóneas y dicotiledóneas.

El estudio de Lawton-Rauh (2003) sugiere que la dinámica en la evolución podría estar asociado al potencial adaptativo de las plantas, lo que explicaría la presencia de genes CBF con funciones diferentes, como es el caso de los genes CBF1-3, con respecto a CBF4 de *A. thaliana*. Sería de mucho interés aislar más genes CBF de *E. globulus* con el propósito de establecer su ubicación dentro del árbol filogenético, para de esta forma corroborar nuestras sugerencias.

Los estudios de expresión, del gen tipo-*EgCBF* aislado de *E. globulus*, se realizaron mediante RT-PCR el cual es una técnica semi cuantitativa ya que no nos permite determinar exactamente la concentración del producto de PCR, por lo tanto, nos indica una tendencia de cómo se desarrolla la expresión. Los transcritos de este gen, se acumularon principalmente cuando la planta fue expuesta a 4°C y no a los otros estrés abióticos (sequía y exceso de sal) siendo evidente la expresión a los 15 minutos con un punto máximo de acumulación a los 30 minutos de tratamiento (Figura 11). Este resultado está de acuerdo con lo descrito en la literatura para otras especies como raps, trigo y arroz (Jaglo y col., 2001) donde los transcritos de genes CBF se acumulan dentro de los primeros 15-30 minutos de exposición al frío. En otras especies como en tomate (Zhang y col., 2004) y cebada (Choi y col. 2002) los transcritos de genes CBF se comienzan a acumular a los 15 minutos de exposición al frío con un punto máximo de expresión a las 2 horas de tratamiento, mientras que en el caso del gen DREB1A de maíz los transcritos se comienzan a acumular a la hora de exposición a 4°C (Qin y col., 2004).

El procedimiento utilizado para la realización de los experimentos de expresión en condiciones de sequía y salinidad del gen tipo-CBF de *E. globulus*, el cual consistió en sacar

las plantas de la tierra para exponer sus raíces a las diferentes tipos de estrés, podría causar algún tipo de respuesta provocado por estrés mecánico. Para descartar esta hipótesis se realizó un RT-PCR con los partidores específicos para el gen tipo-*EgCBF* a partir de ARN total aislado inmediatamente después de extraídas las plantas de la tierra. El resultado fue la ausencia total de expresión del gen tipo-CBF bajo esta condición (resultado no mostrado), indicándose, por lo tanto, que la expresión del gen tipo-*EgCBF* fue en respuesta al estrés de frío y no al posible estrés mecánico al cual está siendo sometida la planta. Otro aspecto a considerar es el daño que pueden sufrir las raíces al remover las plantas de la tierra, lo cual impediría que la planta sensara el estrés al cual está siendo sometida, no produciéndose por lo tanto expresión del gen tipo-*EgCBF* en estas condiciones. Sin embargo, el daño producido para generar esta respuesta tendría que ser sobre el total de las raíces de lo contrario la sensibilidad podría disminuir pero no anularse por completo. Un buen método para descartar estas hipótesis sería realizar los experimentos con plantas en cultivos hidropónicos, los cuales nos permitirían exponer las raíces a las distintas condiciones sin causar daño radicular.

Cabe destacar que el método de RT-PCR utilizado en este trabajo para estudiar la expresión del gen en cuestión, es una técnica semi cuantitativa, por lo tanto, entrega una tendencia sobre la expresión del gen tipo-*EgCBF* en *E. globulus*. Para complementar los resultados entregados en este trabajo y determinar como se expresa el gen tipo-*EgCBF* en diferentes condiciones medioambientales, se podría realizar un *Northern blot* o un PCR en tiempo real, técnicas que permiten una cuantificación del ARN mensajero sintetizado

Los resultados del análisis del número de copias del gen tipo-*EgCBF* dentro del genoma de *E. globulus* mediante *Southern blot* (Figura 10), sugieren que el gen tipo-*EgCBF* tiene dos copias dentro del genoma de *E. globulus*, el cual tiene un tamaño de 530 Mpb (Myburg y col.

2003). Esto es distinto a lo descrito en otras especies como *Arabidopsis* y maíz donde cada gen CBF existe en copia única dentro del genoma (Stockinger y col., 1997; Qin y col., 2004). Pueden haber diferentes motivos por los cuales se haya obtenido el resultado antes mencionado, como que la sonda utilizada en la hibridación en el *Southern blot* no haya sido lo suficientemente específica para un gen CBF en particular y por lo tanto, estamos detectando la presencia de más de un gen CBF. Sin embargo, la estrictez utilizada en los lavados de la membrana fueron lo suficientemente altos como para evitar uniones inespecíficas de la sonda, es decir, 0,1% SSC y 0,1% SDS durante 20 minutos a 50°C, permiten teóricamente sólo la unión de las secuencias con un 90% de identidad. Entre los diferentes genes CBF de *Arabidopsis* existe un máximo de identidad de 88%, el cual es similar a lo encontrado entre los genes CBF de tomate (86%). Por lo tanto, en base a esto se podría esperar que los diferentes genes CBF de *Eucalyptus* no tuvieran un nivel de identidad mayor a estos valores, a no ser que el proceso de duplicación de estos genes CBF en esta especie haya sido un evento evolutivo reciente y por lo tanto las secuencias posean un mayor grado de identidad. Esto podría explicar la presencia de bandas con distintas intensidades en una misma digestión, ya que los genes CBF de *Eucalyptus* podrían tener una homología mayor al nivel de estrictez aplicado al lavado del *Southern*, detectándose de esta forma dos miembros de la familia CBF.

Las digestiones parciales del ADN genómico, también son una posible causa de errores en el bandeo como resultado de un *Southern*, sin embargo, el mismo resultado se obtuvo con tres enzimas diferentes para las digestiones, lo que permitiría descartar esta posibilidad.

Para comprobar el resultado obtenido se podría realizar un *Southern blot* hibridando con una sonda amplificada a partir del extremo 5' del gen tipo-CBF de *E. globulus*, el cual es altamente variable y por lo tanto el resultado obtenido debería corresponder a la presencia de un gen en particular.

El proceso de transformación de *A. thaliana* con el vector binario pBIN19 conteniendo el gen tipo-CBF bajo el control del promotor CaMV 35S, tuvo una eficiencia del 0,5%, la cual está dentro del rango de eficiencia de transformación establecido por Clough (Clough y col. 1998). Cabe destacar que se realizó como control, la transformación de *A. thaliana* con el vector binario vacío, con el fin de descartar que el fenotipo producido se deba al proceso de transformación o a algún efecto del vector utilizado. Sin embargo, la semillas generadas de estas transformaciones aún no han sido seleccionadas.

Todas las plantas de *A. thaliana* transformadas con el gen tipo-*EgCBF* bajo el control del promotor CaMV 35S, que fueron desarrolladas durante esta memoria, mostraron el mismo fenotipo, el cual se caracterizó por un crecimiento reducido (Figura 17). Por lo tanto, en base a este resultado se puede establecer que el fenotipo producido es causado por la sobre expresión del gen tipo-*EgCBF* y no por un efecto insercional. Este fenotipo ha sido ampliamente descrito en plantas transformadas que sobre expresan algún gen CBF bajo un promotor constitutivo, es decir, un aspecto normal con respecto al color y estructura, pero con un retardo en el crecimiento. Por ejemplo en plantas de *A. thaliana* que sobre expresan un gen CBF propio (Kasuga y col., 1999), en plantas de *A. thaliana* que sobre expresan un gen CBF de arroz (Dubouzet y col., 2003) o en plantas de *A. thaliana* que sobre expresan un gen CBF de tomate (Zhang y col., 2004). Este fenotipo puede ser atribuido al desgaste metabólico que sufre la planta al estar expresando constantemente un factor de transcripción, el cual desencadena una serie de eventos fisiológicos que eventualmente podrían interferir con el crecimiento normal de la planta. Cabe destacar que el fenotipo de crecimiento reducido no es exclusivo de plantas que sobre expresan genes CBF bajo el control de un promotor constitutivo. Existen algunos estudios de genes que al ser sobre expresados

desarrollan un fenotipo similar, como por ejemplo la sobre expresión del gen ADC2, el cual también es inducido por estrés abiótico en *A. thaliana*. Este gen bajo el control del promotor CaMV 35S, presenta el mismo fenotipo de retardo del crecimiento y disminución de la floración (Alcázar y col., 2005). En todos los casos mencionados anteriormente de sobre expresión de genes CBF de diferentes especies en *A. thaliana*, sin importar la procedencia del gen incorporado, los resultados se tradujeron en un aumento en la capacidad de tolerar el estrés abiótico acompañado con una reducción en el crecimiento y la floración de la planta, por otro lado también se han sobre expresados genes CBF de *A. thaliana* en sistemas heterólogos como tomate (Hsieh y col. 2002), desarrollándose el mismo fenotipo y características de tolerancia a estrés. Esto permite deducir que el sistema de aclimatación a cambios medioambientales contiene proteínas y vías metabólicas conservadas en una amplia variedad de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Por lo tanto es de esperar que el proceso de aclimatación al frío en *E. globulus* contenga también estas características, para confirmar esta hipótesis estamos realizando experimentos adicionales que permitan establecer la funcionalidad del gen tipo-CBF de *E. globulus* aislado durante este trabajo.

5 CONCLUSIONES

- Se aisló un gen tipo-CBF de *E. globulus*, cuya secuencia nucleotídica y aminoacídica posee una elevada identidad con secuencias CBF de otras especies.
- El gen tipo-*Eg*CBF no posee intrones en su secuencia y está presente en más de una copia en el genoma de *E. globulus*.
- El gen tipo-*Eg*CBF se expresa principalmente en condiciones de frío durante los primeros 15 minutos de exposición con un punto máximo a los 30 minutos de tratamiento.
- Plantas de la generación T1 de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el gen tipo-*Eg*CBF bajo el control del promotor CaMV 35S presentaron un crecimiento reducido, fenotipo característico de plantas que sobre expresan genes CBF bajo promotores constitutivos.

6 PROYECCIONES Y TRABAJO FUTURO

- Estudios de funcionalidad (fenotípica y molecular) del gen tipo-*Eg*CBF en *Arabidopsis thaliana*
- Transformación de *Arabidopsis thaliana* con el gen tipo-*Eg*CBF bajo el control de un promotor inducible, como el promotor rd29A, el cual es inducido por frío
- Transformación de *Eucalyptus globulus* con el gen tipo-CBF aislado durante esta memoria

7 REFERENCIAS

- Alcázar R., García Martínez JL., Cuevas JC., Tiburcio AF., Altabella T. (2005). Overexpression of ADC2 in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *Plant J.* 43: 425-436
- Altschul S., Madden T., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Baker SS., Wilhelm KS., Thomashow MF. (1994) The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant. Mol. Biol.* 24:701-13.
- Bray E. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science.* 2: 48
- Chang S., Puryear, J, Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pines trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.
- Chen H., Nelson R., Sherwood J. (1994). Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotech.* 16: 664-669.
- Choi DW, Rodriguez EM, Close TJ. (2002) Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location. *Plant Physiol.* 129: 1781-1787.
- Clough S., Bent A. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* – mediated transformation of *Arabidopsis*. *Plant J.* 16: 734-743.
- Dobouzet J., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinosaki K. (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal* 33: 751-763.
- Frohman M., Dush M., Martin G. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8998-9002.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-3788.
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, 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 J.* 16: 433-42.
- Haake V., Cook D., Riechmann JL, Pineda O., Thomashow MF., Zhang J. (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 639-648.

- Horvath DP., McLarney BK., Thomashow MF. (1993) Regulation of *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) *cor78* in response to low temperature. *Plant Physiol.* 103:1047-53.
- Hsieh TH., Lee JT., Yang PT. Chiu LH., Charng Y., Wang YC., 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 Physiol.* 129: 1086-1094.
- Hughes M, Dunn M. (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.* 47: 291-305.
- INFOR (2003) www.infor.cl
- Ingram J, Bartels D (1996). The molecular basis for dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377-403.
- Inoue H., Nojima H. and Okayama H. (1991). High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene* 30: 96: 23-28.
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka Dg, Schabenberger O, Thomashow MF (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106.
- Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, 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 Physiol.* 127: 910-917.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17: 287-291.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Medina J, Bagues M, Terol J, Perez-Alonso M, Salinas J (1999) The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.* 119:463-70.
- Myburg A, Griffin A, Sederoff R, Whetten R (2003). Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. *Theor. Appl. Genet.* 107:1028-1042
- Lawton-Rauh A (2003). Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. *Mol Phyl Evol.* 29: 396-409
- Liu Q, Zhao N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000). Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. *Chinese Science Bulletin.* 45: 11.

Okamura J, Castre B, Villarroel R, Van Montagu M, Jofuku K. (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 7076-7081.

Patente Europea N° EP1050209A2 (2000). Process for transformation of mature trees of *Eucalyptus* plants.

Pearce R. (1999). Molecular analysis of acclimation to cold. Plant Growth Regul. 29: 47-76.

Riechman J, Meyerowitz E. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factor. Biol. Chem. 379: 633-646.

Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2004) Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF1 transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. Plant Cell Physiol, 45: 1042-1052.

Sambrook J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second edition.

Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold inducible gene expression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 290:998-1009.

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold dtresses by using a full-length cDNA microarray. Plant Cell 13: 61-72.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, (1996). Molecular responses to drought and cold stress. Curr. Opin. Biotechnol. 7: 161.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997). Gene expressing and signal transduction in water-stress response. Plant Physiol. 115:327.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Curr. Opin. Plant Biol. 3:217-223.

Spokevicius AV., Beveren KV., Leitch MA., Bossinger G. (2005). *Agrobacterium*-mediated in vitro transformation of wood-producing stem segments in eucalypts. Plant Cell Rep. 23:617-624

Stange, C., Prehn, D., Arce-Johnson, P. 1998. Isolation of *Pinus radiata* genomic DNA suitable for RAPD analysis. Plant Mol. Biol. Rep. 1:1-8.

Steponkus PL, Uemura M., Joseph RA., Gilmour SJ., Thomashow MF. (1998). Mode of action of the COR 15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 14570-14575.

Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional 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. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 1035-1040

Thomashow MF (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerant genes and regulatory mechanisms. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 571-599.

Wang H., Datla R., Georges F., Loewen M., Cutler AJ. (1995) Promoters from *kin1* and *cor6.6*, two homologous *Arabidopsis thaliana* genes: transcriptional regulation and gene expression induced by low temperature, ABA, osmoticum and dehydration. Plant Mol. Biol. 28: 605 -17.

Wang Z., Triezenberg SJ., Thomashow MF., Stockinger E. (2005). Multiple hydrophobic motifs in *Arabidopsis* CBF1 COOH-terminus provide functional redundancy in trans-activation. Plant Mol. Biol. 58: 543-559.

Yamaguchi-Shinozaki K, 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 6:251-64.

Zhang X, Fowler SG, Cheng H, Lou Y, Rhee SY, Stockinger EJ, Thomashow MF. (2004) Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. Plant J. 39: 905-919.