

UCH-FC
Doc. Biotecnología
A 663
C. 1



**Facultad de Ciencias
Universidad de Chile**

**Estudios para generar una mejor adaptación en
organismos vegetales a estrés abiótico mediante la
manipulación del metabolismo del ácido lipoico**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de
los requisitos para optar al grado de**

Doctor en Biotecnología Molecular

Por

JORGE ANDRÉS ARAYA FLORES

Octubre, 2017

**Director de Tesis
Dr. Michael Handford**

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

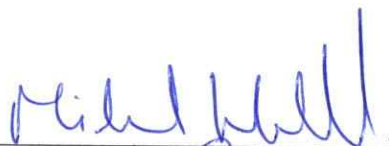
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

JORGE ANDRÉS ARAYA FLORES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 6 de septiembre de 2017.

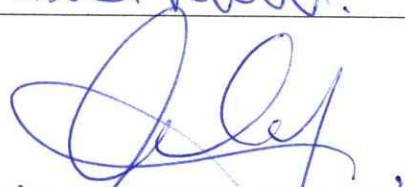
Director de Tesis:

Dr. Michael Handford

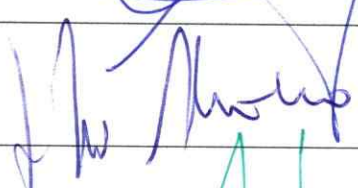


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Víctor Cifuentes



Dra. Jennifer Alcaíno



Dr. Claudio Pastenes





...Dedico esta tesis a Beatriz, quien durante estos 4 años fue mi amiga, compañera, soporte y se convirtió en mi mujer...

Biografía



Nací en Santiago de Chile, un 11 de enero de 1985. Mis padres me pusieron por nombre Jorge Andrés Araya Flores. Ingresé a la Universidad de Chile el año 2004 a través del Programa Académico de Bachillerato desde el cual me transferí a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular el año 2006. Durante el año 2010 comencé a realizar mi seminario de título en el Centro de Biología Molecular Vegetal gracias al cual durante el año 2011 obtuve el título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, para luego, el año 2013 obtener el grado académico de Magister en Ciencias con mención en Biología. Ese mismo año ingresé al recién implementado Programa de Doctorado en Biotecnología Molecular durante el cual desarrollé una línea de investigación propia, idea que surgió desde un trabajo realizado en pregrado, y que gracias al apoyo de mi tutor se transformó en esta tesis Doctoral y en una solicitud de patente.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia, en particular a mis padres, quienes siempre me apoyaron en los caminos que tome y me dieron la libertad de recorrerlos.

A toda la gente que vi pasar por el laboratorio de biología molecular, en particular a Lorena Pizarro por las interesantes conversaciones científicas y no científicas. También agradecer a todo el personal de apoyo; Sebastián Urbina, Carmen Gloria y en especial a Angelica Vega quien se ha transformado en un pilar fundamental para el funcionamiento del Centro y quien me ayudó muchísimo durante la última fase de mi tesis con su apoyo técnico. A mi tutor Michael Handford, en particular por permitirme desarrollar mi idea sobre el ácido lipoico.

Finalmente, pero no por eso menos importante, agradecer a Beatriz, por la paciencia en este proceso y por siempre estar ahí para mí.

INDICE

BIOGRAFÍA.....	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	4
1 INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 AGRICULTURA Y CAMBIO CLIMÁTICO	7
1.2 CAMBIO CLIMÁTICO Y SU IMPACTO ESPERADO EN CHILE	8
1.3 ESTRÉS ABIÓTICO Y MECANISMOS DE RESPUESTA EN ORGANISMOS VEGETALES.....	9
1.4 ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA MEJORAR TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO	12
1.5 ÁCIDO LIPOICO COMO BLANCO PARA GENERAR TOLERANCIA A ESTÉS ABIÓTICO.....	14
1.6 BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO LIPOICO	16
1.7 EVIDENCIAS DE ÁCIDO LIPOICO Y RESPUESTA A ESTRÉS EN ORGANISMOS VEGETALES.....	18
1.8 ESTRATEGIA DESARROLLADA.....	19
1.9 HIPÓTESIS.....	20
1.10 OBJETIVO GENERAL.....	20
1.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21

2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1	IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA ENZIMA LIPOIL SINTASA DESDE <i>A. THALIANA</i> (ATLIP1) Y <i>S. LYCOPERSICUM</i> (TOMATE; SLLIP1). CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE SLLIP1 Y DETERMINACIÓN DE SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.	22
2.1.1	<i>Crecimiento vegetal</i>	22
2.1.2	<i>Identificación y clonación de Atlip1 y Sllip1</i>	23
2.1.3	<i>Extracción de RNA y síntesis de cDNA</i>	23
2.1.4	<i>Amplificación y purificación de Atlip1 y Sllip1</i>	24
2.1.5	<i>Clonación en el vector de entrada pCR™8:</i>	24
2.1.6	<i>Obtención cepa E. coli KER176</i>	25
2.1.7	<i>Predicción de la región correspondiente al péptido señal de Sllip1</i>	26
2.1.8	<i>Clonación del gen Atlip1 y Sllip1 sin péptido señal en pCR™8</i>	26
2.1.9	<i>Generación de vectores de expresión pDEST-HisMBP</i>	26
2.1.10	<i>Transformación de KER176 con los vectores pDEST</i>	27
2.1.11	<i>Complementación heteróloga de KER176</i>	28
2.1.12	<i>SDS-PAGE e inmuno detección</i>	28
2.1.13	<i>Generación del vector pEarlyGate101</i>	29
2.1.14	<i>Transformación de A. tumefaciens cepa EHA105</i>	30
2.1.15	<i>Infiltración de hojas de N. tabacum</i>	31
2.1.16	<i>Tratamiento con Mitotracker y visualización en microscopía confocal</i>	31
2.2	GENERACIÓN DE LÍNEAS DE <i>A. THALIANA</i> QUE SOBRE EXPRESAN EL GEN ENDÓGENO ATLIP1, O QUE EXPRESAN EL GEN SLLIP1 PROVENIENTE DE TOMATE.....	31
2.2.1	<i>Generación de los vectores pGWB8-Atlip1 y pGWB8-Sllip1</i>	31
2.2.2	<i>Transformación estable mediante inmersión floral</i>	32
2.2.3	<i>Selección de plantas transformantes por resistencia a antibiótico</i>	32

2.2.4	<i>Corroboración de plantas transformantes por PCR.....</i>	33
2.3	ANÁLISIS FENOTÍPICO Y MOLECULAR DE PLANTAS DE <i>A. THALIANA</i> Y TOMATE (<i>S. LYCOPERSICUM</i>) GERMINADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AL	34
2.3.1	<i>Siembra y preparación de placas de MS con AL.....</i>	34
2.3.2	<i>Cuantificación del largo de la raíz principal e índice de raíces laterales.....</i>	34
2.3.3	<i>Extracción de RNA y obtención de cDNA.....</i>	34
2.3.4	<i>Cuantificación de los niveles de expresión de genes relacionados a la ruta del AL mediante qRT-PCR</i>	35
2.3.5	<i>Cuantificación de los niveles de lipoilación mediante western blot</i>	36
2.3.6	<i>Cultivo en medio hidropónico de <i>S. lycopersicum</i></i>	36
2.3.7	<i>Cultivo en tierra de <i>S. lycopersicum</i></i>	37
2.4	EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO, OXIDATIVO, METALES PESADOS Y DÉFICIT HÍDRICO EN PLANTAS DE <i>A. THALIANA</i> GERMINADAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE AL	37
2.4.1	<i>Ensayos de tolerancia a estrés salino.....</i>	37
2.4.2	<i>Ensayos de tolerancia a estrés oxidativo.....</i>	38
2.4.3	<i>Ensayos de tolerancia a metales pesados</i>	39
2.4.4	<i>Ensayos de tolerancia a déficit hídrico</i>	39
2.5	EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE <i>A. THALIANA</i> Y <i>S. LYCOPERSICUM</i> GERMINADAS EN PRESENCIA O AUSENCIA DE AL SOMETIDAS A DÉFICIT NUTRICIONAL	40
2.5.1	<i>Déficit nutricional en <i>A. thaliana</i></i>	40
2.5.2	<i>Déficit nutricional en plantas de tomate</i>	41
2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	41
3	RESULTADOS.....	42

3.1 IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA ENZIMA LIPOIL SINTASA DESDE <i>A. THALIANA</i> (ATLIP1) Y <i>S. LYCOPERSICUM</i> (TOMATE; SLIP1). CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE SLIP1 Y DETERMINACIÓN DE SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	42
3.1.1 <i>Identificación y clonación del gen que codifica la enzima LIP1 en tomate</i>	42
3.1.2 <i>Localización sub celular de SLIP1</i>	45
3.1.3 <i>Caracterización funcional de SLIP1</i>	46
3.2 GENERACIÓN DE LÍNEAS DE <i>A. THALIANA</i> QUE SOBRE EXPRESEN EL GEN ENDÓGENO ATLIP1, O QUE EXPRESEN EL GEN SLIP1 PROVENIENTE DE TOMATE.....	51
3.2.1 <i>Transformación estable mediante inmersión floral</i>	51
3.2.2 <i>Selección de plantas transformantes por resistencia a antibiótico</i>	51
3.2.3 <i>Selección de plantas transformantes por PCR:</i>	52
3.3 ANÁLISIS FENOTÍPICO Y MOLECULAR DE PLANTAS DE <i>A. THALIANA</i> Y TOMATE (<i>S. LYCOPERSICUM</i>) GERMINADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AL	60
3.3.1 <i>Análisis fenotípico en A. thaliana</i>	60
3.3.2 <i>Análisis fenotípico en tomate</i>	67
3.4 EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO, OXIDATIVO, METALES PESADOS Y DÉFICIT HÍDRICO EN PLANTAS DE <i>A. THALIANA</i> GERMINADAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE AL	69
3.4.1 <i>Ensayos de tolerancia a estrés salino en plantas de A. thaliana</i>	70
3.4.2 <i>Ensayos de tolerancia a estrés oxidativo en plantas de A. thaliana</i>	71
3.4.3 <i>Ensayos de tolerancia a metales pesados en plantas de A. thaliana</i>	73
3.4.4 <i>Ensayos de tolerancia a déficit hídrico en plantas de A. thaliana</i>	74
3.5 EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE PLANTAS DE <i>A. THALIANA</i> Y <i>S. LYCOPERSICUM</i> GERMINADAS EN PRESENCIA O AUSENCIA DE AL SOMETIDAS A DÉFICIT NUTRICIONAL.....	75
3.5.1 <i>Déficit nutricional en plantas de A. thaliana</i>	76
3.5.2 <i>Déficit nutricional en plantas de S. lycopersicum cv Micro Tom</i>	77

4	DISCUSION	81
4.1	CARACTERIZACIÓN DE SLLIP1	82
4.2	A. THALIANA CON NIVELES DE EXPRESIÓN AUMENTADOS PARA EL GEN QUE CODIFICA LA ENZIMA LIPOIL SINTASA...	84
4.3	EFFECTO DE LA APLICACIÓN EXÓGENA DE AL EN A. THALIANA	86
4.4	EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE AL EN A. THALIANA SOMETIDAS A ESTRÉS ABIÓTICO	89
4.5	EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE AL EN TOMATE.....	93
4.6	ÍMPLICANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTA TESIS.....	95
5	CONCLUSIONES	97
	ANEXO 1: PARTIDORES UTILIZADOS	99
	ANEXO 2: PROGRAMAS DE PCR	100
	REFERENCIAS	101

Índice de Figuras

FIGURA 1: RESPUESTA A ESTRÉS ABIÓTICO EN ORGANISMOS VEGETALES.....	10
FIGURA 2: FÓRMULA ESTRUCTURAL DEL ÁCIDO LIPOICO Y ÁCIDO DIHIDROLIPOICO.	15
FIGURA 3: RUTA DE SÍNTESIS DE ÁCIDO LIPOICO EN A. THALIANA.....	18
FIGURA 4.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 4: ALINEAMIENTO DE LIP1.....	44
FIGURA 5: LOCALIZACIÓN SUB CELULAR DE SLLIP1-YFP	46
FIGURA 6: WESTERN BLOT ANTI HIS A E. COLI LIPA TRANSFORMADAS CON LIP1.....	47
FIGURA 7: WESTERN BLOT ANTI AL A E. COLI LIPA TRANSFORMADAS CON LIP1.....	48
FIGURA 8: CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE E. COLI LIPA TRANSFORMADAS CON LIP1 EN MEDIO CON O SIN AL.....	50
FIGURA 9: FENOTIPO REPRESENTATIVO DE PLANTAS DE A. THALIANA TRANSFORMADAS CON ATLIP1 O SLLIP1.....	53
FIGURA 10: PCR REPRESENTATIVO A GDNA DE A. THALIANA TRANSFORMADAS CON ATLIP1 O SLLIP1... ..	54
FIGURA 11: PCR REPRESENTATIVO A GDNA DE A. THALIANA TRANSFORMADAS CON ATLIP1 O SLLIP1, AMPLIFICANDO LOS GENES ATLIP1 Y SLLIP1.	55
FIGURA 12: FENOTIPO REPRESENTATIVO DE A. THALIANA (T3) TRANSFORMADAS CON ATLIP1 O SLLIP1 EN HIGROMICINA.	58
FIGURA 13: LARGO DE RAÍZ PRINCIPAL Y FENOTIPO DE A. THALIANA GERMINADAS EN CONCENTRACIONES SOBRE 10 μ M DE AL.....	60
FIGURA 14: LARGO RAÍZ PRINCIPAL DE A. THALIANA GERMINADAS EN CONCENTRACIONES ENTRE 100 NM Y 10 μ M DE AL.....	61
FIGURA 15: CUANTIFICACIÓN DEL LARGO DE LA RAÍZ PRINCIPAL E ÍNDICE DE RAÍCES LATERALES EN A. THALIANA DE 14 DÍAS CRECIDAS EN AL	62

FIGURA 16: NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS AL METABOLISMO DE AL EN A. THALIANA DE 10 DÍAS GERMINADAS EN PRESENCIA DE 100 NM DE AL.	64
FIGURA 17: CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE E2-PDH UNIDA A AL EN PLANTAS DE A. THALIANA DE 10 DÍAS.	66
FIGURA 18: CRECIMIENTO RAÍZ PRINCIPAL DE A. THALIANA ENTRE EL DÍA 7 Y 11.	70
FIGURA 19: EFECTO DE SALINIDAD EN EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ PRINCIPAL DE A. THALIANA.	71
FIGURA 20: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PARAQUAT SOBRE EL CONTENIDO DE CLOROFILA EN PLANTAS DE A. THALIANA.	72
FIGURA 21: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PARAQUAT SOBRE EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN PLANTAS DE A. THALIANA.	73
FIGURA 22: EFECTO DE METALES PESADOS EN EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ PRINCIPAL DE A. THALIANA.	74
FIGURA 23: CONTENIDO RELATIVO DE AGUA Y TASA DE SOBREVIVENCIA EN PLANTAS DE A. THALIANA SOMETIDAS A DÉFICIT HÍDRICO DURANTE 14 DÍAS.	75
FIGURA 24: EFECTO DE DÉFICIT NUTRICIONAL EN EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ PRINCIPAL DE A. THALIANA.	76
FIGURA 25: FENOTIPO DE PLANTAS DE TOMATE SOMETIDAS A 8 SEMANAS DE DÉFICIT NUTRICIONAL. ..	78
FIGURA 26: 'NÚMERO DE HOJAS EN PLANTAS DE TOMATE SOMETIDAS A DÉFICIT NUTRICIONAL LUEGO DE 8 SEMANAS.	79

Índice de tablas

TABLA 1: ESTRATEGIAS BIOTECNOLOGÍAS PARA MEJORAR TOLERANCIA ESTRÉS ABIÓTICO	13
TABLA 2: SECUENCIAS CON MAYOR IDENTIDAD AMINOACÍDICA A ATLIP1 Y ATLIP1P	43
TABLA 3: RESUMEN DE	56
TABLA 4: FRECUENCIA DE RESISTENCIA AL ANTIBIÓTICO DE A. THALIANA (T3) TRANSFORMADAS CON ATLIP1 O SLLIP1.....	57
TABLA 5: RESUMEN DE LA PRODUCCIÓN DE FRUTOS EN PLANTAS DE TOMATE GERMINADAS EN MEDIO HIDROPÓNICO EN PRESENCIA DE AL	67
TABLA 6: RESUMEN DE LA PRODUCCIÓN DE FRUTOS EN PLANTAS DE TOMATE GERMINADAS EN TIERRA EN PRESENCIA DE AL.....	68
TABLA 7: RESUMEN DE LA PRODUCCIÓN DE FRUTOS EN PLANTAS DE TOMATE CRECIDAS EN TIERRA CON APLICACIÓN DE AL LUEGO DEL TRASPLANTE DE PLANTINES.	68
TABLA 8: RESUMEN DE LA PRODUCCIÓN DE FRUTOS EN PLANTAS SOMETIDAS A DÉFICIT NUTRICIONAL	80

Índice de ecuaciones

ECUACIÓN 1: ECUACIÓN PARA DETERMINAR LA EXPRESIÓN RELATIVA DE UN GEN	35
ECUACIÓN 2: CÁLCULO PARA LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA A.	38
ECUACIÓN 3: CÁLCULO PARA LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA B	38
ECUACIÓN 4: CÁLCULO PARA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES.....	39
ECUACIÓN 5: CÁLCULO DEL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA.....	40

Lista de Abreviaturas

- AL: ácido lipoico
- Amp: Ampicilina
- cDNA: DNA complementario
- CDS: secuencia de codificación (del inglés *coding DNA sequence*)
- D.O: Densidad óptica
- DHLA: ácido dihidrolipoico
- DNA: Acido desoxirribonucleico
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- gDNA: DNA genómico
- Hyg; higromicina
- IPCC: grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático
- IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- Kan: Kanamicina
- LB: Medio Luria Bertani
- MME +AL: medio mínimo con ácido lipoico
- MME A+S: medio mínimo con acetato y succinato de sodio
- MME: medio mínimo
- MME+G: medio mínimo con glucosa
- MS: medio Murashige y Skoog
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- pDNA: DNA plasmidial
- RNA: Ácido ribonucleico
- ROS: especies reactivas de oxígeno

RESUMEN

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, la evidencia disponible confirma que el clima del mundo está cambiando. La agricultura es fundamental para abordar el desafío que el cambio climático le plantea a la humanidad. La agricultura depende directamente de los recursos naturales y de las condiciones climáticas, y ha sido afectada más que cualquier otro sector por los efectos del cambio climático.

Los organismos vegetales están expuestos constantemente a una variedad de factores ambientales, como extremas de temperatura, sequía y déficit nutricional. La respuesta de las plantas frente a diferentes estreses abióticos presenta tanto elementos comunes como elementos únicos a cada estrés. Dentro de estos elementos comunes, se encuentra la respuesta a estrés oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno (ROS) la cual puede ser de tipo enzimática (e.g. superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa) o de tipo no enzimática donde participan moléculas antioxidantes, como el ácido lipoico (AL).

Por lo general, las moléculas antioxidantes poseen propiedades como tales solo cuando están en su forma reducida. Sin embargo, AL tiene la particularidad de conservar funciones de protección tanto en su estado reducido de ácido dihidrolipoico (DHLLA) como en su estado oxidado de AL y es capaz de regenerar otras moléculas antioxidantes como por ejemplo la pareja glutatión/disulfuro de glutatión.

En plantas, la síntesis de AL ocurre mediante dos rutas. En la ruta *de novo*, la enzima octanoil transferasa (LIP2) utiliza grupos octanoil recién sintetizados unidos a

acyl carrier protein (ACP) para unirlos a un residuo específico de lisina de proteínas blanco, entre las que se encuentra la sub unidad E2 de los complejos piruvato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa. Luego, la enzima lipoil sintasa (LIP1) inserta dos átomos de sulfuro en los carbonos 6 y 8 del grupo octanoil, formando así una proteína lipoilada. Por otra parte, en la ruta de reciclaje, la enzima lipoato ligasa (LPLA) incorpora directamente AL a la proteína blanco o incorpora octanoato, en cuyo caso LIP1 inserta los átomos de sulfuro necesarios para formar AL.

El objetivo principal de esta tesis fue generar tolerancia a estrés de tipo abiótico mediante la manipulación del metabolismo del AL. Para esto, se utilizaron dos aproximaciones. La primera fue la generación de plantas de *Arabidopsis thaliana* que tuvieran aumentados los niveles de transcrito del gen *lip1*, el cual codifica la enzima lipoil sintasa, que participa tanto en la ruta *de novo* como de reciclaje. Para esto, se transformaron establemente plantas de *A. thaliana* con el gen endógeno (*Atlip1*) o con *Sllip1* proveniente de *Solanum lycopersicum* (tomate), el cual fue descrito y caracterizado por primera vez durante esta tesis. La segunda estrategia fue la aplicación de forma exógena de AL a plantas *A. thaliana* y *S. lycopersicum*, para analizar el efecto en el fenotipo tanto en condiciones normales de crecimiento como cuando el organismo es sometido a diversos tipos de estrés abiótico.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis indican que el gen *Sllip1* codifica una enzima lipoil sintasa, la cual tiene actividad *in vivo* y que en plantas tiene destinación mitocondrial. Además, se determinó que la transformación estable de

A. thaliana con *Atlip1* o *Sllip1* no es beneficiosa para la planta, dificultándose la obtención de plantas transformantes.

Respecto a la aplicación exógena de AL, la adición de 100 nM de AL durante la germinación de *A. thaliana* genera un aumento en el índice de raíces laterales, un aumento en los niveles de expresión de los genes *Atlip1* y *Atlpla*, otorga mayor tolerancia cuando las plantas son expuestas a 150 μ M de CuSO_4 , y evita que haya degradación de clorofila cuando la planta es expuesta a una fuente intensa de luz. Además, se determinó que una aplicación de 100 nM de AL en *S. lycopersicum* cv Micro Tom crecidos en medio hidropónico, produce un aumento en la producción de frutos y genera tolerancia a estrés por déficit nutricional en el medio.

Estos resultados permitieron redactar una solicitud de patente, la cual fue presentada al INAPI (2016-03333, "Composición bioestimulante natural para el mejoramiento de la producción agrícola, método de aplicación y de su uso para incrementar el número de raíces en las plantas") y que hace relación con la utilización del AL como un bioestimulante natural y económico para el mejoramiento de la producción agrícola lo cual puede ayudar a enfrentar el gran desafío del cambio climático.

ABSTRACT

According to FAO, current evidence confirms that the world's climate is changing. Agriculture is crucial to meet the challenges that climate change poses to mankind. Agriculture depends directly on natural resources and climatic conditions, and has been affected more than any other sector by the effects of climate change.

Plants are constantly exposed to a variety of environmental factors, such as extreme temperatures, drought and nutritional deficit. The response of plants to different abiotic stresses has both common mechanisms and elements that are unique to each stress. Among the common mechanisms is the response to oxidative stress generated by active oxygen species (ROS), which can be either enzymatic (e.g. superoxide dismutase, peroxidase, catalase) or non enzymatic in which antioxidant molecules, such as lipoic acid (LA), are involved.

Antioxidant molecules are usually active only in their reduced form. However, LA has the particular feature of preserving protective functions both in the reduced state of dihydrolipoic acid (DHLA) and in its oxidised state (LA), and is capable of regenerating other antioxidant molecules such as the glutathione/glutathione disulphide pair.

In plants, the synthesis of AL occurs via two routes. In the *de novo* route, the enzyme octanoyl transferase (LIP2) uses octanoyl groups bound to acyl carrier protein to bind them to a specific lysine residues of the target proteins, including the E2 subunit of the pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase complexes. Then the enzyme lipoyl synthase (LIP1) inserts two sulphur atoms at carbons 6 and 8 of the

octanoyl group, thus forming a lipoylated protein. On the other hand, in the recycling route the enzyme lipoate ligase (LPLA) directly incorporates AL to the target proteins or incorporates octanoate, in which case LIP1 then inserts the sulphur atoms necessary to form AL.

The main goal of this thesis was to generate tolerance to abiotic stress by the manipulation of LA metabolism. Two approaches were used. The first was the generation of *Arabidopsis thaliana* plants that had increased transcript levels of the *lip1* gene, which encodes for lipoyl synthase that participates in both the *de novo* and recycling pathways. For this, *A. thaliana* plants were stably transformed with the endogenous gene (*Atlip1*) or with *Sllip1* from *Solanum lycopersicum* (tomato), which was described and characterised for the first time during this thesis. The second strategy was the exogenous application of LA to *A. thaliana* and *S. lycopersicum* plants, to analyse the effect on the phenotype in both normal growth conditions and when the plants are subjected to various types of abiotic stress.

The results obtained during the development of this thesis indicate that the *Sllip1* gene encodes for a lipoyl synthase, which has activity *in vivo* and is destined to mitochondria in plants. In addition, it was determined that the stable transformation of *A. thaliana* with *Atlip1* or *Sllip1* is not beneficial to the plant, making it difficult to obtain transformants.

Regarding the exogenous application of LA, the addition of 100 nM LA during the germination of *A. thaliana* generates an increase in the lateral root index, an increase in the expression levels of the *Atlip1* and *Atlpla*, provides greater tolerance when plants

are exposed to 150 μM CuSO_4 , and prevents chlorophyll degradation when the plant is exposed to an intense source of light. In addition, it was determined that the application of 100 nM LA in *S. lycopersicum* cv Micro Tom grown in hydroponic medium, produces an increase in fruit production and generates tolerance to stress due to nutritional deficit in the medium.

These results permitted the drafting of a patent application, which was submitted to INAPI (2016-03333, "Natural biostimulant composition for the improvement of agricultural production, method of application and its use to increase the number of roots in plants") which is related to the use of LA as a natural and economical biostimulant for the improvement of agricultural production in order to meet the great challenges posed by climate change.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Agricultura y Cambio Climático

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la evidencia disponible confirma que el clima del mundo está cambiando. En el mundo científico existe un consenso respecto a que el cambio climático es un hecho inequívoco, el cual ha sido causado principalmente por acción del hombre. A partir de 1950 se ha observado un calentamiento en la atmósfera y el océano, disminución en los volúmenes de hielo y nieve, aumento en el nivel del mar y aumento en las concentraciones de gases de efecto invernadero (IPPC, 2013).

La agricultura es fundamental para abordar el desafío que el cambio climático le plantea a la humanidad. La agricultura depende directamente de los recursos naturales y de las condiciones climáticas, y ha sido afectada más que cualquier otro sector por los efectos del cambio climático (FAO, 2016).

Numerosos estudios han buscado establecer el impacto del cambio climático en la productividad de diferentes sectores y subsectores agrícolas, en diferentes locaciones y escenarios. La mayoría de estos apuntan a que los impactos negativos que ha tenido el cambio climático irán en aumento a medida que éste progrese (referencias a los estudios en FAO, 2016).

El Banco Mundial (World Bank, 2007) identifica cinco factores principales por los que el cambio climático afectará la productividad de cultivos agrícolas: cambios en las precipitaciones, temperatura, fertilización de dióxido de carbono, variabilidad climática, y la escasez de agua superficial, los cuales generan estrés de tipo abiótico en los cultivos.

Cabe destacar que el estrés abiótico que están sufriendo los cultivos no se limita solamente a los efectos generados por cambios climáticos, sino también a los efectos antropogénicos como es la contaminación del aire, el agua y la tierra (Jutsz y Gnida, 2015; Schutzendubel y Polle, 2002).

1.2 Cambio climático y su impacto esperado en Chile

En Chile se espera un aumento en la temperatura en todo el territorio nacional con un gradiente de mayor a menor que irá de norte a sur y de oeste a este, alcanzando un aumento de hasta 2 °C, siendo la zona más afectada el norte grande. Junto con este aumento en la temperatura, se espera una disminución en las precipitaciones proyectándose, por ejemplo que entre los años 2011 y 2030 se genere una disminución de entre un 5 y 15% en la zona ubicada entre la cuenca del Río Copiapó y la cuenca del Río Aysén (Departamento de Cambio Climático del Ministerio del Medio Ambiente, 2015).

Los efectos generados por la variación de temperatura y precipitación generarán un importante aumento en los procesos erosivos del suelo en el país, desde la Región de Coquimbo hasta la Región de los Lagos. Se espera que la agricultura del secano sea la más afectada por este fenómeno, mientras que la agricultura de riego se verá afectada por el incremento de temperatura si es que no ocurren cambios en la disponibilidad de agua (Biblioteca del Congreso Nacional, 2007; Departamento de Cambio Climático del Ministerio del Medio Ambiente, 2015).

1.3 Estrés abiótico y mecanismos de respuesta en organismos vegetales

Los organismos vegetales están expuestos constantemente a una variedad de factores ambientales, tanto bióticos (parásitos, patógenos, herbívoros, etc.) como abióticos. Estos últimos incluyen los recursos y estímulos necesarios para el desarrollo y crecimiento de la planta, tales como, temperatura, humedad relativa, luz, disponibilidad de agua, nutrientes minerales, CO₂, como también el viento, la radiación ionizante o inclusive los contaminantes ambientales. El efecto que tenga cada uno de estos factores abióticos en la planta dependerá de su cantidad e intensidad. Para un crecimiento óptimo, los organismos vegetales requieren cierta cantidad de cada factor ambiental. Cualquier desviación del óptimo, ya sea un exceso o un déficit de los factores químicos o físicos del ambiente generará un estrés abiótico en la planta, lo cual afectará su crecimiento, desarrollo y/o productividad. Entre los factores abióticos que generan estrés se encuentran: temperaturas extremas (calor, frío, y congelamiento), hipoxia en suelos generada por inundaciones, sequía, suelos con déficit o exceso de nutrientes y excesiva salinidad en el suelo (Koyro *et al.*, 2012).

La respuesta de las plantas frente a diferentes estreses abióticos presenta tanto elementos comunes como elementos únicos a cada estrés (**Figura 1**) y, a diferencia de la respuesta a estrés biótico donde, por lo general, depende de rasgos monogénicos, ésta es multigénica y más compleja (Wang *et al.*, 2003). Los estreses denominados primarios, entre los que se encuentra la sequía, alta salinidad, frío o calor extremo y contaminación química, tienen mecanismos interconectados los cuales causan daño, afectando la homeostasis celular. Esto a su vez gatilla estrés osmótico y oxidativo los que se

denominan estrés de tipo secundario. La señal inicial de estrés (*e.g.* efecto osmótico provocado por iones, o cambios en la fluidez de membrana generados por aumento en la temperatura) desencadena procesos de señalización río abajo y controles de transcripción, los cuales activan mecanismos de respuesta a estrés para así re-establecer la homeostasis y proteger y/o reparar proteínas y membranas dañadas (Vinocur y Altman, 2005; Zhu, 2016).

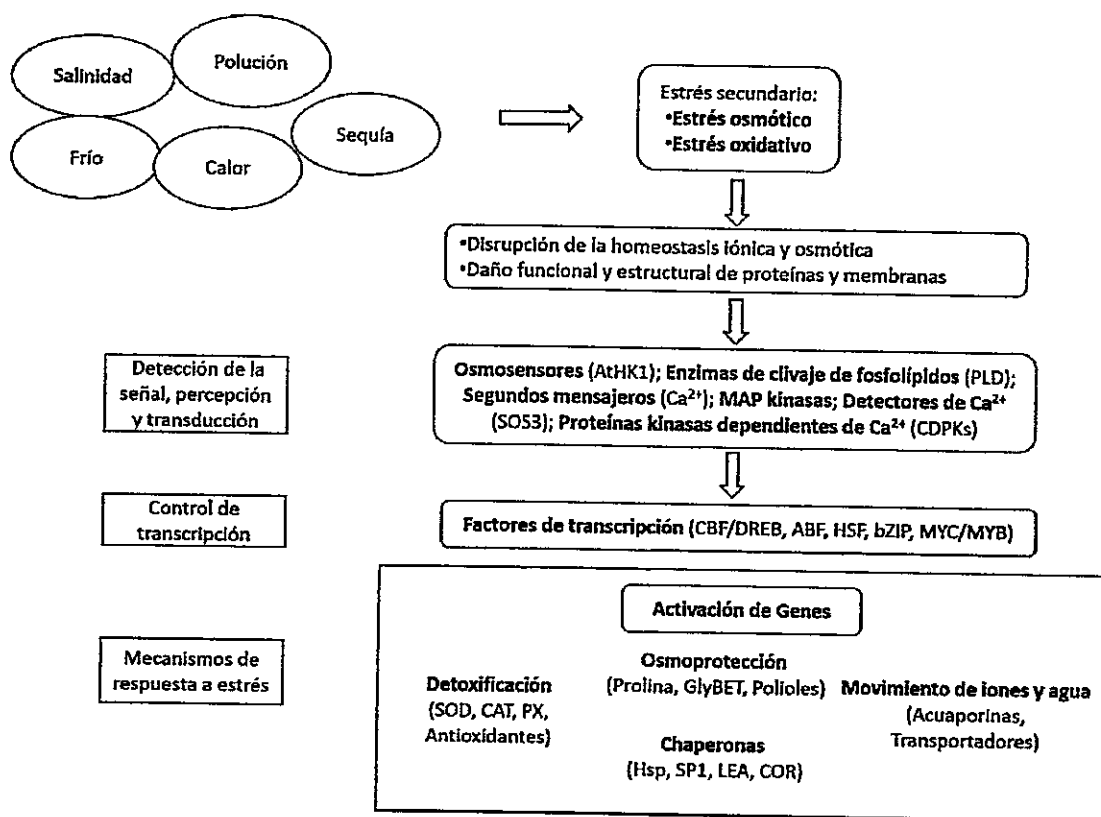


Figura 1: Respuesta a estrés abiótico en organismos vegetales. La figura muestra un esquema del proceso de respuesta a estrés abiótico, en donde todos los factores externos desencadenan un estrés de tipo oxidativo y/o osmótico, el cual genera una disrupción en la homeostasis la cual es detectada, y desencadena una señal de transducción, la cual activara factores de transcripción los que regularan mecanismos de respuesta a estrés (modificado de Vinocur y Altman, 2005).

El estrés oxidativo en particular, es generado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por su sigla en inglés) las cuales son moléculas que poseen uno o más átomos de oxígeno activado (*e.g.* singlete de oxígeno, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, radical superóxido y óxido nítrico) o por la acumulación de radicales libres que no contengan átomos de oxígeno (*e.g.* metales de transición o radicales centrados en un carbono). Debido a que, a través de diversos procesos biológicos tales como la fotosíntesis y respiración, existe producción de ROS, las plantas poseen mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos para lidiar con estas moléculas. Entre los mecanismos enzimáticos se incluyen las enzimas; superóxido dismutasa (SOD), la cual transforma el superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno; ascorbato peroxidasa (APX), la cual reduce el peróxido de hidrógeno a agua utilizando ascorbato como dador de electrones; glutatión peroxidasa (GPX), la cual oxida el glutatión a glutatión disulfuro; y catalasa (CAT) la cual descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Por otra parte, entre los mecanismos no enzimáticos se incluyen moléculas tales como; ascorbato, sustrato de la ascorbato peroxidasa; glutatión, el cual en su estado reducido es capaz de estabilizar ROS; el tocoferol o vitamina E, el cual protege a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y otras estructuras celulares de la peroxidación lipídica; los flavonoides, los cuales en plantas captan hasta el 90% de la radiación UV; los alcaloides, como por ejemplo los indol-monoterpenicos, los cuales se ha visto aumentan su síntesis ante ROS; los carotenoides, pigmentos capaces de reaccionar con el singlete de oxígeno y radicales peróxido; y el ácido lipoico el cual es un cofactor de importantes complejos enzimáticos que además posee

características antioxidantes como se verá más adelante (sección 1.5; Apel y Hirt, 2004; Demidchik, 2015; Matsuura *et al.*, 2014; Mittler, 2002; Perez-Lopez *et al.*, 2010).

1.4 Estrategias biotecnológicas para mejorar tolerancia a estrés abiótico

La aproximación más común para lograr mejorar la tolerancia a estrés de tipo abiótico en organismos vegetales consiste en fortalecer el sistema endógeno de respuesta a estrés en distintos niveles de respuesta, desde receptores y elementos señalizadores o reguladores (*e.g.* quinasas, factores de transcripción), hasta los genes de efecto directo o efectores (*e.g.* enzimas antioxidantes, proteínas *heat-shock*, enzimas relacionadas con la síntesis de osmo-protectores). Esta estrategia ha tenido varios éxitos, aumentando cada vez más los reportes de plantas tolerantes a diversos tipos de estrés (**Tabla 1**); sin embargo, existen algunas limitaciones importantes. Por una parte, cuando se intervienen señales muy tempranas en las rutas de señalización, como pueden ser factores de transcripción, se obtienen organismos tolerantes a más de un tipo de estrés, pero con una alta probabilidad de generar efectos pleiotrópicos, tales como disminución en el crecimiento o alteraciones en el desarrollo. Por el contrario, cuando se regula positivamente la expresión o actividad de genes o enzimas de acción directa, normalmente no se observan efectos pleiotrópicos, pero la tolerancia obtenida es a un solo tipo de estrés, lo cual en condiciones normales de crecimiento en campo no ocurre, puesto que la planta está sujeta simultáneamente a varios estímulos ambientales (Cabello *et al.*, 2014; Vinocur y Altman, 2005).



Tabla 1: Estrategias biotecnológicas para mejorar tolerancia estrés abiótico*.

Estrategia	Blanco	Aproximación	Fenotipo	Ejemplos	
Ingeniería de reguladores transcripciones	Factores de transcripción	Sobre expresión	Tolerancia a estrés abiótico con o sin efecto pleiotrópico	OsNAC5	
				HaHB1	
				OsDRB2A	
				GmbZIP1	
		Promotores inducibles o tejido específicos	Tolerancia a estrés abiótico sin efecto pleiotrópico	pRCc:OsNAC10	
				pRAB17:TaDREB2 y 3	
Regulación post traduccional fina de niveles de proteínas (ubiquitinación fosforilación, sumolización)			ICE1		
			AtHB6		
			MYB30		
Manipulación de rasgos únicos	Genes involucrados en metabolismo de ROS	Sobre expresión de un gen	Tolerancia a estrés abiótico	MnSOD	
				GOR	
		Sobre expresión de múltiples genes		CuZnSOD+APX	
				DHAR+GR	
	Promotor inducible	P47:ScVTE			
		P80:ScVTE			
	Expresión de genes de cianobacterias				Fld
					GolS
					RS2
					HXK
	Genes asociados a osmo regulación				BIP
					GRP94
Chaperonas			Calnexina		
			CRT		
Modificación de homeostasis hormonal	Síntesis de hormonas	Sobre expresión	Tolerancia a estrés abiótico con efecto pleiotrópico	OsNCED3	

Estrategia	Blanco	Aproximación	Fenotipo	Ejemplos
		Expresión inducible	Tolerancia a estrés abiótico con efecto pleiotrópico	pSAG12:IPT
	Catabolismo de hormonas	Expresión tejido específica		pSARK:IPT
	Señalización de hormonas	Sobre expresión		pWRKY:CKX1
				CRK45
Control post transcripcional	miRNA	Sobre expresión de blancos de miRNA	Tolerancia a sequia	miR319
				miR169
				GmNFYA3
Regulación epigenética	Metilación de DNA	Mutante en metil transferasa	Hipersensibilidad a estrés salino	met1-3
		Uso de inhibidores de metilación		Aumento a tolerancia a salinidad
	Modificación de Histonas	Mutante en histona des acetilasa	Aumento a sensibilidad a sal	HDA6

*Tabla modificada de Cabello *et al.*, 2014, para más detalles sobre estudios mostrados consultar trabajo original.

1.5 Ácido lipoico como blanco para generar tolerancia a estrés abiótico.

El ácido lipoico (ácido 6,8-dioctanoico; AL; Figura 2) es un metabolito funcional y estructural, con actividad tanto como molécula antioxidante libre como unida covalentemente, siendo cofactor esencial de la sub unidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, complejo oxoácido deshidrogenasa de cadena ramificada y de la proteína H del complejo de escisión de glicina (Douce *et al.*, 2001; Mooney *et al.*, 2002; Perham, 2000), por lo cual se encuentra presente tanto en procariontes como en eucariontes.

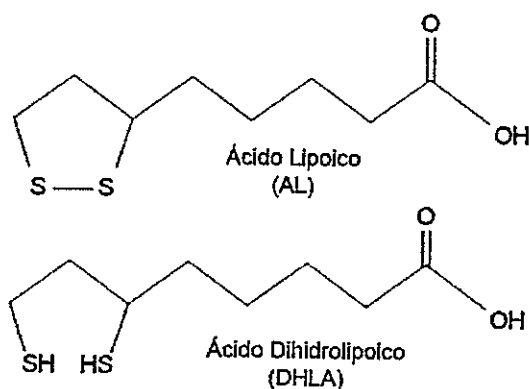


Figura 2: Fórmula estructural del ácido lipoico y ácido dihidrolipoico. En la figura se muestra la fórmula estructural del ácido lipoico y su forma reducida de ácido dihidrolipoico.

Por lo general, las moléculas antioxidantes poseen propiedades como tales solo cuando están en su forma reducida. Sin embargo, AL tiene la particularidad de conservar funciones de protección tanto en su estado reducido de ácido dihidrolipoico (DHHLA) como en su estado oxidado de AL. *In vitro* se ha observado que el AL tiene propiedades protectoras ante el radical hidroxilo, ácido hipocloroso y el singlete de oxígeno, además es capaz de formar complejos estables con Mn^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} y quelar Fe^{2+} , mientras que su pareja redox DHHLA posee propiedades protectoras ante el radical hidroxilo, ácido hipocloroso, radical peróxido, radical superóxido y puede quelar tanto Fe^{2+} como Fe^{3+} (Packer *et al.*, 1995.)

Junto con lo anteriormente mencionado, cabe destacar que la pareja AL/DHHLA es capaz de regenerar otros antioxidantes. El potencial redox AL/DHHLA es de -0,32 V mientras que el de la pareja glutatión/disulfuro de glutatión (GSH/GSSG) es de -0,24 V por lo que el DHHLA es capaz de reducir directamente GSSG a GSH (Jocelyn, 1967). Además, se ha visto *in vivo* que la administración intraperitoneal de LA en ratas aumenta

los niveles de GSH en varios tejidos (Busse *et al.*, 1992; Bustamante *et al.*, 1998; Khanna *et al.*, 1999). Adicionalmente, estudios *in vitro* muestran que el DHLA es capaz de reducir dehidroascorbato y el radical semihidroascorbato (Kagan *et al.*, 1992). Finalmente gracias a ser una molécula anfipática, el AL/DHLA es capaz de ejercer su función antioxidante tanto en membranas como en citosol (Packer *et al.*, 1995).

1.6 Biosíntesis del ácido lipoico

El conocimiento sobre la biosíntesis del AL y la incorporación de éste a proteínas (“lipoilación”) se fue generando inicialmente a partir de estudios realizados en bacterias y hongos. El modelo más estudiado es *Escherichia coli*, en el cual la lipoilación está basada en una ruta *de novo* y otra de reciclaje de lipoato libre (Morris *et al.*, 1994). En la ruta *de novo*, una octanoil transferasa (LipB, EC 2.3.1.181) utiliza grupos octanoil recién sintetizados unidos a “acyl carrier protein” (ACP) para transoctanilar residuos de lisinas específicas en las proteínas blanco. Posteriormente, una lipoil sintasa (LipA, EC 2.8.1.8) inserta dos átomos sulfuro desde una S-adenosil metionina en los carbonos 6 y 8 del grupo octanoil unido a la proteína blanco (Cicchillo y Booker, 2005; Cicchillo *et al.*, 2004; Hayden *et al.*, 1992). Por otro lado, en la ruta de reciclaje en bacterias, la enzima central es una lipoato ligasa (LplA, EC 2.7.7.63; Christensen y Cronan, 2010) la cual utiliza lipoato libre u octanoato reciclado desde el medio intra- y extracelular (Hermes y Cronan, 2009; Ramaswamy y Maurelli, 2010). La reacción ocurre en dos pasos; el lipoato sufre una primera activación a lipoil-AMP y luego es unido a la respectiva proteína blanco (Morris *et al.*, 1994) para realizar su función como cofactor (*e.g.* en el

complejo piruvato deshidrogenasa, acepta el grupo acilo desde un Acil-TTP formado por la sub unidad E1 formando acil-lipoato y lo entrega a la CoASH formando Acetil-CoA).

En plantas, el proceso de lipoilación es similar al descrito en microorganismos, con la salvedad que puede ocurrir en mitocondrias y en cloroplastos. La mayoría del lipoato es producido en la mitocondria (Gueguen *et al.*, 2000; Rebeille *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 1997; Yasuno *et al.*, 2004) donde la lipoilación de proteínas ocurre vía lipoil transferasa (LIP2; Wada *et al.*, 2001) y lipoil sintasa (LIP1; Yasuno y Wada, 1998), y posiblemente mediante lipoato ligasa, la cual puede incorporar tanto octanoato como AL a las proteínas blanco (LPLA; Ewald *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2007). Además de la ruta antes mencionadas, se han descrito en *Arabidopsis thaliana* isoformas para los genes de las enzimas octanoil transferasa (*Atlip2p*, Wada *et al.*, 2001; *Atlip2p2*, Ewald *et al.*, 2014) y lipoil sintasa (*Atlip1p*, Yasuno y Wada, 2002) y que codifican proteínas con destinación a cloroplasto, organelo en el cual ocurre la síntesis de ácidos grasos, desde la cual comienza la síntesis *de novo* de AL. Un esquema del proceso en *A. thaliana* se muestra en la **Figura 3**.

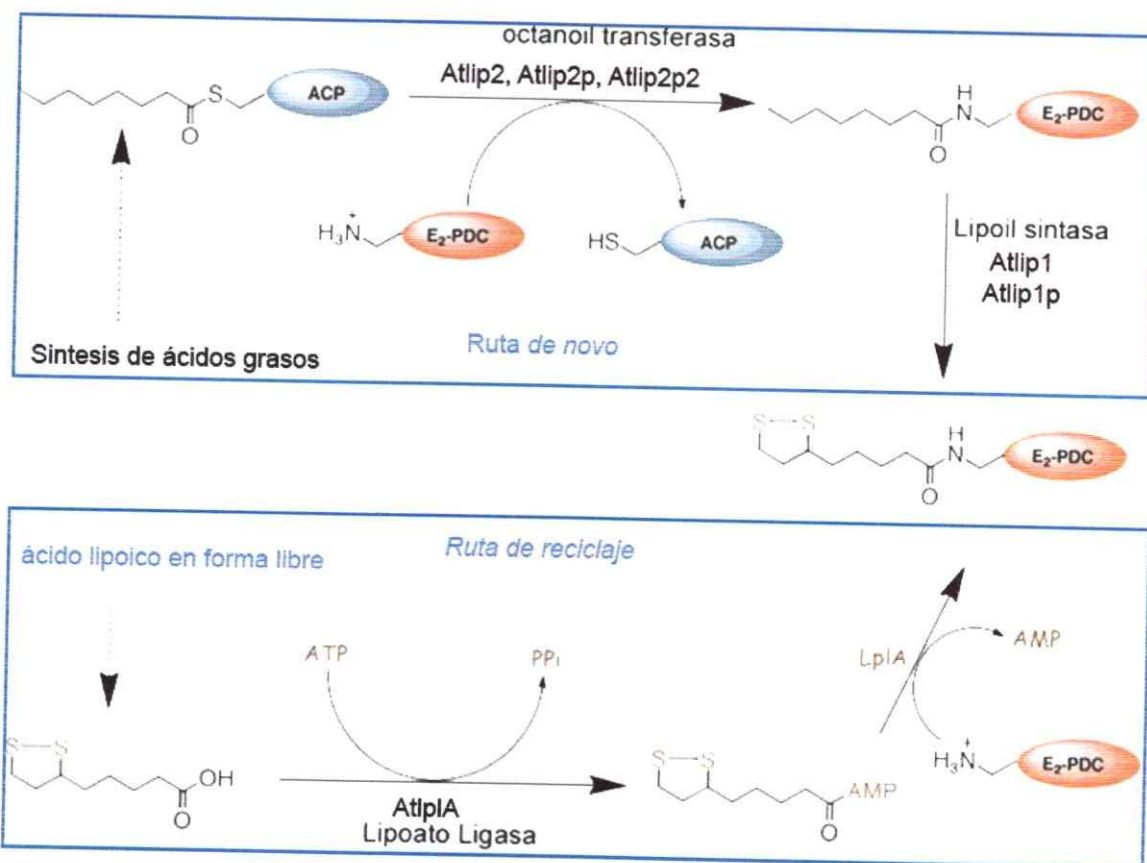


Figura 3: Ruta de síntesis de ácido lipoico en *A. thaliana*. En la figura se muestra un esquema de las enzimas que participan en la síntesis del ácido lipoico y los genes que las codifican en *A. thaliana*. En la parte superior se muestra la ruta de síntesis *de novo*, en la cual la enzima octanoil transferasa transfiere un grupo octanoil a un grupo amino específico de la enzima blanco. Posteriormente la enzima lipoil sintasa incorpora un átomo de azufre en los carbonos C6 y C8. En la parte inferior se muestra la ruta de reciclaje en la cual el ácido lipoico libre es incorporado a la enzima blanco por acción de la enzima lipoato ligasa.

1.7 Evidencias de ácido lipoico y respuesta a estrés en organismos vegetales

En la literatura se encuentran algunos ejemplos que sugieren una relación entre el metabolismo del AL y la respuesta a estrés abiótico en organismos vegetales. Estudios realizados en *Hordeum vulgare L.* (cebada) muestran que una variedad que es más tolerante a salinidad posee niveles mayores de AL cuando la planta no está sujeta a

ningún tipo de estrés, y que al ser sometida a concentraciones crecientes de NaCl, el contenido de DHLA es mayor en comparación a una variedad que no presenta tolerancia (Perez-Lopez *et al.*, 2010). Se ha visto también que plántulas de *Triticum durum* (trigo) cuando son expuestas a exceso de cobre presentan un aumento en las concentraciones de DHLA luego de 48 horas (Sgherri *et al.*, 2002). Junto con anterior, estudios realizados en *Solanum lycopersicum* (tomate) muestran que, al ser expuestos a riego con exceso de salinidad, se genera un aumento en el contenido de DHLA (Sgherri *et al.*, 2008; Sgherri *et al.*, 2007). Finalmente mediante la utilización de la base de datos para micro arreglos eFP Browser (Winter *et al.*, 2007) se encontró que en plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a estrés de tipo oxidativo mediante el uso de paraquat, aumentan los niveles de transcrito del gen *Atlip1* mientras que para los genes *Atlip2* y *AtlplA* disminuyen.

1.8 Estrategia Desarrollada

La presente tesis tiene por objetivo desarrollar una prueba de concepto para generar tolerancia a estrés de tipo abiótico mediante la manipulación del metabolismo del ácido lipoico. Al ser una primera aproximación, se utilizará el organismo modelo *Arabidopsis thaliana*, el cual posee la ventaja de tener su genoma secuenciado, tener un ciclo de vida corto en comparación a otras especies vegetales y ser de fácil manipulación. Además, se trabajará con *S. lycopersicum* cv. Micro Tom, el cual a diferencia de trigo y cebada posee un genotipo diploide. Además de esto, el tomate Micro Tom tiene la ventaja de poseer un ciclo de vida corto respecto a otras especies vegetales, su genoma se encuentra secuenciado y es un buen modelo para el estudio de frutos, pensando en futuras aplicaciones.

Con el objetivo de generar mayor tolerancia a estrés abiótico mediante la manipulación del metabolismo del AL se utilizaron dos aproximaciones:

La primera aproximación consistió en generar plantas de *A. thaliana* que sobre expresan el gen que codifica la enzima lipoil sintasa (LIP1), el cual se sabe, mediante datos de micro arreglos, aumenta sus niveles de expresión cuando la planta es expuesta a estrés oxidativo y su producto génico (LIP1) participa tanto en la ruta *de novo* como de reciclaje (cuando LPLA une octanoato a las proteínas blanco; Ewald *et al.*, 2014).

Como segunda aproximación, y basándose en que tratamientos con AL en levaduras aumentan su tolerancia a tratamientos con agentes que generan daño oxidativo (Wu *et al.*, 2011), lo cual sugiere fuertemente que esta molécula es capaz de atravesar membranas y pared celular, se realizaron tratamientos exógenos con AL en *A. thaliana* y tomate, y se observó el efecto en ellas cuando fueron sometidas o no a diversos estreses abióticos.

1.9 Hipótesis

La manipulación del metabolismo del ácido lipoico otorgará una ventaja adaptativa frente a estrés abiótico en organismos vegetales.

1.10 Objetivo general

Generar una mejor adaptación en organismos vegetales sometidos a estrés abiótico mediante la manipulación del metabolismo del ácido lipoico.

1.11 Objetivos Específicos

1. Identificación y clonación del gen que codifica la enzima lipoil sintasa desde *A. thaliana* (*Atlip1*) y *S. lycopersicum* (tomate; *Sllip1*). Caracterización funcional de SILIP1 y determinación de su localización subcelular.
2. Generación de líneas de *A. thaliana* que sobre expresen el gen endógeno *Atlip1*, o que expresen el gen *Sllip1* proveniente de tomate.
3. Análisis fenotípico y molecular de plantas de *A. thaliana* y tomate (*S. lycopersicum*) germinadas a diferentes concentraciones de AL.
4. Evaluación de la tolerancia a estrés salino, oxidativo, metales pesados y déficit hídrico en plantas de *A. thaliana* germinadas en presencia o ausencia de AL.
5. Evaluación fenotípica de plantas de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* germinadas en presencia o ausencia de AL sometidas a déficit nutricional.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Identificación y clonación del gen que codifica la enzima lipoil sintasa desde *A. thaliana* (*Atlip1*) y *S. lycopersicum* (tomate; *Slip1*). Caracterización funcional de SILIP1 y determinación de su localización subcelular.

2.1.1 Crecimiento vegetal

Semillas de *A. thaliana* ecotipo *Col-0* fueron esterilizadas en etanol 70% durante 5 min y posteriormente lavadas en H₂O estéril. Una vez estériles las semillas fueron sembradas en placas con medio MS sólido 0,5x (#M519, Phyto technology laboratories; Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 1%, Agar 0,8% (#A296, Phyto technology laboratories) y mantenidas a 4 °C en oscuridad durante 24 a 48 horas para su estratificación. Una vez estratificadas las placas fueron traspasadas a un incubador con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad a temperatura y humedad constante de 22 °C y 60% respectivamente.

Semillas de *S. lycopersicum* cv Micro-Tom fueron esterilizadas mediante dos lavados durante 10 min con una solución Triton X-100 0,01% en etanol 70% seguidas de dos lavados con H₂O estéril. Una vez estériles las semillas fueron sembradas en placas con medio MS sólido 0,5x, sacarosa 3%, Agar 0,8% y mantenidas a 4 °C en oscuridad durante 24 a 48 horas para su estratificación. Una vez estratificadas las placas fueron traspasadas a un incubador con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad a temperatura y humedad constante de 22 °C y 60% respectivamente.

Semillas de *N. tabacum* fueron sembradas directamente en tierra de hoja. Se dejaron crecer durante 4 meses en una cámara de cultivo con fotoperiodo de 16/8 h

luz/oscuridad a temperatura constante de 24 °C con riego regular de 2 veces por semanas.

2.1.2 Identificación y clonación de *Atlip1* y *Sllip1*

Para la clonación del gen *Atlip1* (LIP1; At2g20860; Yasuno y Wada, 1998), se diseñaron partidores *Atlip1F*, *Atlip1R* y *Atlip1R_ns* (Anexo 1) a partir de la CDS obtenida desde la base de datos NCBI (NCBI Resource Coordinators, 2017).

Para la identificación del gen que codifica la enzima lipoil sintasa en tomate, se utilizó la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) de la base de datos NCBI, ingresando como referencia la secuencia de la proteína lipoil sintasa de *A. thaliana* (LIP1; Yasuno y Wada, 1998). Una vez identificada la secuencia se diseñaron los partidores *Sllip1F*, *Sllip1R* y *Sllip1R_ns* (Anexo 1).

2.1.3 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Plántulas completas de 10 días (*A. thaliana*) o 14 días (*S. lycopersicum*) crecidas *in vitro* fueron maceradas en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. A partir de éste se realizó una extracción de RNA utilizando el kit E.Z.N.A Plant RNA kit (#R6827-01, OMEGA bio-Tek) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenido el RNA se analizaron sus índices de calidad y concentración utilizando el equipo NanoVue (General Electric) y se le realizó un tratamiento con DNasa (#EN0521, Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Una vez finalizado el tratamiento, se utilizaron 3,5 µg de RNA para realizar una transcripción reversa a cDNA utilizando la enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase (#M3803, Promega) siguiendo

las indicaciones del fabricante con la utilización de RiboLock (#EO0381, ThermoFisher Scientific) como inhibidor de ribonucleasa y oligoAP (Anexo 1) como partidor.

2.1.4 Amplificación y purificación de *Atlip1* y *Sllip1*

Utilizando el cDNA obtenido (sección 2.1.3) como molde, se amplificó la secuencia correspondiente al CDS de *Atlip1* mediante PCR con la enzima *OneTaq® DNA Polymerase* (#M0480S, New England Biolabs) siguiendo el protocolo del fabricante. Se amplificó la secuencia incluyendo el codón de término (partidores *Atlip1F* y *Atlip1R*), y sin el codón de término (partidores *Atlip1F* y *Atlip1R_ns*), utilizando para ambos casos el programa de reacción *Atlip1* (Anexo 2). Para *Sllip1* se utilizó la enzima *Herculase II Fusion DNA Polymerases* (#600675, Agilent Technologies) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Se amplificó la secuencia incluyendo el codón de término (partidores *Sllip1F* y *Sllip1R*), y sin el codón de término (partidores *Sllip1F* y *Sllip1R_ns*), utilizando para ambos casos el programa de reacción *Sllip1* (Anexo 2).

El producto de PCR se resolvió mediante electroforesis a 90 V en un gel de agarosa al 1,5% (SeaKem® LE Agarose, #50004 Lonza), luego de lo cual fue teñido con bromuro de etidio 5 mM y visualizado en un transiluminador UV (WUV M20). Finalmente, el producto de PCR observado fue cortado desde el gel y purificado utilizando el kit *Wizard SV gel and PCR clean-up system* (#A9281, Promega) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante.

2.1.5 Clonación en el vector de entrada pCR™8:

Una vez purificados los productos de PCR (sección 2.1.4) se procedió con la clonación de estos en el vector pCR™8 (#K250020, Thermo Fisher Scientific) y

posterior transformación de *E. coli* MATCH One Shot™ TOP10 siguiendo las indicaciones de fabricante, obteniendo para *Atlip1* las construcciones pCR8-*Atlip1* y pCR8-*Atlip1*ns (sin el codón de termino) y para *Sllip1* las construcciones pCR8-*Sllip1*, pCR8-*Sllip1*ns (sin el codón de termino) y pCR8-SIAS (secuencia codificante de *Sllip1* en anti-sentido respecto a los bordes de recombinación).

Una vez transformadas las bacterias, se verificó la presencia del vector mediante PCR de colonia, el cual consistió en utilizar como molde una pequeña sección de una colonia bacteriana la cual se suspendió en 50 µL de H₂O y se calentó a 95 °C durante 10 min, para luego tomar 1 µL para ser utilizado como molde (reacciones utilizadas en sección 2.1.4). Posteriormente se realizó una extracción de pDNA, el cual fue enviado a secuenciar a Macrogen USA verificando para ambas construcciones la direccionalidad del gen en el vector y la presencia o ausencia del codón de termino dependiendo de cada caso.

2.1.6 Obtención cepa *E. coli* KER176

La caracterización funcional de SILIP1 se basó en el trabajo de Yasuno y Wada (1998), para lo cual se utilizó la cepa de *E. coli* KER176, la cual no expresa lipoil sintasa, *lipA* (*rpsL lipA150::Tn1000dKn*; Vanden Boom *et al.*, 1991) y fue donada generosamente por el Dr. John E. Cronan Jr. (Departamento de Microbiología de la Universidad de Illinois). Una vez recibida la cepa en agar profundo ésta fue rayada en una placa de medio mínimo MME+G (MgSO₄ · 7H₂O 0,81 mM, ácido cítrico · H₂O 10,4 mM, K₂HPO₄ 57,4 mM, NaNH₄HPO₄ · 4H₂O 16,7 mM, glucosa 0,8%) suplementado con Kan 25 mg/mL y AL 5 ng/mL y se incubó a 37°C durante 72 h. Se seleccionaron

colonias y se inocularon en MME+G líquido con Kan 25 mg/mL y AL 5 ng/mL, dejándolas crecer a 37 °C durante 72 h. Finalmente se guardó un stock con glicerol (50%) a -80 °C.

2.1.7 Predicción de la región correspondiente al péptido señal de Sllip1

Para realizar la complementación de *lipA*, se trabajó con la secuencia de las proteínas vegetales sin incluir el péptido señal. Para determinar dicha secuencia se utilizaron los programas informáticos ChloroP 1.1 Server (Emanuelsson *et al.*, 1999), TargetP 1.1 Server (Emanuelsson *et al.*, 2000) y SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011).

2.1.8 Clonación del gen *Atlip1* y *Sllip1* sin péptido señal en pCRTM8

Para la clonación de *Atlip1* sin el péptido señal se utilizaron los partidores *Atlip1expF* y *Atlip1expR* (Anexo 1), mientras que para la clonación del gen *Sllip1* sin el péptido señal se utilizaron los partidores *Sllip1mexpF* y *Sllip1mexpR* (Anexo 1). Esta sección fue realizada por Simón Miranda en el contexto de su tesis de magister (Miranda, 2017), obteniendo los vectores pCR8- Δ 18*Atlip1* y pCR8- Δ 30*Sllip1*.

2.1.9 Generación de vectores de expresión pDEST-HisMBP

Los vectores pCR8- Δ 18*Atlip1* y pCR8- Δ 30*Sllip1* fueron recombinados con el vector pDEST-HisMBP (Addgene plasmid # 11085; Nallamsetty *et al.*, 2005) por Simón Miranda, en el contexto de su tesis de magister (Miranda, 2017), obteniendo los vectores pDEST-*Atlip1* y pDEST-*Sllip1*.

Utilizando el vector pCR8-SIAS (sección 2.1.5), el cual posee la secuencia de *Sllip1* en anti sentido, se realizó la recombinación mediante tecnología GatewayTM con el vector pDEST-HisMBP utilizando la enzima GatewayTM LR ClonaseTM Enzyme mix

(#11791019, ThermoFisher Scientific) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, obteniéndose el vector pDEST-SIAS, el cual fue verificado mediante PCR (partidor Sllip1F y HIS_F, Anexo 1; reacción HIS-AS, Anexo 2) a colonias portadoras del vector.

2.1.10 Transformación de KER176 con los vectores pDEST

La transformación con los vectores pDEST-Atlip1 y pDEST-Sllip1 fue realizada por Simón Miranda, en el contexto de su tesis de magister (Miranda, 2017), obteniendo las cepas KER176-Atlip1 y KER-176-Sllip1.

Para la transformación con el vector pDEST-SIAS, se generó la cepa KER176 quimio-competente, para lo cual se creció una alícuota en 5 mL de MME+GAS (MME+G suplementado con acetato de sodio 5 mM y succinato de sodio 5 mM) suplementado con kan 25 mg/mL durante toda la noche. Luego de este tiempo fue centrifugado a 4000 g durante 10 min y resuspendido en un volumen de CaCl₂ 20 mM a 4 °C. Posteriormente fue centrifugado a 4000 g durante 10 min y resuspendido en 1 mL de CaCl₂ 20 mM a 4°C. Luego de esto se agregaron 500 ng de vector pDEST-SIAS, se dejó en hielo durante 10 min, se le dio un golpe de calor a 42 °C durante 45 s para luego dejarla en hielo durante 5 min. Finalmente se sembró en una placa MME+GAS con kan 25 mg/mL y amp 50 mg/mL la cual se incubó a 37 °C durante 48 h, luego de lo cual se seleccionaron colonias las que se dejaron crecer a 37 °C en medio MME+GAS líquido con kan 25 mg/mL y amp 50 mg/mL para finalmente guardar un stock en glicerol a -80 °C, obteniéndose la cepa KER176-SIAS.

2.1.11 Complementación heteróloga de KER176

Las cepas KER176 transformadas con cada uno de los 3 vectores (pDEST-Atlip1, pDEST-SIlip1, pDEST-SIAS) fueron crecidas en medio MME+G líquido suplementado con IPTG 0,5 mM, AL 5 ng/mL, acetato de sodio 5 mM y succinato de sodio 5 mM durante toda la noche a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 1 y 1,5. Posteriormente fueron centrifugadas y lavadas en medio MME para eliminar los remanentes de AL, acetato de sodio y succinato de sodio. Finalmente, las células fueron re-suspendidas a una DO_{600nm} cercana a 1,0 y rayadas en medio sólido MME+G y MME+GAS (MME+G suplementando con acetato de sodio 5 mM y succinato de sodio 5 mM), o inoculadas en placas de 96 pocillos con medios MME+G o MME+AL y se siguió su cinética de crecimiento a 600 nm cada 1 h durante 48 h a 37 °C (espectrofotómetro BioTek EPOCH2). Todos los medios fueron suplementados con kan 50 mg/mL y amp 100 mg/mL para mantener la selección de la cepa y el vector.

2.1.12 SDS-PAGE e inmuno detección

Se realizó una extracción de proteínas totales de las cepas KER176 transformadas con cada uno de los 3 vectores (pDEST-Atlip1, pDEST-SIlip1, pDEST-SIAS), tanto inducidas como sin inducir con IPTG, mediante el uso del kit comercial B-PER™ (#78248, ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidas, las proteínas fueron cuantificadas con el uso de *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent* (#5000006, Bio-Rad). Se utilizaron 25 µg de cada muestra para realizar un SDS-PAGE al 10% o 12% utilizando el marcador de peso molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (#26616, ThermoFisher Scientific).

Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante electro transferencia (15 V durante 15 min). Las membranas se bloquearon durante 2 h en TBS-T (Tris-HCl pH 7,5 20 mM, NaCl 140 mM, Tween-20 0,1%) en 5% leche descremada a temperatura ambiente, y lavadas 3 veces durante 10 min con TBS-T. Para el *westernblot* anti-HIS, la membrana fue incubada en el anticuerpo primario monoclonal α -polyhistidine (1:5000; H1029 Sigma) por 2 h, lavado 3 veces por 10 min con TBS-T y luego incubado con el anticuerpo secundario *Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase* (1:10000; A1293 Sigma) por 2 h y revelado con NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) y BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt). Para el *westernblot* anti-ácido lipoico, la membrana fue incubada en el anticuerpo primario *rabbit polyclonal anti-lipoic acid primary antibody* (1:3000; #437695 Calbiochem) por 2 h, lavado 3 veces durante 10 min con TBS-T, luego incubado con el anticuerpo secundario *Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate* (1:5000; #1706515 BioRad) durante 2 h y revelado con *Pierce™ CN/DAB Substrate Kit* (#3400, Thermo Scientific Pierce).

2.1.13 Generación del vector pEarlyGate101

A partir del vector pCR8-Sllip1ns (sección 2.1.5) y utilizando el vector de destinación pEarlyGate101 (Earley *et al.*, 2006) se generó, mediante tecnología *Gateway™* (sección 2.1.9), el vector pEG-Sllip1, el cual se corroboró realizando un PCR (sección 2.1.4) a colonias portadoras del vector.



2.1.14 Transformación de *A. tumefaciens* cepa EHA105

Se rayó la cepa EHA105 en medio LB (triptona 1%, NaCl 1% y extracto de levadura 0,5%) solido (1,6% agar-agar) suplementado con el antibiótico rifampicina 10 µg/mL, y se dejó crecer a 28 °C durante 48 h. Posteriormente se inoculó una colonia individual en 5 mL de medio LB líquido y se dejó creciendo durante la noche a 28 °C en agitación constante a 180 rpm. Al día siguiente el cultivo se dejó en hielo durante 30 min, se transfirieron 1,5 mL a un tubo nuevo y se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm a 4 °C, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet suavemente en 1 mL de CaCl₂ 20 mM pre enfriado, manteniendo siempre el tubo en frío. Una vez resuspendido se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm a 4°C, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet suavemente en 200 µL de CaCl₂ 20 mM pre enfriado, se agregaron 500 ng del plásmido pEG-Sllip1 y se mantuvo en hielo durante 5 min para luego ser dejado en nitrógeno líquido durante 5 min. Una vez transcurrido el tiempo en nitrógeno líquido se dio un golpe de temperatura a 37 °C durante 5 min y se puso nuevamente en hielo durante 5 min. Finalmente se agregó 1 mL de medio LB y se incubó a 28 °C durante 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se sembraron 200 µL en una placa de LB solido suplementado con kan 100 mg/mL y rif 10 mg/mL y se dejó a 28°C durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo se seleccionaron algunas colonias y se comprobó la presencia del vector pEG-Sllip1 mediante un PCR a colonias portadoras del vector (sección 2.1.4).

2.1.15 Infiltración de hojas de *N. tabacum*

La cepa EHA105 portadora del vector pEG-Sllip1 fue utilizada para realizar la infiltración y expresión transitoria en hojas de plantas de *N. tabacum* de 4 meses de edad según el protocolo establecido (Sparkes *et al.*, 2006).

2.1.16 Tratamiento con Mitotracker y visualización en microscopia confocal

Cuatro días luego de realizada la infiltración, se cortó una sección de la hoja de tabaco infiltrada y se incubó en 350 mM de MitoTracker Red CMXRos (#M7512 Thermo Fisher) durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo las hojas fueron visualizadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta y las imágenes analizadas mediante el programa Zeiss LSM image Browser v.3.1.0.99

2.2 Generación de líneas de *A. thaliana* que sobre expresen el gen endógeno *Atlip1*, o que expresen el gen *Sllip1* proveniente de tomate

2.2.1 Generación de los vectores pGWB8-*Atlip1* y pGWB8-*Sllip1*

A partir de los vectores pCR8-*Atlip1*ns y pCR8-*Sllip1*ns se generaron, mediante tecnología *Gateway*TM (sección 2.1.9), los vectores pGWB8-*Atlip1* y pGWB8-*Sllip1* respectivamente los que poseen el promotor fuerte y constitutivo 35S, generan una proteína de fusión a 6xHIS carboxilo terminal y poseen selección por higromicina y kanamicina en plantas. Una vez construidos, los vectores se verificaron mediante PCR a colonias portadoras de dichas construcciones (reacción en sección 2.1.4). Finalmente se realizó una extracción de pDNA para las bacterias portadoras de cada construcción.

Los vectores pGWB8-*Atlip1* y pGWB8-*Sllip1* fueron incorporados a la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* mediante transformación por golpe térmico (sección 2.1.10)

2.2.2 Transformación estable mediante inmersión floral

Para la transformación estable de *A. thaliana* se crecieron cepas de *A. tumefaciens* EHA105 portadoras, de manera independiente, de los vectores pGWB8-Atlip1 y pGWB8-Sllip1 (sección 2.1.5) en medio LB. Una vez alcanzada una D.O._{600nm} de 0,8, los cultivos fueron centrifugados a 4000 g durante 10 min y resuspendidos en medio de infiltración (sacarosa 5%, silwet-77 0,05%). Seis plantas de *Arabidopsis* de entre 6 a 8 semanas con suficientes botones florales (plantas de 2 semanas son pasadas a tierra en una cámara de cultivo, sección 2.1.1) fueron sumergidas durante 3 a 5 segundos en el medio de infiltración para cada vector (inmersión floral) y fueron dejadas en oscuridad durante 24 horas para luego ser nuevamente trasladadas a la cámara de cultivo en donde se mantuvieron hasta la etapa de recolección de semillas (4-5 meses post germinación; basado en Clough y Bent, 1998)

2.2.3 Selección de plantas transformantes por resistencia a antibiótico

Las semillas (T1) provenientes de las plantas sometidas a la técnica de inmersión floral (sección 2.2.2) fueron colectadas y sembradas en un medio MS suplementado con hyg 50 mg/mL (el vector pGWB8 de ser exitosa la transformación integrará, además del gen de interés, *hptII* que otorga resistencia a higromicina) y se analizó la sobrevivencia de las plantas luego de una semana. Se analizaron más de 25.000 semillas para cada una de las construcciones. Las plantas T1 resistentes al antibiótico fueron seleccionadas y pasadas a tierra.

2.2.4 Corroboración de plantas transformantes por PCR

Las plantas (T1) seleccionadas se dejaron crecer durante 3 meses hasta poder extraer tejido sin afectar la viabilidad de la planta. Se realizó una extracción de gDNA para lo cual, una hoja caulinar fue homogenizada en 200 μ L de buffer TNE/SDS (Tris-HCl 200 mM pH 8, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, pH 8, 0,5% SDS) y se centrifugó durante 5 min a 12.000 g. Al sobrenadante se le agregó 200 μ L de isopropanol y se mezcló mediante vortex. Se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante para luego lavar el pellet 2 veces en etanol 70% (centrifugando luego de cada lavado) para finalmente resuspender el pellet en 20 μ L de H₂O. El gDNA obtenido se utilizó como molde para realizar un PCR dirigido a: el gen *gapa* (partidores *gapaF* y *gapaR*, Anexo1; reacción *gapa*, anexo 2), los genes en estudio hasta la secuencia 6xHIS carboxilo terminal (*Atlip1-6xhis* o *Sllip1-6xhis*; partidores *Atlip1F*, *Slip1F* y *HISR*, en anexo 1, reacción *genHIS* anexo 2) y al gen *hpt* (partidores *hptF* y *hptR*, Anexo1; reacción *HPT*, Anexo 2). Todas aquellas plantas que resultaron positivas al análisis molecular se dejaron crecer y se recolectaron las semillas (generación T2). Las semillas T2 fueron sembradas en medio de selección con antibiótico y se analizó la frecuencia de resistencia al antibiótico luego de una semana (una segregación mendeliana del 75% de resistencia sugiere que hubo un solo evento de inserción en T1). Se seleccionaron entre 8 y 10 plantas provenientes de placas de crecimiento con segregación mendeliana y se dejaron crecer para obtener sus semillas (T3). Las semillas (T3) fueron sembradas en medio de selección y se eligieron aquellas provenientes de una placa con 100% de resistencia lo cual implica un genotipo homocigoto para la resistencia y el gen de interés.

2.3 Análisis fenotípico y molecular de plantas de *A. thaliana* y tomate (*S. lycopersicum*) germinadas a diferentes concentraciones de AL.

2.3.1 Siembra y preparación de placas de MS con AL

Semillas de *A. thaliana* ecotipo *col-0* fueron esterilizadas y sembradas en placas con medio MS sólido 0,5x (sección 2.1.1) y diferentes concentraciones de AL (#62320-5G-F Sigma-Aldrich) para luego mantenerlas a 4 °C en oscuridad durante 24 a 48 horas para su estratificación. El AL fue disuelto en etanol absoluto (#107017, Merck) de forma tal que agregando 10 µL en 50 mL de medio MS se alcanzaran concentraciones entre 0 y 250 µM en el medio. El AL fue agregado después de que el medio MS fuese auto clavado y antes de la solidificación del mismo. El grupo control (concentración 0 de AL) son plantas crecidas en medio MS suplementado con 10 µL de etanol absoluto.

2.3.2 Cuantificación del largo de la raíz principal e índice de raíces laterales

Las plantas crecidas a diferentes concentraciones de AL fueron mantenidas en el incubador (sección 2.1.1) durante 7, 10 o 14 días dependiendo de cada experimento. Luego de ese tiempo las placas fueron escaneadas y analizadas con el programa ImageJ v 1.5 (Schneider *et al.*, 2012) para la determinación del largo de su raíz principal y el Índice de Raíces Laterales (IRL; número de raíces laterales emergidas sobre el largo de la raíz principal).

2.3.3 Extracción de RNA y obtención de cDNA

Un *pool* de plántulas completas de 10 días que fueron germinadas en presencia o ausencia de 100 nM de AL (sección 2.3.1) fueron maceradas en nitrógeno líquido hasta

obtener un polvo fino. A partir de éste se realizó la extracción de RNA y la síntesis de cDNA según sección 2.1.3.

2.3.4 Cuantificación de los niveles de expresión de genes relacionados a la ruta del AL mediante qRT-PCR

Para la realización del qRT-PCR se utilizó el kit SensiMix™ SYBR® Hi-ROX (#QT605-05, Bioline) siguiendo las indicaciones del fabricante, utilizando 50 ng de molde y partidores a una concentración de 500 nM.

Se midieron los niveles de expresión de los genes *Atlip1*, *Atlip2*, *Atlpla* y *AtmtE21* (partidores 7+8, 9+10, 11+12 y 13+14 respectivamente; Anexo 1), y se utilizaron como *housekeeping* los genes *At4g26410*, *At4605320* y *At1g13320*, utilizando la reacción qRT-PCR (Anexo 2) empleando el equipo *Stratagene Mx3000P* (Agilent Technologies) y el programa MxPro – Mx3000p v4.10 (Stratagene) para el análisis de datos.

La eficiencia de los partidores se calculó para cada reacción utilizando el programa LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003) y se determinó el mejor *housekeeping* mediante el algoritmo NormFinder (Andersen *et al.*, 2004). La expresión relativa se calculó mediante el uso de la **Ecuación 1**:

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{E_{gen}^{\Delta Ct(\text{control-experimental})}}{E_{hk}^{\Delta Ct(\text{control-experimental})}}$$

Ecuación 1: Ecuación para determinar la expresión relativa de un gen. Ecuación utilizada para calcular la expresión relativa en donde *Egen* se refiere a la eficiencia del gen en estudio y *Ehk* a la eficiencia del *housekeeping*

2.3.5 Cuantificación de los niveles de lipoilación mediante western blot

Un *pool* de plántulas completas de 10 días que fueron germinadas en presencia de 100 nM de AL (sección 2.3.1) fueron maceradas en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. A partir de éste se realizó una extracción de proteínas utilizando el kit comercial *P-PER™ Plant Protein Extraction Reagent* (#89803, ThermoFisher Scientific). Se utilizaron 50 µg del extracto para realizar un SDS-PAGE y una inmuno detección (sección 2.1.12) utilizando como anticuerpo primario una mezcla entre *rabbit polyclonal anti-lipoic acid primary antibody* (1:3000) y *Anti-ACTIN antibody produced in rabbit* (1:2000; #SAB4301137, Sigma-Aldrich) y como anticuerpo secundario *Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate* (1:5000; #1706515 BioRad). Una vez revelada la membrana se procedió a cuantificar la señal relativa de las proteínas lipoiladas respecto a la señal correspondiente a actina a través de cuantificación de píxeles mediante el uso del programa ImageJ. Se cuantificaron en total 6 cargas de proteínas distintas.

2.3.6 Cultivo en medio hidropónico de *S. lycopersicum*

Semillas de *S. lycopersicum* (tomate) cv Micro Tom fueron sembradas en un sustrato inerte de vermiculita y perlita 1:1 hidratado con medio hidropónico preparado a partir de un stock 100X (KNO₃ 125 mM, Ca(NO₃)₂ 150 mM, MgSO₄ 75 mM, KH₂PO₄ 50 mM, KCl 5 mM, H₃BO₃ 5 mM, MnSO₄ 1 mM, ZnSO₄ 200 µM, CuSO₄ 150 µM, Na₂SiO₃ 10 mM y Sprint 330 7,7 mM [Fe quelado en DTPA (Ácido di-etilen-tri-amino-pentaacético)], ajustado a pH 5,0) suplementado con AL a 0, 50 nM o 100 nM. Las plantas se dejaron crecer en una cámara de cultivo con fotoperiodo de 16/8 h

luz/oscuridad a temperatura constante de 24 °C y fueron regadas una vez por semana con medio hidropónico (sin AL). Al cuarto mes se cuantificó el número, peso fresco y calibre de los frutos.

2.3.7 Cultivo en tierra de *S. lycopersicum*

Semillas de *S. lycopersicum* (tomate) cv Micro Tom fueron sembradas en recipientes de tierra de turba (turba compacta Jiffy®) hidratada con 0, 50 o 100 nM de AL diluido en agua, luego de lo cual se mantuvieron en una cámara de cultivo con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, a temperatura constante de 24 °C, con un régimen de riego semanal con agua, durante un mes. Transcurrido dicho tiempo los plantines fueron trasplantados a recipientes de 500 mL con una mezcla 2:1 de turba/vermiculita hidratada con agua. Luego de una semana los plantines provenientes del grupo control, es decir, que nunca fueron expuestos a AL, se dividieron en tres grupos; uno se regó con agua, el segundo se regó con AL 50 nM y el tercero se regó con AL 100 nM, mientras que los grupos previamente expuestos a AL fueron regados con agua. Luego de ese tratamiento todos los riegos posteriores fueron con agua, en un régimen de 2 veces por semana. Al cuarto mes se cuantificó el número, peso fresco y calibre de los frutos.

2.4 Evaluación de la tolerancia a estrés salino, oxidativo, metales pesados y déficit hídrico en plantas de *A. thaliana* germinadas en presencia y ausencia de AL

2.4.1 Ensayos de tolerancia a estrés salino

Luego de 7 días en un incubador (sección 2.3.1) las plantas fueron traspasadas a placas con medio MS sólido suplementado con 150 mM de NaCl y mantenidas en el incubador durante 4 días. Luego de este tiempo se cuantificó el largo de la raíz principal.

2.4.2 Ensayos de tolerancia a estrés oxidativo

Luego de 10 días en un incubador (sección 2.3.1) se midió el contenido de clorofila a una muestra de cada grupo. El resto las plantas fueron traspasadas a medio MS líquido suplementado con Paraquat 2 μM (#36541 Sigma-Aldrich) o sin suplementar a modo de control y fueron dejadas en oscuridad durante la noche. Al día siguiente las plantas en medio líquido fueron expuestas a luz roja/azul a una intensidad de $\sim 800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 6 horas en agitación a temperatura ambiente luego de lo cual se cuantificó el contenido de clorofila

2.4.2.1 Cuantificación del contenido de clorofila y carotenoides totales.

Entre 30 y 40 mg de tejido vegetal fueron molidos con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino el cual se resuspendió en 500 μL de acetona 80% a 4 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4 $^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se diluyó 10 veces en acetona 80% y se cuantificó la absorbancia a 450, 646, 663 y 750 nm en un espectrofotometro Jenway 6300. El contenido de clorofila y carotenoides se calculó con las ecuaciones 2, 3 y 4 (Lichtenthaler, 1987).

$$C_a = 12,25A_{663} - 2,79A_{646}$$

Ecuación 2: Cálculo para la concentración de clorofila A. Ecuación utilizada para calcular la concentración de clorofila A expresada en $\mu\text{g/mL}$ de extracto, A_n corresponde a la absorbancia medida en una longitud de onda de "n" nm.

$$C_b = 21,50A_{646} - 5,10A_{663}$$

Ecuación 3: Cálculo para la concentración de clorofila B. Ecuación utilizada para calcular la concentración de clorofila B expresada en $\mu\text{g/mL}$ de extracto, A_n corresponde a la absorbancia medida en una longitud de onda de "n" nm

$$C_{x+c} = \frac{1.000A_{470} - 1,82C_a - 85,02C_b}{198}$$

Ecuación 4: Cálculo para la concentración de carotenoides totales. Ecuación utilizada para calcular la concentración de carotenoides totales expresada en $\mu\text{g/mL}$ de extracto, A_n corresponde a la absorbancia medida en una longitud de onda de "n" nm

2.4.3 Ensayos de tolerancia a metales pesados

Luego de 7 días en un incubador (sección 2.3.1) las plantas fueron traspasadas a medio MS sólido suplementado con 150 μM de CuSO_4 o CdSO_4 y mantenidas en el incubador durante 4 días. Luego de este tiempo se cuantificó el largo de la raíz principal.

2.4.4 Ensayos de tolerancia a déficit hídrico

Luego de 7 días en un incubador (sección 2.3.1) las plantas fueron traspasadas a tierra en maceteros de 10 cm x 10 cm x 10 cm y fueron puestas en una cámara de cultivo (sección 2.1.1). Se traspararon 16 plantas por macetero y 6 maceteros por condición los cuales fueron puestos en bandejas que permitieran su riego por inundación. Las plantas fueron regadas por primera vez con AL 100 nM o con agua potable (control proveniente de placas sin AL) por inundación. Luego de eso se regaron nuevamente por inundación ambos grupos con agua potable siendo el último riego por inundación cuando las plantas tenían 16 días. Para efectos del ensayo se consideró el día 0 de estrés hídrico cuando las plantas tuvieron 21 días. Se midió el contenido relativo de agua los días 0, 7 y 14. Una vez traspasados 14 días de estrés las plantas fueron rehidratadas por inundación con agua potable y luego de 10 días se evaluó la tasa de sobrevivencia (número de plantas que sobrevivieron el ensayo respecto a las plantas que comenzaron el ensayo).

2.4.4.1 Contenido relativo de agua (RWC)

El contenido relativo de agua se evaluó de la siguiente manera: A los días 0, 7 y 14, tres plantas completas fueron tomadas aleatoriamente de cada grupo y se midió su masa (FW), luego se pusieron en H₂O durante 3 h y se volvió a medir su masa (TW) y finalmente fueron secadas en una estufa a 80 °C durante 48 h luego de lo cual nuevamente se midió su masa (DW). El contenido relativo de agua (RWC, por su sigla en inglés) se calcula como muestra la **Ecuación 5**.

$$RWC \% = \frac{FW-DW}{TW-DW} \times 100$$

Ecuación 5: Cálculo del contenido relativo de agua. Ecuación utilizada para calcular el contenido relativo de agua, en donde RWC es el contenido relativo de agua, FW la masa de la planta inmediatamente sacada de la tierra, TW la masa de la planta luego de haberse rehidratado durante 3 horas y DW la masa de la planta luego de haber sido secada a 80 °C durante 48 h.

Debido al tamaño y la poca masa de las plantas durante el día 0 se midió el peso de las 3 plantas de forma grupal, mientras que los días 7 y 14 la medición fue individual para cada planta.

2.5 Evaluación fenotípica de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* germinadas en presencia o ausencia de AL sometidas a déficit nutricional

2.5.1 Déficit nutricional en *A. thaliana*

Luego de 7 días en un incubador (sección 2.3.1) las plantas fueron traspasadas a placas con medio MS 0,05x y se escanearon para posterior cuantificación del largo de la raíz principal. Las placas fueron puestas nuevamente en el incubador durante 4 días. Luego de ese tiempo se volvió a cuantificar el largo de la raíz principal.

2.5.2 Déficit nutricional en plantas de tomate

Semillas de *S. lycopersicum* (tomate) cv Micro Tom fueron sembradas en vermiculita perlita 1:1, en recipientes de 500 mL el cual fue regado con medio hidropónico al 50% suplementado con 0, 50 o 100 nM de AL. Las plantas fueron regadas semanalmente intercalando una semana con medio hidropónico 50% y otra con agua. A modo de control un grupo fue regado durante todo el experimento con medio hidropónico 100%. Luego de 4 meses se cuantificó el número diámetro y peso fresco de los frutos.

2.6 Análisis Estadísticos

Para los experimentos con más de 2 grupos se realizó un test de ANOVA de una vía con un post test de comparación de Dunnett entre el grupo control y los experimentales considerando un *P value* de 0,05. Cuando hubo solo 2 grupos se realizó un t-test no pareado de dos colas, considerando un *P value* de 0,05. Para todos los casos los datos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism 6 v6.01.

3 RESULTADOS

3.1 Identificación y clonación del gen que codifica la enzima lipoil sintasa desde *A. thaliana* (*Atlip1*) y *S. lycopersicum* (tomate; *Sllip1*). Caracterización funcional de SILIP1 y determinación de su localización subcelular

3.1.1 Identificación y clonación del gen que codifica la enzima LIP1 en tomate

Considerando que existen datos empíricos respecto a variaciones en los niveles de AL en plantas de tomate ante un aumento en la salinidad (Sgherri *et al.*, 2008; Sgherri *et al.*, 2007) y que éste es un modelo de estudio con un genoma diploide el cual se encuentra secuenciado (Tomato Genome, 2012), se estudió la vía de lipoilación en esta especie. Además, dado que lipoil sintasa es la enzima común entre ambas rutas (de novo y reciclaje; Ewald *et al.*, 2014), se enfocó la investigación en LIP1, el cual aún no ha sido caracterizado.

Para la identificación del gen *lip1* en tomate, se utilizó la herramienta BLAST de la base de datos NCBI, ingresando como referencia las secuencias de la proteína lipoil sintasa mitocondrial de *A. thaliana* LIP1 (Yasuno y Wada, 1998) y la forma plastidial LIP1p (Yasuno y Wada, 2002). Se encontraron 4 posibles secuencias cuyas identidades se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Secuencias con mayor identidad aminoacídica a AtLIP1 y AtLIP1p. En la tabla se muestran las 4 secuencias con mayor identidad aminoacídica respecto a las proteínas LIP1 y LIP1p provenientes de *A. thaliana*, encontradas en la base de datos de proteínas disponible para *S. lycopersicum*.

Nombre	Acceso genbank	Identidad respecto a <i>A. thaliana</i>
SILIP1	XP004243321.1	93% de cobertura 84% identidad AtLIP1 88% de cobertura 51% identidad AtLIP1p
SILIP1p	XP004252893.1	94% de cobertura 52% identidad AtLIP1 93% de cobertura 78% identidad AtLIP1p
SILIPa	XP004245423.1	41% de cobertura 53% identidad a AtLIP1p 44% de cobertura 85% identidad a AtLIP1
SILIPb	XP004241394.1	58% cobertura 17% identidad a AtLIP1p 62% cobertura 15% identidad con AtLIP1

De las cuatro secuencias encontradas se descartaron las con menor cobertura e identidad (SILIPa y SILIPb). Con respecto a las secuencias SILIP1 y SILIP1p se decidió caracterizar durante el desarrollo de esta tesis la proteína SILIP1, la cual posee mayor identidad con la proteína mitocondrial de *A. thaliana* (alineamiento en

Figura 4), de la cual se poseen datos de micro arreglos en eFP Browser que muestran que sus niveles de expresión aumentan al someter el organismo a estrés oxidativo

(Winter *et al.*, 2007).

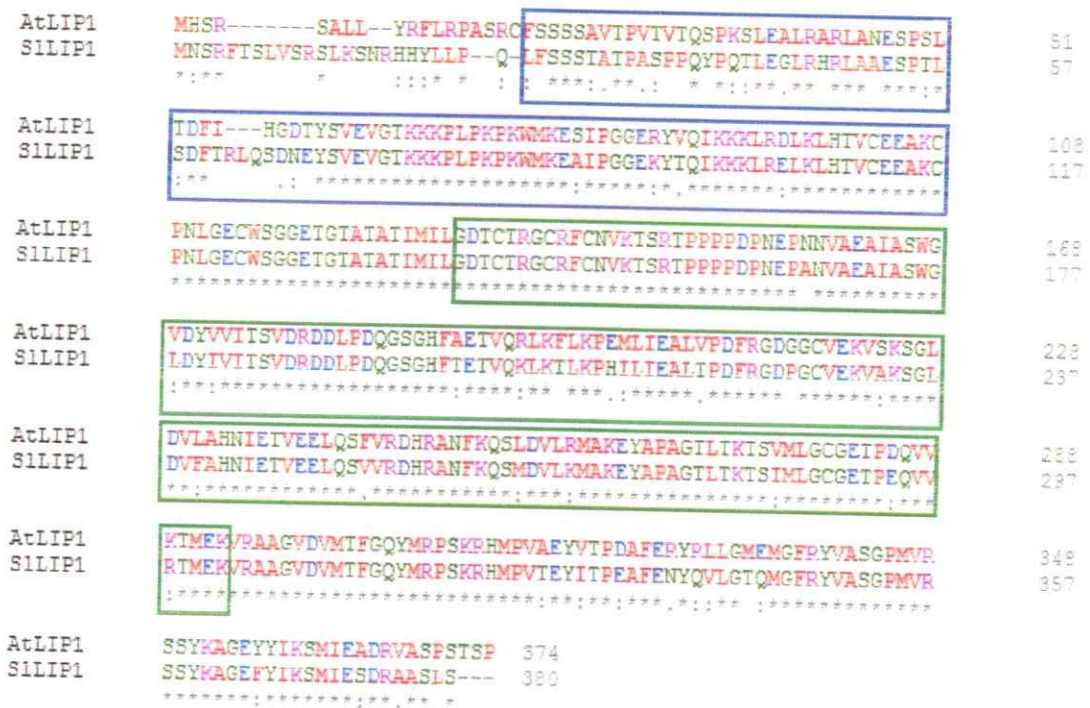


Figura 4: Alineamiento de LIP1. En la figura se muestra el alineamiento realizado con ClustalW de las proteínas LIP1 proveniente de *A. thaliana* (AtLIP1) y de *S. lycopersicum* (SILIP1). En las cajas azules se muestran los aminoácidos correspondientes al dominio LIAS-N mientras que en las cajas verdes se muestran los aminoácidos correspondientes al dominio Radical SAM, ambos característicos de proteínas lipoil sintasa, un asterisco (*) indica posiciones que tienen residuos idénticos totalmente conservados, dos puntos (:) indica grupos con propiedades fuertemente similares, y un punto (.) indica grupos con propiedades de menor similitud.

La proteína SILIP1, según los datos disponibles en la base de datos NCBI, posee 380 aminoácidos, y tiene un tamaño predicho de 42 kDa. Posee un sitio de unión FeS/SAM, el cual es característico de lipoil sintasa (Cicchillo *et al.*, 2004) y su localización subcelular predicha es mitocondrial. La secuencia del gen *Sllip1* (Solyc07g054540.2) se encuentra en el cromosoma 7 del genoma nuclear, y fue ensamblado a partir de cultivar Heinz 1706. Respecto a su expresión, datos de micro

arreglo muestran que *Sllip1* se expresa de forma ubicua en la planta (Winter *et al.*, 2007).

Se determinó que los primeros 30 aminoácidos corresponden a un péptido señal que se predice dirige la proteína a mitocondria (TargetP 1.1; SignalP 4.1). A partir de cDNA obtenido desde una extracción de RNA de planta completa de Micro-Tom se diseñaron partidores basándose en la información disponible en la base de datos de NCBI y se amplificó y clonó el marco de lectura completo del gen denominado *Sllip1*, en el vector de entrada pCR8 (pCR8-*Sllip1*) el cual fue secuenciado, obteniéndose un 100% de identidad respecto a Solyc07g054540.2. Además, se clonaron las secuencias sin el codón de termino (pCR8-*Sllip1ns*) y la secuencia sin el péptido señal (pCR8- Δ 30*Sllip1*).

La proteína SILIP1p, la cual posee mayor identidad con la proteína cloroplastidial de *A. thaliana* fue estudiada por Simón Miranda, en el contexto de su tesis de Magister en Ciencias Biológicas (Miranda, 2017).

3.1.2 Localización sub celular de SILIP1

Utilizando el vector pCR8-*Sllip1ns* se generó, mediante recombinación, el vector pEarlyGate-101-*Sllip1* (pEG-*Sllip1*) con el cual se expresó de manera transitoria la proteína de fusión SILIP1-YFP en hojas de tabaco mediante la agro-infiltración y se comparó con el patrón de fluorescencia emitido por la sonda comercial MitoTracker la cual se localiza en mitocondrias. Las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal (Figura 5A) muestran un patrón punteado y discreto muy similar al de la señal generada

por MitoTracker (**Figura 5B**). Una superposición entre ambos campos se muestra en la **Figura 5C**.

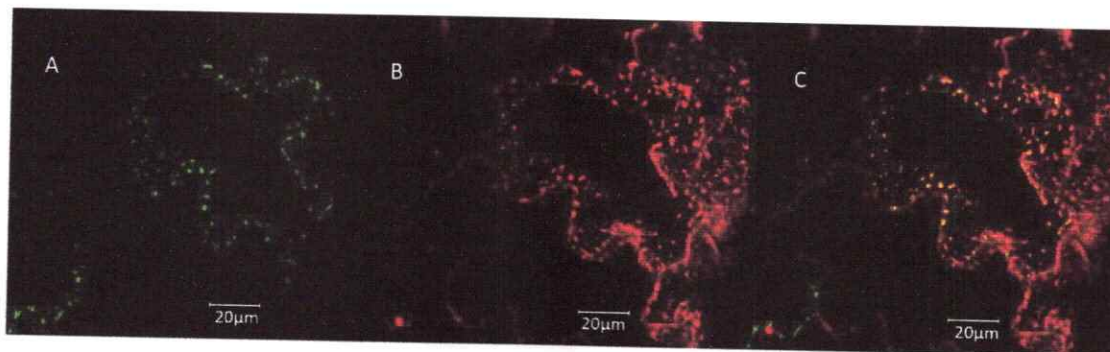


Figura 5: Localización sub celular de SILIP1-YFP. La figura muestra los resultados de microscopia confocal en hojas de *N. tabacum* infiltradas 4 días antes con *A. tumefaciens* portando pEG-Sllip1. En A) se muestra la fluorescencia generada por la excitación de YFP acoplado a SILIP1. En B) se muestra la auto fluorescencia de la sonda MitoTracker. En C) se muestra una sobre posición entre A y B. La barra blanca corresponde a 20 µm.

Los resultados de microscopia muestran que la señal emitida por la proteína SILIP1 acoplada a YFP co-localiza con la sonda mitocondrial. Estos resultados junto con los obtenidos mediante predicción *in silico* muestran que la localización de SILIP1 es mitocondrial.

3.1.3 Caracterización funcional de SILIP1

Para determinar si SILIP1 efectivamente es una lipoil sintasa, se utilizó la cepa KER176 de *E. coli* la cual posee una mutación en el gen que codifica la enzima lipoil sintasa (*lipA*; Vanden Boom *et al.*, 1991). Al no poseer este gen, la bacteria es incapaz de sintetizar ácido lipoico. Esta molécula es esencial para el correcto funcionamiento de la sub unidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa y la sub unidad E2 del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (entre otras), las cuales participan en el ciclo de Krebs. Debido a esto, la única forma de que esta cepa sea capaz de crecer es adicionando ácido

lipoico (debido a que la enzima LPLA, lipoato ligasa es capaz de unir ácido lipoico libre a las sub unidades E2 antes mencionadas) o adicionando acetato de sodio y succinato de sodio, con lo cual se logra restablecer el ciclo de Krebs.

Con el objetivo de corroborar si la función biológica de SILIP1 es de una lipoil sintasa se procedió a realizar la complementación heteróloga en la cepa *lipA*. Para efectos de la complementación, se utilizó el vector pDEST-HIS-MBP el cual genera una proteína de fusión a histidina y *maltosa binding protein*. De esta manera, se obtuvieron los vectores pDEST-Silip1 y pDEST-Slas (control negativo). Además, a modo de control positivo se utilizó el vector pDEST-Atlip1 (Miranda, 2017).

En la Figura 6, se muestran los resultados de un western blot anti HIS, realizado a un extracto de proteínas totales de la cepa *lipA* expresando las diferentes proteínas utilizadas.

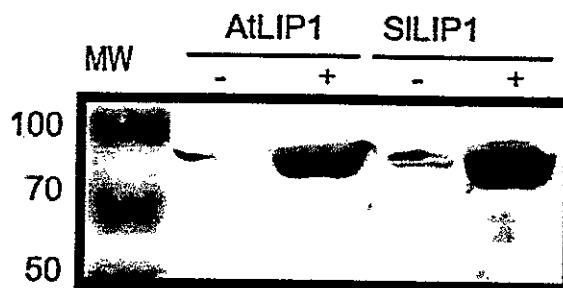


Figura 6: Western Blot anti HIS a *E. coli lipA* transformadas con LIP1. En la figura se muestra un western blot anti-HIS a extractos de proteínas totales de cepas *lipA* crecidas en un medio suplementado con acetato, succinato y con (+) o sin (-) IPTG. A la izquierda se muestra estándar de peso molecular (MW, en kDa). Modificado de Miranda (2017).

El tamaño esperado para las lipoil sintasas es cercano a 42 kDa, mientras que el tag MBP-HIS adiciona 42 kDa, dando una proteína de fusión con un tamaño cercano a

los 80 kDa. Los resultados muestran una señal entre 70 y 100 kDa, lo cual corresponde al tamaño esperado, concluyendo así que los vectores son capaces de expresar las proteínas de fusión tanto en presencia de IPTG (+) como en ausencia de esta molécula (expresión basal).

Como una primera evidencia de la funcionalidad *in vivo* de SILIP1 para lipoilizar las proteínas blanco, se realizó un western blot utilizando el anticuerpo α -lipoic acid, el cual es capaz de reconocer tanto la molécula en estado libre como proteínas unidas a esta (en este caso E2 del complejo PDH; Kang *et al.*, 2007). Para este experimento las cepas fueron crecidas en presencia de acetato y succinato, por lo que la lipoilacion de E2-PDH será solo posible si existe actividad lipoil sintasa en la bacteria. Los resultados se muestran en la Figura 7.

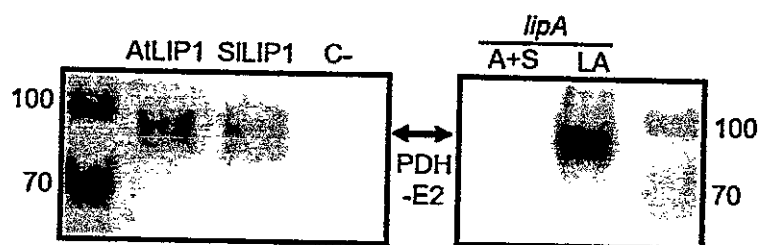


Figura 7: Western Blot anti AL a *E. coli lipA* transformadas con LIP1. En la figura, a la izquierda, se muestra un western blot anti-AL a extractos de proteínas totales de cepas *lipA* crecidas en un medio suplementado con acetato y succinato. A la izquierda se muestra estándar de peso molecular (kDa)., C- corresponde a *lipA* transformada con el gen en anti sentido (pDEST-Slas; control negativo). A la derecha se muestra la cepa KER176 (*lipA*) crecida en medio MME+GAS (medio mínimo con glucosa, acetato y succinato) o crecida en medio MME+G+AL (medio mínimo con glucosa y ácido lipoico).

Como se puede observar, se detecta una señal entre los 70 y 100 kDa; el tamaño esperado para E2-PDH de *E. coli* es de 76 kDa (Angelides *et al.*, 1979). Los resultados muestran que existe lipoilacion de E2-PDH al expresar tanto SILIP1 como el control

positivo (AtLIP1) lo cual indica que SILIP1 efectivamente posee actividad lipoil sintasa. Finalmente, para corroborar estos resultados, y como una segunda aproximación se creció la cepa lipA expresando las diferentes proteínas en estudio en medios con (Figura 8A) o sin suplementar con AL (Figura 8B), midiendo su crecimiento en el tiempo.

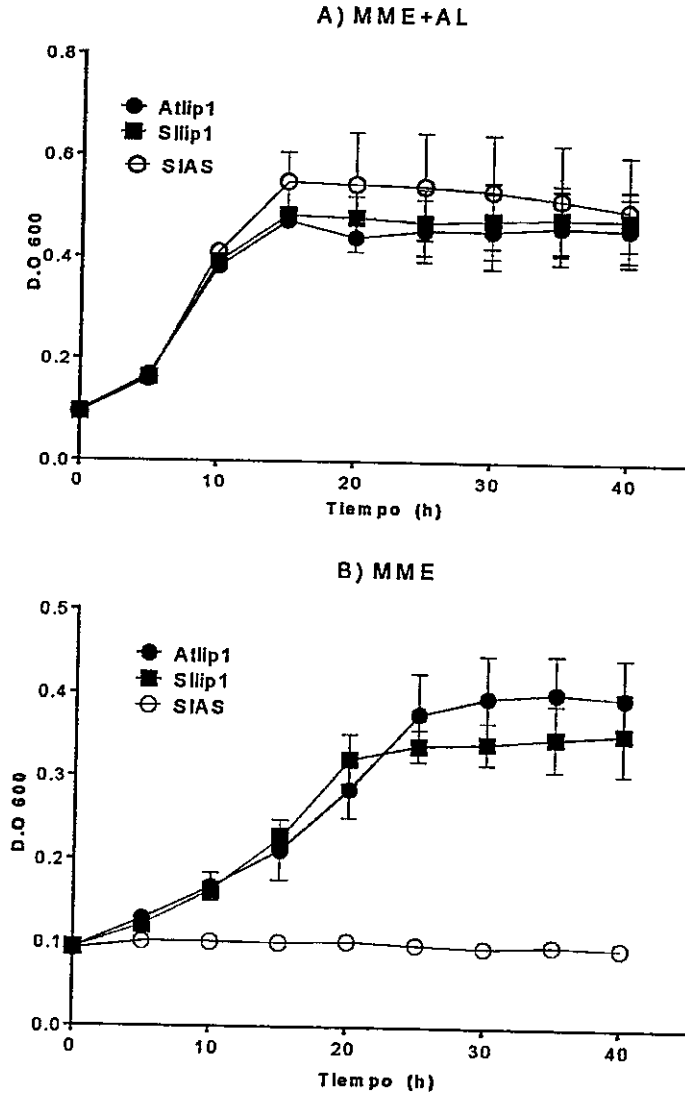


Figura 8: Cinética de crecimiento de *E. coli lipA* transformadas con LIP1 en medio con o sin AL. En A) se muestra una cinética de crecimiento de la cepa *lipA* expresando Atlip1, Sllip1 o Sllip1 en antisentido (SIAS) en medio MME suplementado con AL. En B) se muestran el crecimiento de las mismas cepas en un medio MME sin adicionar ácido lipoico. Cada punto corresponde al promedio de 6 réplicas y las barras corresponden a la desviación estándar.

Como se puede observar, SILIP1 es capaz de revertir la deficiencia en la actividad lipoil sintasa de la cepa *lipA*, no así el control negativo que solo es capaz de crecer en presencia de AL.

Tomando en cuenta todos los resultados mostrados durante el desarrollo de este objetivo específico, se puede afirmar que SILIP1 es una proteína con actividad lipoil sintasa y de localización mitocondrial.

3.2 Generación de líneas de *A. thaliana* que sobre expresen el gen endógeno *Atlip1*, o que expresen el gen *Sllip1* proveniente de tomate

3.2.1 Transformación estable mediante inmersión floral

Con el fin de obtener plantas con mayor tolerancia a estrés abiótico mediante un aumento en lipoilación, se generaron los vectores binarios pGWB8-AtLIP1 y pGWB8-SILIP1 mediante recombinación con los vectores pCR8-Atlip1ns y pCR8-Sllip1ns, respectivamente. Los vectores pGWB8 están diseñados para transferir a la planta el gen de interés comandado por un promotor fuerte y constitutivo (35S) además de generar una proteína de fusión a histidina carboxilo terminal (6XHIS). Una vez que las plantas estuvieron en condiciones para ser transformadas (T0) se procedió a realizar la técnica de inmersión floral con los vectores generados para los genes *Atlip1* y *Sllip1*. En total se realizaron 3 eventos de transformación independientes para cada vector, cada uno utilizando 6 plantas para cada construcción.

3.2.2 Selección de plantas transformantes por resistencia a antibiótico

Una vez que las plantas (T0) que fueron sometidas a inmersión floral generaron semillas (T1), éstas fueron sembradas en un medio con higromicina para seleccionar aquellas que fueron transformantes. Luego de 2 semanas en el medio con selección, las plantas que mostraron mayor elongación radicular fueron pasadas a tierra. La selección por antibióticos se realizó varias veces, durante varios meses; sin embargo, solamente se

obtuvo 3 plantas resistentes al antibiótico para la construcción pGWB8-AfLIP1 y 6 plantas para la construcción pGWB8-SILIP1. En ambos casos el fenotipo fue apenas distinguible de las plantas que son sensibles a antibiótico, es decir, hubo poca elongación radicular y no se desarrollaron hojas verdaderas. Las 9 plantas seleccionadas fueron pasadas a tierra.

3.2.3 Selección de plantas transformantes por PCR:

Luego de 3 meses de crecimiento, se realizó una extracción de gDNA a partir de una hoja caulinar de las plantas T1 para analizar molecularmente las líneas generadas. Transcurrido este tiempo se observó que algunas líneas transformadas con el gen *Sllip1* generaron fenotipos enanos (Sllip1.2 y 1.6) respecto al resto de las transformantes. En la **Figura 9** se muestra el fenotipo representativo de las plantas obtenidas.



Figura 9: Fenotipo representativo de plantas de *A. thaliana* transformadas con *Atlip1* o *Sllip1*. En la figura se muestran los fenotipos obtenidos de plantas de *A. thaliana* resistentes a higromicina transformadas con el vector pGWB8-*Atlip1* (*Atlip1*) o con el vector pGWB8-*Sllip1* (*Sllip1.1*, *Sllip1.2*, *Sllip1.3*, *Sllip1.6*). Todas las plantas tienen 12 semanas de vida a excepción de *Sllip1.6* que tiene 8.

Para corroborar molecularmente la presencia de los transgenes, se realizaron ensayos de PCR utilizando el gDNA de las plantas como molde. Para verificar la integridad del gDNA se realizó un PCR al gen *gapa* (gen que codifica la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa; Figura 10 izquierda) y, para corroborar que las plantas integraron los genes de interés en su genoma se realizó un PCR al gen *hptII* (gen de resistencia a higromicina; Figura 10 derecha).

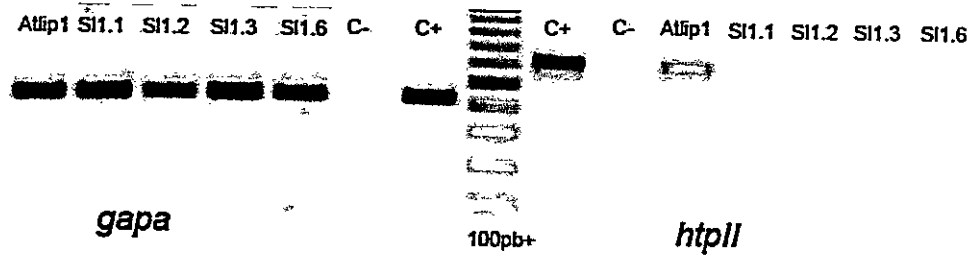


Figura 10: PCR representativo a gDNA de *A. thaliana* transformadas con *Atlip1* o *Sllip1*. En la figura se muestran resultados de un PCR dirigido a amplificar al gen *gapa* (tamaño esperado ~400 pb) o *hptII* (tamaño esperado ~600 pb) utilizando gDNA de plantas de *A. thaliana* resistentes a higromicina transformadas con el vector pGWB8-*Atlip1* (*Atlip1*) o con el vector pGWB8-*Sllip1* (*Sllip1* abreviado como S11; líneas S11.1, S11.2, S11.3, S11.6) como molde. Todas las plantas tienen 12 semanas de vida a excepción de S11.6 que tiene 8. Como control positivo (C+) se utilizó gDNA de integridad conocida como molde, mientras que el control negativo (C-) corresponde a una reacción que se utilizó H₂O como molde.

Los resultados fenotípicos sugieren que la sobre expresión de *Sllip1* genera un fenotipo enano en 2 de las 4 plantas (*Sllip1.2* y *Sllip1.6*), sin embargo, los análisis moleculares al gen *hptII* (tamaño esperado 600 pb) muestran que solamente la línea *Sllip1.6* posee el gen de resistencia al antibiótico y que la línea *Sllip1.2* presenta una amplificación inespecífica, mientras que las líneas de tamaño normal (*Sllip1.1* y *Sllip1.3*) no integraron dicho gen a su genoma por lo tanto no son transgénicas. Con respecto a *Atlip1* no hubo cambios fenotípicos detectables. Como una segunda corroboración molecular, se realizó un PCR adicional, amplificando esta vez los transgenes en estudio, es decir *Atllip1* y *Sllip1* (Figura 11).

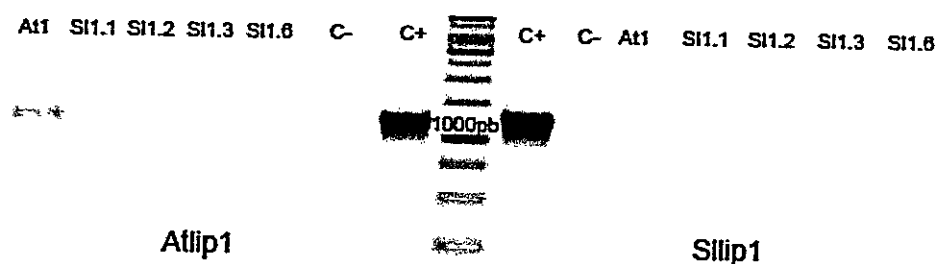


Figura 11: PCR representativo a gDNA de *A. thaliana* transformadas con *Atlip1* o *Sllip1*, amplificando los genes *Atlip1* y *Sllip1*. En la figura se muestran los resultados de un PCR dirigido al gen *Atlip1-6XHIS* (*Atlip1* en la figura) o gen *Sllip1* (*Sllip1* en la figura) utilizando gDNA de plantas de *A. thaliana* resistentes a higromicina transformadas con el vector pGWB8-*Atlip1* (At1) o con el vector pGWB8-*Sllip1* (S11.1, S11.2, S11.3, S11.6) como molde. Como control positivo (C+) se utilizó pDNA portador de los genes y como negativo se utilizó H₂O como molde.

Los resultados moleculares muestran que la planta *Atlip1* y una planta *Sllip1* (planta *Sllip1.6*) presentan el fragmento esperado para el gen de resistencia a higromicina y a los genes *Atlip1* y *Sllip1* respectivamente, mientras que la planta *Sllip1.2* muestra una amplificación inespecífica para el gen *hptII* y no hay amplificación para el gen *Sllip1* por lo cual esta planta, a pesar de presentar un fenotipo enano, no sería transgénica para el gen *Sllip1*. Lamentablemente la planta *Sllip1.6* se marchitó antes de generar órganos florales, por lo que no se pudo recolectar la generación T2. Ante este panorama se siguió seleccionando por antibiótico varias veces, lográndose obtener finalmente 2 plantas que integraron el gen *Atlip1* (*Atlip1.1*, y *Atlip1.2*) y 2 plantas para *Sllip1* (*Sllip1.7* y *Sllip1.8*).

A modo de resumen, en total se sembraron más de 25.000 semillas T1 de plantas transformadas con cada construcción, provenientes de 18 eventos de inmersión floral. De éstas se obtuvieron solo 3 plantas para *Atlip1* y 6 para *Sllip1* que presentan resistencia al antibiótico. De las plantas *Atlip1*, una se marchitó tempranamente,

mientras que las otras 2 plantas analizadas molecularmente son transgénicas para *Atlip1* y se logró recolectar la generación T2 (*Atlip1.1* y *Atlip1.2*). Para el caso de *Sllip1* se obtuvo que, mediante análisis moleculares, 3 plantas resultaron ser transgénicas. Sin embargo, una se marchitó antes de desarrollar órganos florales (*Sllip1.6*), aunque sí se pudo recolectar la generación T2 otras 2 plantas (*Sllip1.7* y *Sllip1.8*). En la **Tabla 3** se muestra un resumen con las plantas obtenidas.

Tabla 3: Resumen de *A. thaliana* transformadas con *Atlip1* o *Sllip1*. En la tabla se muestran los diferentes hitos realizados para la obtención de plantas transgénicas.

Construcción	Inmersión Floral (T0)	Semillas T1 sembradas	Plantas seleccionadas por antibiótico	Plantas analizadas por PCR	Líneas Transgénicas obtenidas	Líneas transgénicas esperadas
<i>Atlip1</i>	18	~25.000	3	3	2	~125-250
<i>Sllip1</i>	18	~25.000	6	6	2	~125-250

Los resultados muestran que la tasa de transformación para el gen *Atlip1* fue de 0,008% (2 plantas) mientras que para *Sllip1* fue de 0,012 (3 plantas, incluyendo la que se marchitó antes de generar órganos florales) lo cual es mucho menor a lo esperado (entre 0,5 y 1%, Clough y Bent, 1998).

Las semillas obtenidas (T2) fueron plantadas en medio de selección con higromicina. Luego de 2 semanas se seleccionaron 10 plantas resistentes al antibiótico para cada línea (*Atlip1.10-19*, *Atlip1.20-29*, *Sllip1.70-79*, *Sllip1.80-89*) y fueron pasadas a tierra. Luego de 4 meses se recolectaron las semillas (T3).

Se observó al momento de la recolección que las plantas generaron entre cincuenta y trescientas semillas, lo cual es un número reducido si se considera que una

planta en promedio genera alrededor de cinco mil semillas (Jako *et al.*, 2001). Considerando esto, se utilizaron aquellas plantas que generaron un mayor número de semillas y se sembraron en una placa con higromicina. Luego de 7 días se analizó la elongación de la raíz principal. El crecimiento del ~100% de la población indica que las plantas son homocigotas mientras que un ~75% indica que son hemocigotas tanto para el gen de resistencia al antibiótico como para *lip1*. Además de las semillas de líneas transgénicas se sembró a modo de control semillas *wild type* (WT) en presencia (WT c/hyg) y ausencia (WT s/hyg) del antibiótico. En la **Figura 12** se muestran fenotipos representativos de plantas sensibles o resistentes al antibiótico mientras que los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Frecuencia de resistencia al antibiótico de *A. thaliana* (T3) transformadas con *Atlip1* o *Sllip1*

Línea	Sembradas	Germinadas	Resistente*	% germinación	% Resistencia (total)	% resistencia (germinadas)
WT c/hyg	36	36	0	100,0%	0,0%	0,0%
WT s/hyg	40	40	39	100,0%	97,5%	97,5%
Atlip1.25	40	32	31	80,0%	77,5%	96,9%
Atlip1.28	80	54	51	67,5%	63,8%	94,4%
Atlip1.27	100	100	67	100,0%	67,0%	67,0%
Atlip1.18	70	70	5	100,0%	7,1%	7,1%
Atlip1.17	98	98	7	100,0%	7,1%	7,1%
Atlip1.15	100	100	55	100,0%	55,0%	55,0%
Slip1.87	85	85	22	100,0%	25,9%	25,9%
Sllip1.86	77	68	64	88,3%	83,1%	94,1%
Slip1.88	56	46	27	82,1%	48,2%	58,7%
Sllip1.89	75	67	8	89,3%	10,7%	11,9%
Sllip1.77	77	69	0	89,6%	0,0%	0,0%
Sllip1.76	100	80	0	80,0%	0,0%	0,0%
Sllip1.75	28	25	0	89,3%	0,0%	0,0%
Sllip1.79	100	86	0	86,0%	0,0%	0,0%
Sllip1.78	60	57	0	95,0%	0,0%	0,0%

* Se considera resistente a aquellas plantas cuyo fenotipo no se asemeja a plantas *wild type* en presencia de higromicina.

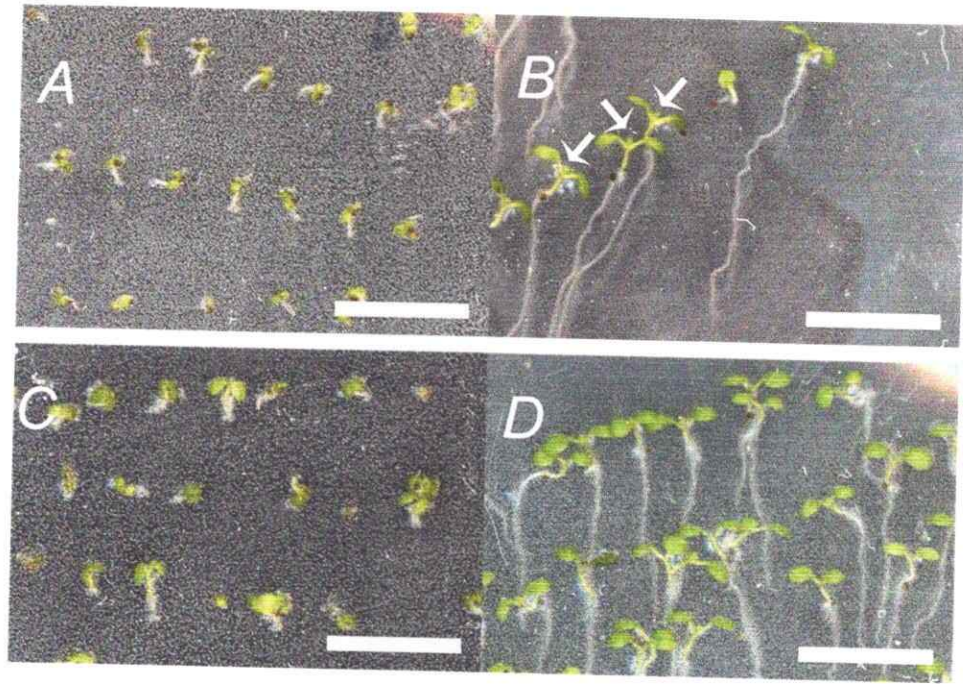


Figura 12: Fenotipo representativo de *A. thaliana* (T3) transformadas con *Atlip1* o *Sllip1* en higromicina. En A) se observa el fenotipo de plantas *wild type* en presencia de higromicina (fenotipo sensible), en B) plantas *wild type* sin higromicina en el medio las cuales muestran primordios de hojas verdaderas indicadas en flechas blancas, en C) una línea transgénica con fenotipo sensible a higromicina (Sllip1.76) y en D) una línea transgénica con fenotipo resistente (Atlip1.27). La barra es equivalente a 1 cm.

Como se puede observar en la tabla, si se compara el porcentaje de resistencia respecto al total de semillas sembradas, no hay ninguna línea que presente un 100%, esto indica que no habría plantas homocigotas para el gen. Junto con esto se observan frecuencias que no coinciden con lo esperado como es el caso de todas las plantas analizadas para Sllip1.7 donde ninguna presenta resistencia cuando lo esperado es al menos un 75%.

Pese a que las frecuencias obtenidas no eran las esperadas se decidió traspasar a tierra 6 plantas provenientes de Atlip1.25, Atlip1.28 y Sllip1.86 que mostraban un fenotipo resistente y cuyo porcentaje de resistencia respecto a las semillas germinadas

fue cercano a 100%. Además, se seleccionaron 6 plantas que no mostraron elongación radicular para las líneas Sllip1.76 y Sllip1.78.

A la fecha las plantas se encuentran generando silicuas, incluso aquellas que mostraron un fenotipo sensible al antibiótico (Sllip1.76, Sllip1.78)

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis sugieren que una sobre-expresión constitutiva del gen que codifica la enzima LIP1 no es beneficiosa para la planta, lo cual se refleja en la baja tasa de transformación obtenida, retraso en la elongación de la raíz principal, retraso en la generación de hojas verdaderas, en la poca producción de semillas T3 y el retardo de la elongación radicular en algunas de las plantas. Sin embargo, a la fecha no se han estudiado los niveles de expresión del transgen.

Resulta interesante saber qué es lo que está ocurriendo a nivel molecular en dichas plantas respecto a los niveles de expresión de los genes relacionados al metabolismo del AL y si el efecto observado es efectivamente producto de la sobre expresión del *lip1*. Sin embargo, considerando que el objetivo de esta tesis es generar una ventaja adaptativa ante estrés abiótico y las dificultades encontradas para generar plantas que sobre expresen de forma constitutiva el gen que codifica la enzima lipoil sintasa, el resto de esta tesis se centrará en la segunda aproximación, es decir la aplicación exógena de AL.

3.3 Análisis fenotípico y molecular de plantas de *A. thaliana* y tomate (*S. lycopersicum*) germinadas a diferentes concentraciones de AL

3.3.1 Análisis fenotípico en *A. thaliana*

3.3.1.1 Determinación de concentración óptima de trabajo en *A. thaliana*

Lo primero que se realizó fue determinar el efecto de diferentes concentraciones de AL aplicado desde la germinación de las plantas luego de 10 días. Como se puede apreciar en la **Figura 13** existe una dosis respuesta en las plantas, cuyo efecto más evidente es un acortamiento en el largo de la raíz principal lo cual es un indicador de daño fisiológico (Potters *et al.*, 2007).

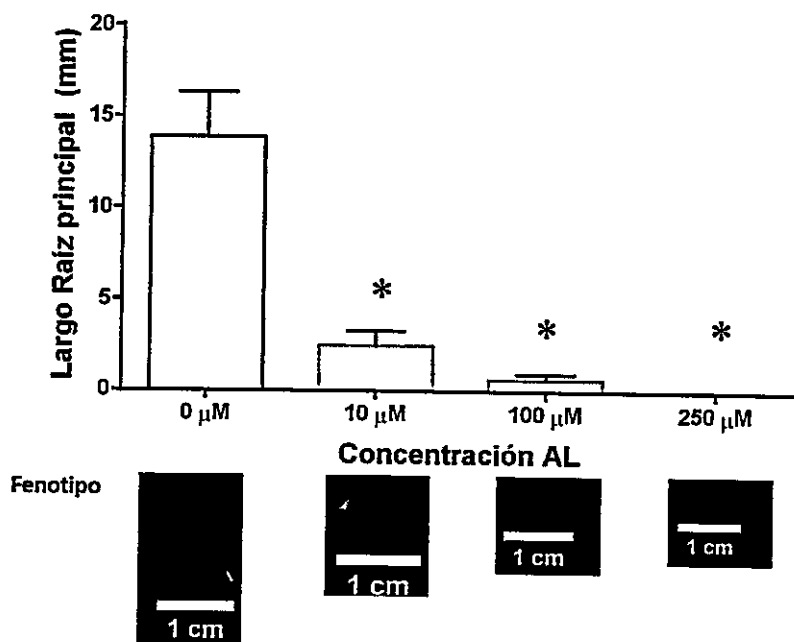


Figura 13: Largo de raíz principal y fenotipo de *A. thaliana* germinadas en concentraciones sobre 10 μ M de AL. En la figura se muestra el largo de la raíz principal de 14 plantas de 10 días germinadas en distintas concentraciones de AL. Debajo de cada barra se muestra el fenotipo correspondiente. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía con post test de Dunnet considerando un $p < 0,05$.

Considerando el resultado anterior, se disminuyó la concentración hasta que el largo de la raíz principal no se viese afectado. En la **Figura 14** se muestra el largo de la raíz principal de plantas de *A. thaliana* crecidas durante 10 días en presencia de AL a distintas concentraciones.

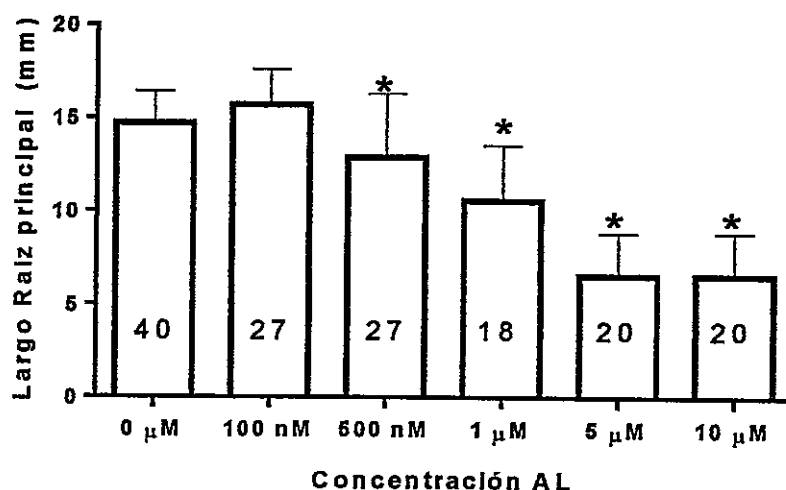


Figura 14: Largo raíz principal de *A. thaliana* germinadas en concentraciones entre 100 nM y 10 μ M de AL. En la figura se muestra el largo de la raíz principal de plantas de *A. thaliana* germinadas a diferentes concentraciones de AL. En cada barra se indica el n de cada grupo. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía con post test de Dunnet considerando un $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos muestran que se mantiene una dosis respuesta a la concentración de AL, la cual es inversamente proporcional al largo de la raíz principal y que el grupo crecido a 100 nM no presenta diferencias estadísticamente significativas en el largo de la raíz principal respecto al control (**Figura 14**).

Luego de determinar que una concentración de 100 nM no tiene efectos en el largo de la raíz principal, se procedió a analizar el efecto sobre el número de raíces

laterales. Para esto, las plantas se dejaron crecer durante 14 días en el incubador y se cuantificó el largo de la raíz principal y el número de raíces laterales, a partir de lo cual se calculó el IRL (razón entre número de raíces laterales y el largo de la raíz principal). Los resultados obtenidos (Figura 15) muestran que a los 14 días las plantas crecidas en 100 nM de AL poseen un mayor IRL respecto al control.

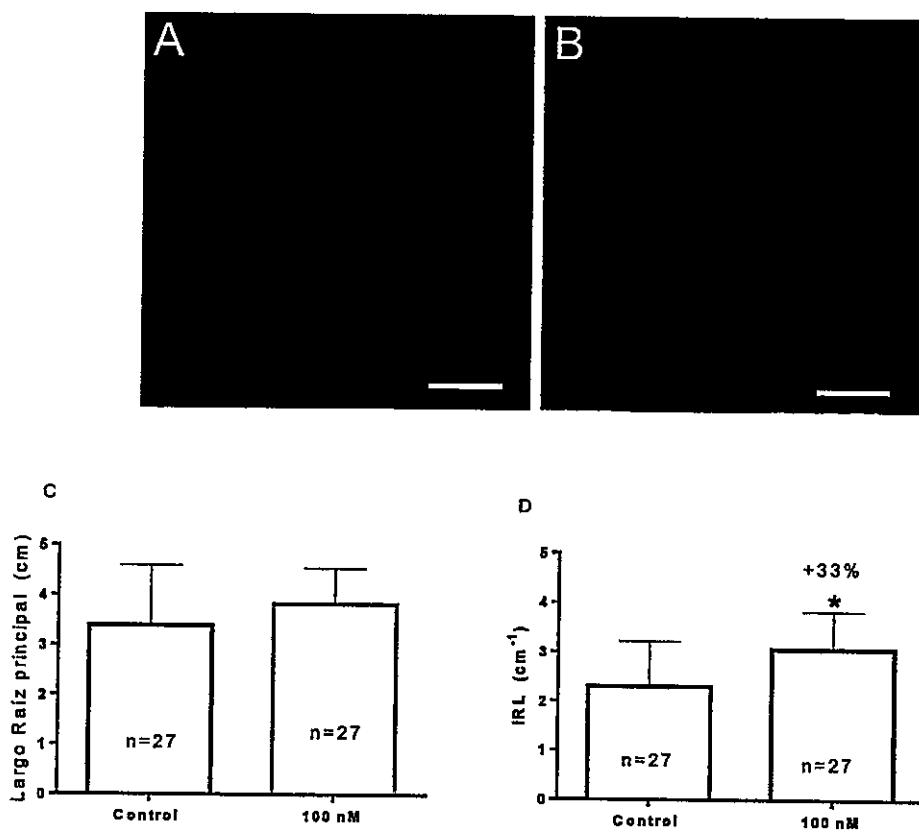


Figura 15: Cuantificación del largo de la raíz principal e índice de raíces laterales en *A. thaliana* de 14 días crecidas en AL. En A) se muestra el fenotipo de plantas crecidas en condición control sin suplementación de AL. En B) se muestra el fenotipo de plantas crecidas en MS con AL 100 nM. En C) se muestra el largo de la raíz principal de plantas crecidas en 100 nM de AL y de plantas en condición control sin suplementación de AL. En D) se muestra el IRL (razón entre el número de raíces laterales y el largo de la raíz principal) de las mismas plantas que en C. Se realizó un análisis estadístico t-test no pareado de dos colas, $p < 0,05$. La barra en A y B indica 1 cm.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta sección, muestran que al germinar plantas de *A. thaliana* en presencia de AL existe una dosis respuesta inversamente proporcional al largo de la raíz principal. Se determinó que una concentración de 100 nM no genera una disminución en el largo de la raíz principal y que además produce un aumento de un 33% del índice de raíces laterales. Este aumento podría significar una ventaja en cuanto a la captación de agua y nutrientes desde el medio debido a que implica una mayor superficie de absorción.

3.3.1.2 Análisis molecular en *A. thaliana*

Luego de 10 días de crecimiento, se realizó una extracción de RNA a plantas crecidas en presencia de 100 nM de AL. Se midieron los niveles de expresión de los genes *Atlip1*, el cual codifica la enzima lipoil sintasa, cuya función biológica descrita es adicionar los átomos de azufre al octanoato unido previamente a las enzimas blanco; *Atlip2*, el cual codifica la enzima octanoil transferasa, encargada de unir un octanoil-ACP a las proteínas blanco; *AtlplA*, gen que codifica la enzima lipoato ligasa, la cual es capaz de unir AL libre a enzimas blanco y *AtmtE21*, el cual codifica la isoforma 1 de la sub unidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa (Dehidrolipoil transacetilasa EC 2.3.1.12.), la cual es la que más aporta a la actividad del complejo entre las tres descritas hasta la fecha (Figura 16). Todas las isoformas de la sub unidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa mitocondrial están codificadas en el genoma nuclear. (Yu *et al.*, 2012).

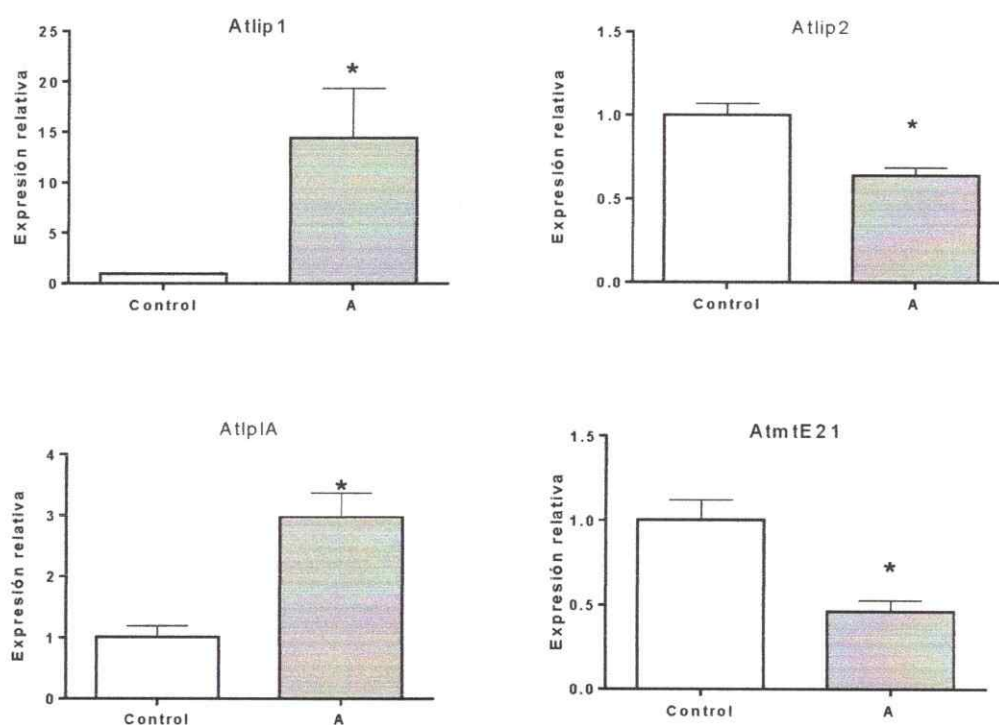


Figura 16: Niveles de expresión de genes relacionados al metabolismo de AL en *A. thaliana* de 10 días germinadas en presencia de 100 nM de AL. Se determinó los niveles de transcrito a partir de plantas completas de 10 días. Para todos los casos se utilizó como normalizador el gen housekeeping At4g26410. El control corresponde a un grupo de plantas que se germinaron en medio MS sin suplementar con AL. El resultado es el promedio de 3 reacciones de qRT-PCR (réplicas técnicas), y las barras corresponden a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de t-student de dos vías con un $p < 0,05$.

Para el desarrollo del experimento se calcularon las eficiencias de cada partidor utilizando el programa LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003), y se probaron 3 housekeeping diferentes, encontrando mediante el uso del algoritmo NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) que el gen At4g26410 es el mejor normalizador, cuyos niveles de transcrito se mantuvieron constantes entre los tratamientos control y con 100 nM AL.

Los resultados muestran que la exposición de plantas de *A. thaliana* a AL durante su germinación y crecimiento genera cambios a nivel transcripcional en los genes que codifican enzimas relacionadas con su biosíntesis, con una disminución de *Atlip2* y un aumento en *Atlip1* y *Atlpla*. Junto con esto, los resultados indican que se genera una disminución en los niveles transcrito de la isoforma 1 de la sub unidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa.

Estos resultados junto con los obtenidos en la sección 3.3.1.1 sugieren fuertemente que el ácido lipoico aplicado de manera exógena es capaz de ingresar a la planta y ser percibido por esta.

3.3.1.3 Cuantificación relativa de proteínas unidas a AL en *A. thaliana*

Con el objetivo de analizar si es que el tratamiento con AL afecta la incorporación de éste a las proteínas blanco, se realizó un *western blot* anti-AL. Además, se utilizó la proteína actina para calcular la cantidad relativa de la señal de proteínas unidas a AL. El grafico de la cuantificación y una membrana representativa se muestran en la **Figura 17**.

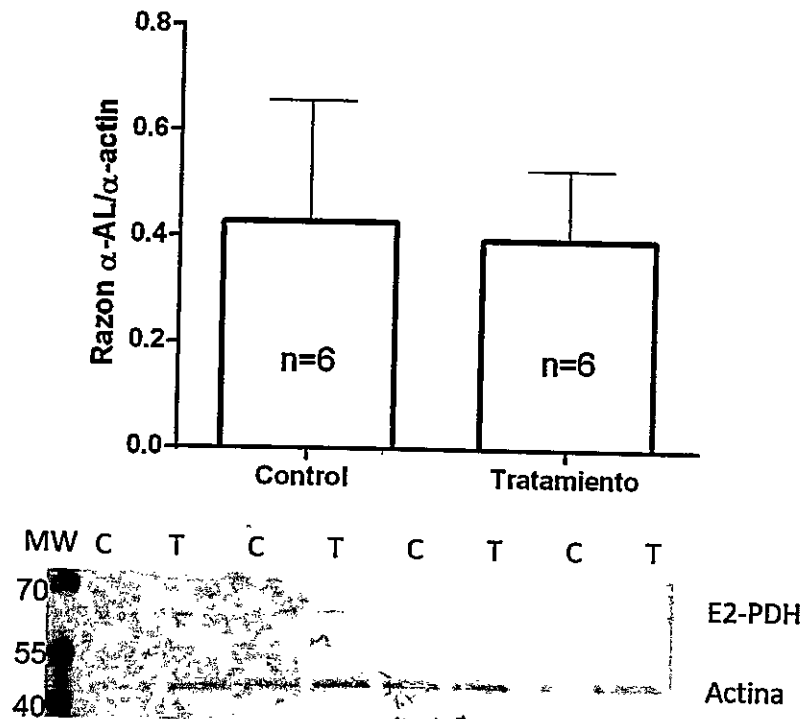


Figura 17: Cuantificación relativa de E2-PDH unida a AL en plantas de *A. thaliana* de 10 días. En la figura se muestra el grafico de la cuantificación relativa de la señal de E2-PDH unida a AL respecto a la señal de actina. En la parte inferior de la imagen se muestra una membrana representativa de 4 de las 6 repeticiones, en donde C (control) corresponde a proteínas provenientes de plantas que no fueron expuestas a AL, mientras que T (tratamiento) corresponde a proteínas de plantas de 10 días que fueron expuestas a AL 100 nM desde su germinación. Para todos los casos se cargaron 50 μ g de proteínas, MW son marcadores de peso molecular en kDa.

Los resultados muestran una señal entre los marcadores de 70 y 55 kDa que corresponde a E2-PDH (alrededor de 60 kDa; Mooney *et al.*, 1999), mientras que la señal entre 40 y 55 kDa correspondería a actina (alrededor de 41 kDa; Jimenez-Lopez *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos muestran que, en plantas de 10 días, no hay diferencia estadísticamente significativa respecto a la señal de proteínas unidas a AL entre el grupo

control y el tratado con AL, a pesar de la disminución en los niveles de transcrito del gen que codifica la sub unidad E2-PDH (*mtE21*).

3.3.2 Análisis fenotípico en tomate

3.3.2.1 Cultivo hidropónico de tomate en sustrato inerte

Para los estudios en tomate, se sembraron semillas de tomate en un medio inerte de vermiculita/perlita 1:1 y se hidrató con medio hidropónico suplementado con 0, 50 o 100 nM de AL. Los tomates se regaron semanalmente con medio hidropónico sin AL. Durante el desarrollo de la planta se midió el alto de ésta y el número de flores, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas. A los 4 meses se cuantificó el número, tamaño y peso de los frutos, resultados que se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Resumen de la producción de frutos en plantas de tomate germinadas en medio hidropónico en presencia de AL

Grupo	N° Plantas	N° frutos	Frutos por planta (\pm SD)	Peso por fruto (g \pm SD)	Calibre por fruto (mm \pm SD)	Producción por planta (g \pm SD)
Control	6	33	5,5 \pm 3,0	1,7 \pm 1,4	13,4 \pm 4,2	9,6 \pm 4,4
50 nM	6	36	6,0 \pm 2,1	2,1 \pm 1,7	14,7 \pm 4,0	12,5 \pm 3,8
100 nM	6	43	7,2 \pm 2,6	2,1 \pm 1,4	15,4 \pm 3,5	*15,3 \pm 3,4

Frutos por planta, peso por fruto y calibre por fruto es el promedio de las 6 plantas por tratamiento, se realizó análisis estadístico de ANOVA de una vía con post test de Dunnet; el asterisco (*) indica un $p < 0.05$.

Los resultados muestran que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de frutos por planta, al peso promedio de los frutos ni al calibre promedio de los frutos, sin embargo, se observa que en los tratamientos con AL se obtiene una producción total de frutos 59,9% mayor en el caso de las plantas tratadas con 100 nM de AL.

3.3.2.2 Cultivo de tomate en tierra

Hasta el momento la molécula solamente se había probado en tratamientos *in vitro* o en medio hidropónico con un sustrato inerte. El siguiente paso fue determinar los efectos de la aplicación de la molécula en plantas germinadas y crecidas en tierra.

Con este propósito, se estudió el efecto del AL en la producción de frutos aplicando la molécula desde el momento de la germinación (Tabla 6) o aplicando la molécula una semana post trasplante de los plantines (Tabla 7).

Tabla 6: Resumen de la producción de frutos en plantas de tomate germinadas en tierra en presencia de AL

Grupo	N° Plantas	N° frutos	Frutos por planta (\pm SD)	Peso por fruto ($g\pm$ SD)	Calibre por fruto ($mm\pm$ SD)	Producción por planta ($g\pm$ SD)
Control	9	49	5,4 \pm 3,6	2,5 \pm 1,8	14,9 \pm 4,5	13,8 \pm 5,2
50 nM	8	32	4,0 \pm 2,6	3,2 \pm 2,2	17,8 \pm 4,0	13,4 \pm 5,6
100 nM	9	45	5,0 \pm 1,4	2,7 \pm 1,6	17,6 \pm 2,5	13,4 \pm 3,0

Frutos por planta, peso por fruto y calibre por fruto es el promedio de las 6 plantas por tratamiento, se realizó análisis estadístico de ANOVA de una vía con post test de Dunnet considerando un $p<0,05$.

Tabla 7: Resumen de la producción de frutos en plantas de tomate crecidas en tierra con aplicación de AL luego del trasplante de plantines.

Grupo	N° Plantas	N° frutos	Frutos por planta (\pm SD)	Peso por fruto ($g\pm$ SD)	Calibre por fruto ($mm\pm$ SD)	Producción por planta ($g\pm$ SD)
Control	9	49	5,4 \pm 3,6	2,5 \pm 1,8	14,9 \pm 4,5	13,8 \pm 5,3
50 nM	9	64	7,1 \pm 3,2	2,4 \pm 2,1	14,9 \pm 5,3	17,4 \pm 7,1
100 nM	9	78	8,6 \pm 6,2	1,9 \pm 1,3	14,1 \pm 2,5	16,5 \pm 6,9

Frutos por planta, peso por fruto y calibre por fruto es el promedio de las 6 plantas por tratamiento, se realizó análisis estadístico de ANOVA de una vía con post test de Dunnet considerando un $p<0,05$.

Los resultados muestran que al aplicar la molécula desde el momento de la germinación (Tabla 6) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de frutos por planta, al peso promedio de los frutos, ni al calibre promedio de los frutos. Además, a diferencia de la aplicación en medio hidropónico, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción por planta.

3.4 Evaluación de la tolerancia a estrés salino, oxidativo, metales pesados y déficit hídrico en plantas de *A. thaliana* germinadas en presencia y ausencia de AL

Debido a que la molécula en estudio es un antioxidante (sección 1.5) se estudió si es que la germinación en presencia de ésta es capaz de otorgar una mayor tolerancia a estrés. Para esto se utilizó como un parámetro de daño por estrés la elongación de la raíz principal, ya que una disminución en el crecimiento de ésta sugiere un daño a nivel fisiológico (Potters *et al.*, 2007), generado en este caso por la exposición al estrés en estudio. A modo de referencia, en la Figura 18 se muestra el crecimiento relativo de la raíz principal entre los días 7 y 11, de plantas que fueron trasplantadas el día 7 a una placa con medio MS fresco.

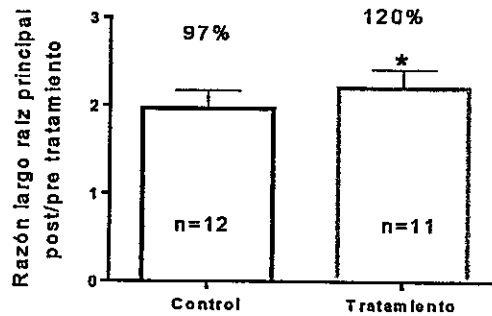


Figura 18: Crecimiento raíz principal de *A. thaliana* entre el día 7 y 11. En la figura se compara el crecimiento de la raíz principal de plantas de *A. thaliana* germinadas en 100 nM de AL (Tratamiento) respecto a plantas que no fueron expuestas a la molécula (Control). Ambos grupos fueron trasplantados el día 7 a placas con medio MS fresco. Las barras indican el promedio de la razón del largo de la raíz principal entre el día 11 y 7 \pm SD. El n de cada experimento se indica en la barra y sobre esta el porcentaje de crecimiento. Se realizó un t-test de dos vías con un $p < 0,05$.

Los resultados muestran que, en condiciones normales de crecimiento, es decir sin someter a la planta a algún tipo de estrés la raíz principal aumenta en un 97% su tamaño en el grupo control y en un 120% en el grupo mantenido en AL durante 7 días.

3.4.1 Ensayos de tolerancia a estrés salino en plantas de *A. thaliana*

Plantas de 7 días germinadas en una placa con AL fueron traspasadas a una placa con 150 mM de NaCl (Ji *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015) y se midió el largo de la raíz principal. Luego de 4 días se volvió a cuantificar el largo de la raíz principal. En la Figura 19 se muestra la tasa de crecimiento de la raíz luego de la exposición al estrés.

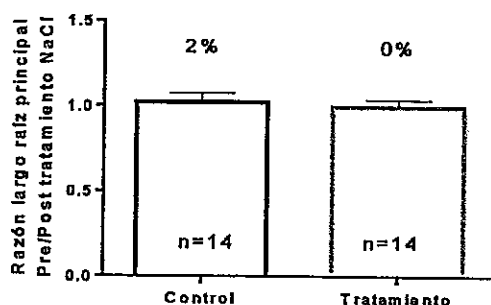


Figura 19: Efecto de salinidad en el crecimiento de la raíz principal de *A. thaliana*. En la figura se compara el crecimiento de la raíz principal de plantas de *A. thaliana* germinadas en 100 nM de AL (Tratamiento) respecto a plantas que no fueron expuestas a la molécula (Control). Ambos grupos fueron trasplantados el día 7 a placas con medio MS fresco suplementado con NaCl 150 mM. Las barras indican el promedio de la razón del largo de la raíz principal entre el día 11 y $7 \pm SD$. El n de cada experimento se indica en la barra y sobre ésta, el porcentaje de crecimiento. Se realizó un t-test de dos vías con un $p < 0,05$.

Los resultados no muestran diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con el control, por lo que, tratamientos con la molécula no otorgan una ventaja en ambientes con una concentración de 150 mM de NaCl.

3.4.2 Ensayos de tolerancia a estrés oxidativo en plantas de *A. thaliana*

Para este ensayo las plantas fueron sometidas a un tratamiento con paraquat y posteriormente fueron expuestas a luz de alta intensidad lo cual genera daño oxidativo, el cual se evidencia en la disminución de la clorofila en la hoja (Murgia *et al.*, 2004). Luego del tratamiento se midieron los niveles de clorofila (Figura 20) y de carotenoides totales (Figura 21).

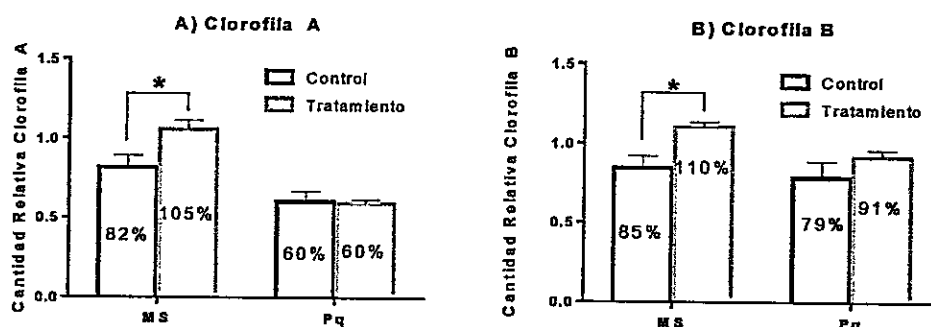


Figura 20: Efecto del tratamiento con paraquat sobre el contenido de clorofila en plantas de *A. thaliana*. En la figura se muestra el contenido relativo de clorofila A (grafico A) o B (grafico B) de plantas de *A. thaliana* que fueron tratadas con paraquat (Pq) o que no fueron expuestas a esta molécula (MS) luego de crecer 10 días en presencia de AL 100 nM (tratamiento) o no ser expuestas a AL (control). Las barras indican el contenido relativo de clorofila post tratamiento respecto al contenido antes del tratamiento \pm SD. El n de cada experimento es 3. Se realizó un ANOVA de 2 vías con un post test de Tukey con un $p < 0,05$.

Los resultados muestran que el tratamiento con AL no genera una diferencia en cuanto la disminución de clorofila respecto a la condición control. Sin embargo, se observa que, cuando la planta es sometida a luz intensa sin presencia de paraquat (condición MS), el grupo control ve disminuida la cantidad de clorofila, mientras que el grupo tratado con AL aumenta.

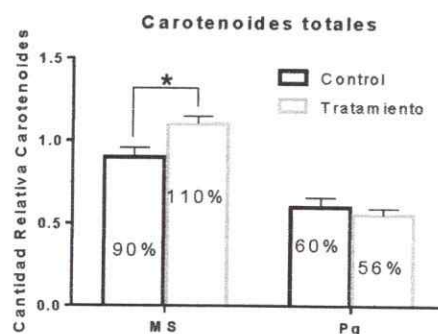


Figura 21: Efecto del tratamiento con paraquat sobre el contenido de carotenoides totales en plantas de *A. thaliana*. En la figura se muestra el contenido relativo de carotenoides totales de plantas de *A. thaliana* que fueron tratadas con paraquat (Pq) o que no fueron expuestas a esta molécula (MS) luego de crecer 10 días en presencia de AL 100 nM (tratamiento) o no ser expuestas a AL (control). Las barras indican el contenido relativo de clorofila post tratamiento respecto al contenido antes del tratamiento \pm SD. El n de cada grupo es 3. Se realizó un ANOVA de 2 vías con un post test de Tukey con un $p < 0,05$.

Los resultados muestran que el tratamiento con AL no genera una diferencia en cuanto la disminución de carotenoides totales respecto a la condición control. Sin embargo, se observa que, al igual como sucede con la clorofila, cuando la planta es sometida a luz intensa sin presencia de paraquat (condición MS), el grupo control ve disminuida la cantidad de carotenoides, mientras que en el grupo tratado con AL aumenta.

3.4.3 Ensayos de tolerancia a metales pesados en plantas de *A. thaliana*

Plantas de 7 días germinadas en una placa con AL fueron traspasadas a una placa con 150 μ M de CuSO_4 o CdSO_4 (Brunetti *et al.*, 2011; Drazkiewicz *et al.*, 2004) y se midió el largo de la raíz principal. Luego de 4 días se volvió a cuantificar el largo de la raíz principal. En la **Figura 22** se muestra la tasa de crecimiento de la raíz luego de la exposición al estrés.



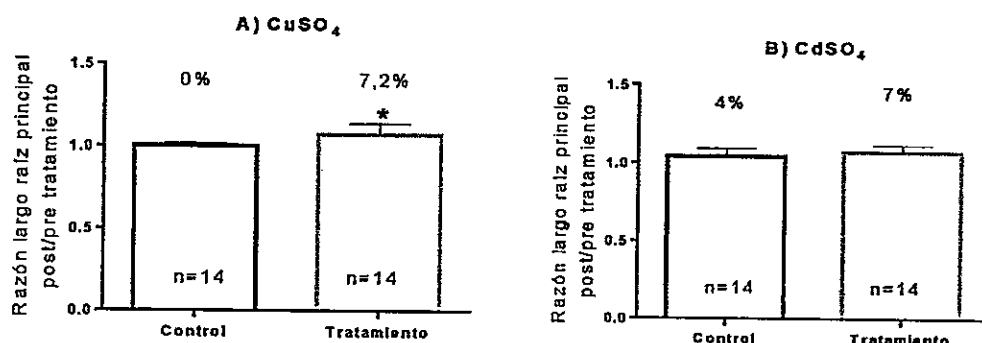


Figura 22: Efecto de metales pesados en el crecimiento de la raíz principal de *A. thaliana*. En la figura se compara el crecimiento de la raíz principal de plantas de *A. thaliana* germinadas en 100 nM de AL (Tratamiento) respecto a plantas que no fueron expuestas a la molécula (Control). Ambos grupos fueron trasplantados el día 7 a placas con medio MS fresco suplementado con CuSO₄ 150 µM (Grafico A) o con CdSO₄ 150 µM (grafico B). Las barras indican el promedio de la razón del largo de la raíz principal entre el día 11 y 7 ± SD. El n de cada experimento se indica en la barra y sobre esta el porcentaje de crecimiento. Se realizó un t-test de dos vías con un p<0,05.

Los resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo experimental al ser expuestos con CuSO₄; mientras que en el grupo control se detiene por completo la elongación de la raíz principal, en el grupo tratado con AL existe un crecimiento de un 7,2%. Respecto al tratamiento con CdSO₄ no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el experimental.

3.4.4 Ensayos de tolerancia a déficit hídrico en plantas de *A. thaliana*

Plantas de *A. thaliana* fueron germinadas *in vitro* en presencia de 100 nM de AL o en condiciones control sin ser expuestas a la molécula. Al día 7 fueron pasadas a tierra donde se ambientaron durante 2 semanas siendo regadas por inundación por última vez 16 días post germinación. El día 21 post germinación se dio por comenzado el estrés por

sequía el cual se extendió durante 14 días, para luego recuperar el riego y analizar el fenotipo luego de 10 días de recuperación.

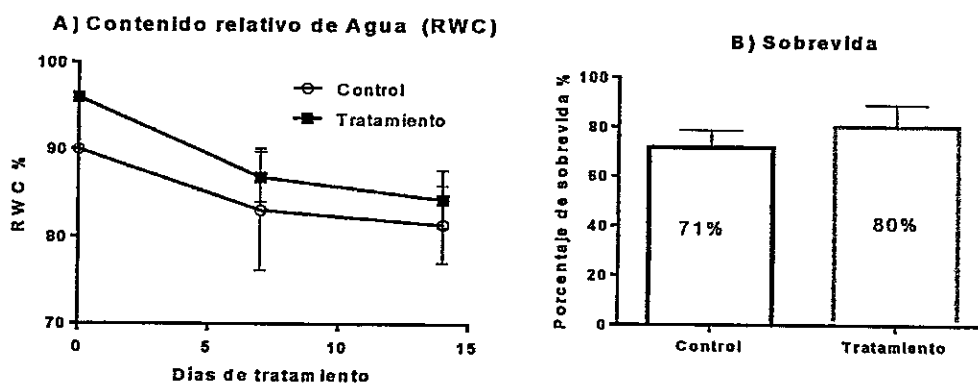


Figura 23: Contenido relativo de agua y tasa de sobrevida en plantas de *A. thaliana* sometidas a déficit hídrico durante 14 días. En A) se muestra el contenido relativo de agua de plantas germinadas durante 7 días en presencia de AL (tratamiento) o que nunca fueron expuestas a la molécula (control). En B) se muestra la tasa de sobrevida luego de una semana de recuperación post tratamiento. El gráfico muestra el promedio del RWC de 3 plantas completas para cada grupo \pm SD. Mientras que la tasa de sobrevida se calculó con el promedio de sobrevida de 6 grupos de entre 8 y 15 plantas para cada tratamiento. Se realizó un ANOVA de 2 vías con un post test de Tukey con un $p < 0,05$ para RWC y un t-test de dos vías con $p < 0,05$ para la tasa de sobrevida.

Los resultados obtenidos durante el tratamiento no muestran una diferencia estadísticamente significativa en el RWC entre el grupo experimental y control, así como tampoco en la tasa de sobrevida.

3.5 Evaluación fenotípica de plantas de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* germinadas en presencia o ausencia de AL sometidas a déficit nutricional

Debido a que los resultados muestran que plantas tratadas con la molécula generan un mayor número de raíces laterales (sección 3.3.1.1) se evaluó si es que este aumento significa una mejor absorción de nutrientes. Para esto se comparó el

crecimiento de plantas tratadas con diferentes concentraciones de la molécula expuestas a un sustrato con déficit nutricional.

3.5.1 Déficit nutricional en plantas de *A. thaliana*

Para el desarrollo de esta actividad se sembraron semillas en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de AL. El medio MS posee los nutrientes y vitaminas necesarios para el desarrollo normal de una planta (Murashige y Skoog, 1962). Luego de 7 días las plantas crecidas en cada concentración fueron divididas en 2 grupos, uno trasplantado a un medio MS y otro a un medio MS al 10% respecto al grupo control, con el objetivo de generar un déficit nutricional (Gruber *et al.*, 2013). Luego de 4 días se volvió a medir el largo de la raíz. Los resultados se muestran en la Figura 24.

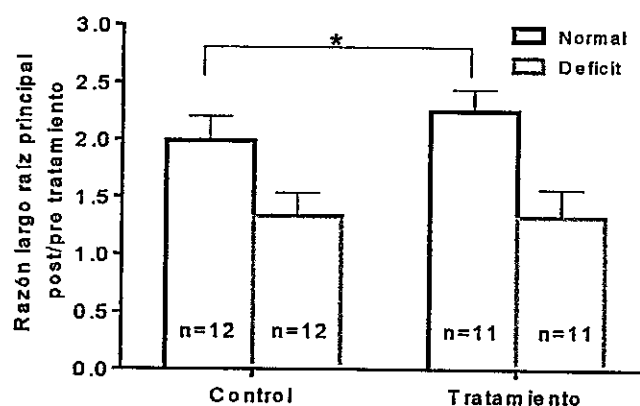


Figura 24: Efecto de déficit nutricional en el crecimiento de la raíz principal de *A. thaliana*. En la figura se compara el crecimiento de la raíz principal de plantas de *A. thaliana* germinadas en 100 nM de AL (Tratamiento) respecto a plantas que no fueron expuestas a la molécula (Control). Ambos grupos fueron trasplantados el día 7 a placas con medio MS fresco (Normal) o con un 10% de la concentración de nutrientes (Déficit). Las barras indican el promedio de la razón del largo de la raíz principal entre el día 11 y 7 \pm SD. El n de cada experimento se indica en la barra y sobre esta el porcentaje de crecimiento. Se realizó un ANOVA de 2 vías con un post test de Tukey con un $p < 0,05$.

Los resultados muestran que ambos grupos presentan una disminución en el crecimiento de la raíz principal al crecer en déficit nutricional respecto al medio normal, sin encontrarse diferencia entre el grupo control y tratamiento. Por lo cual el tratamiento con AL 100 nM no genera una ventaja en plantas crecidas en un medio deficiente en nutrientes *in vitro*. Junto con esto se observa que en condiciones de crecimiento normal el grupo tratado con la molécula posee un crecimiento mayor de su raíz principal respecto al control.

3.5.2 Déficit nutricional en plantas de *S. lycopersicum* cv Micro Tom

Para el desarrollo de esta actividad se sembraron semillas de tomate cv Micro Tom en sustrato inerte compuesto por una mezcla de vermiculita/perlita 1:1 en contenedores de 500 mL los cuales fueron regados con hidropónico al 50%, es decir con la mitad de la concentración de nutrientes, suplementado con 50 nM o 100 nM de AL. Como control del tratamiento de déficit nutricional se utilizó un grupo regado con hidropónico 100%, además de un grupo regado con hidropónico 50% sin AL.

A las 8 semanas se registró el fenotipo (**Figura 25**) y se cuantificó el número de hojas (**Figura 26**).

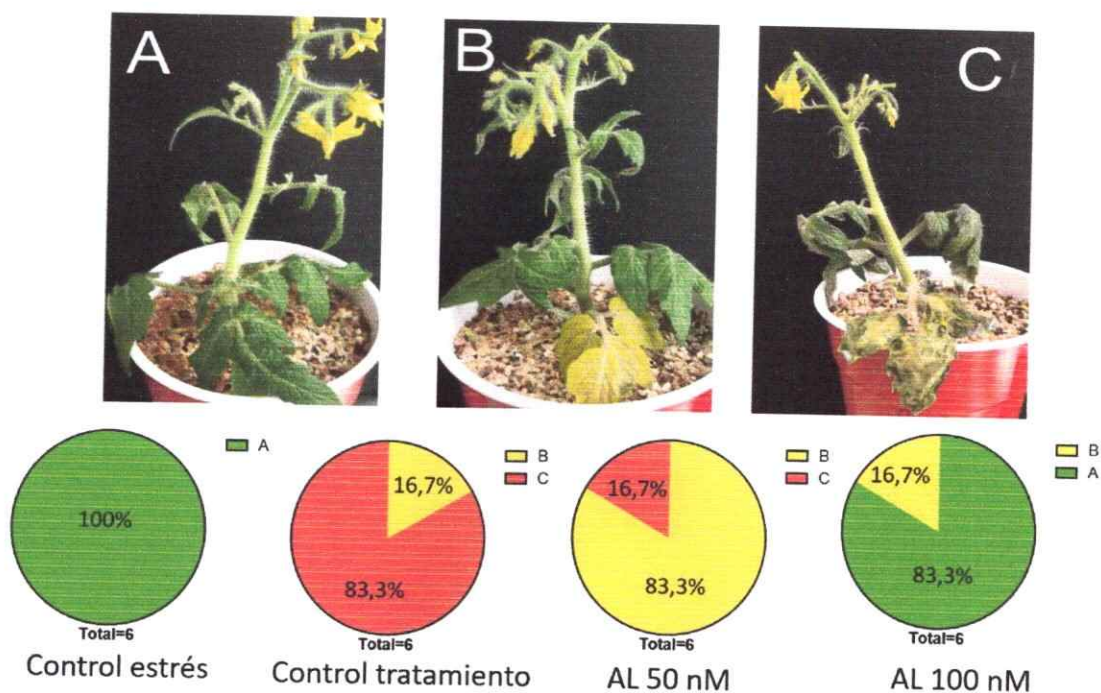
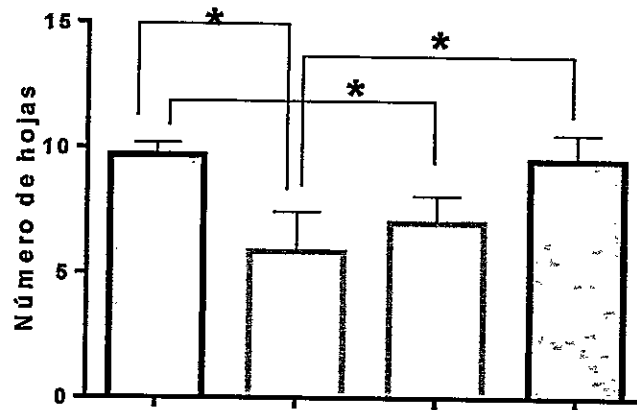


Figura 25: Fenotipo de plantas de tomate sometidas a 8 semanas de déficit nutricional. En la figura se muestran 3 fenotipos representativos luego de que las plantas estuviesen sometidas durante 8 semanas a déficit nutricional. Los gráficos de torta representan el porcentaje de la población para cada grupo (n=6) que presenta el fenotipo A (normal), B (indicios de daño) o C (muy dañado).

Los resultados muestran que, al comparar el control que no fue sometido a estrés nutricional con el control sin tratamiento, el estrés nutricional genera cambios en el fenotipo luego de 8 semanas, los cuales se manifiestan en la pérdida de turgencia de las hojas, y senescencia de hojas (**Figura 26**). Estos efectos son menos severos en el grupo tratado con 50 nM de AL, mientras que el grupo tratado con 100 nM de AL presenta una población muy similar al grupo control sin déficit nutricional.



Hidropónico	100%	50%	50%	50%
[AL]	-	-	50 nM	100 nM

Figura 26: Número de hojas en plantas de tomate sometidas a déficit nutricional luego de 8 semanas. El gráfico muestra el promedio del número de hojas en plantas que han sido sometidas a déficit nutricional. Se midió el número de ramas en un grupo control de tratamiento (sin estrés nutricional), un grupo control para la aplicación de AL (control en estrés nutricional), un grupo germinado en presencia de 50 nM de AL y un grupo germinado en 100 nM de AL. El n para cada grupo es 6, se graficó el promedio \pm SD y se realizó ANOVA de una vía con un pos test de comparación de Dunnett considerando un p value $< 0,05$.

Los resultados muestran que existe una disminución en el número de hojas tanto en el grupo control de aplicación como en el grupo tratado con 50 nM de AL, mientras que el grupo tratado con 100 nM de AL presenta un comportamiento igual al grupo que no fue sometido a estrés nutricional, lo cual indica que la aplicación de 100 nM de AL durante la germinación genera un efecto protector en plantas sometidas a déficit nutricional.

Luego que las plantas cumplieron 4 meses, se cuantificó el número, peso y calibre de frutos por plantas. Los resultados se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Resumen de la producción de frutos en plantas sometidas a déficit nutricional

Grupo	N° Plantas	N° frutos	Frutos por planta (\pm SD)	Peso por fruto ($g\pm$ SD)	Calibre por fruto ($mm\pm$ SD)	Producción por planta ($g\pm$ SD)
Control	6	24	4,0 \pm 3,1	1,1 \pm 0,8	12,0 \pm 3,5	4,4 \pm 1,4
50 nM	6	18	3,0 \pm 2,3	1,5 \pm 1,2	13,1 \pm 4,5	4,2 \pm 2,2
100 nM	6	26	4,3 \pm 2,3	2,0 \pm 1,9	13,9 \pm 3,4	*8,6 \pm 3,4

Frutos por planta, peso por fruto y calibre por fruto es el promedio de las 6 plantas por tratamiento, se realizó análisis estadístico de ANOVA de una vía con post test de Dunnet considerando un $p < 0,05$.

Los resultados muestran que el tratamiento con 50 nM no posee diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control en ninguno de los parámetros evaluados, sin embargo, nuevamente el tratamiento con 100 nM demuestra ser beneficioso en condiciones de déficit nutricional, aumentando la producción por planta en 95,5% respecto al control.

Tomando en cuenta todos los resultados obtenidos, se puede afirmar que una aplicación de 100 nM de AL durante la germinación de plantas de tomate cv Micro Tom tiene un efecto protector cuando la planta es sometida a déficit nutricional.

4 DISCUSION

Debido al aumento en la población mundial, se predice que para el año 2050 será necesario aumentar en un 60% la producción de alimentos (FAO, 2016). Si a esto se le suman los efectos negativos que ha tenido y tendrá el cambio climático en la agricultura (IPPC, 2013; FAO, 2016), se hace evidente la necesidad de mejorar la productividad y generar cultivos que puedan adaptarse de mejor forma al cambio climático.

Ante este panorama, durante el desarrollo de esta tesis de doctorado, se realizó una prueba de concepto con el objetivo ulterior de generar un aumento en la tolerancia a estrés abiótico en plantas, en particular, mediante la manipulación del metabolismo del ácido lipoico, el cual es un poderoso antioxidante con características que lo hacen único entre este tipo de moléculas (sección 1.5). Para llevar a cabo el objetivo general de la tesis, se desarrollaron dos estrategias. La primera consistió en generar plantas genéticamente modificadas que sobre expresen el gen que codifica la enzima lipoil sintasa. Esta estrategia fue abordada en los objetivos específicos 1 y 2. La segunda estrategia consistió en aplicar la molécula de forma exógena, abarcando los objetivos específicos 3, 4 y 5.

La primera estrategia buscó aumentar los niveles de AL mediante la sobre expresión de uno de los 3 genes que participan en la ruta de biosíntesis de esta molécula. Se seleccionó el gen que codifica la enzima lipoil sintasa puesto que es el único de los tres genes de la ruta que se sabe, mediante análisis de datos de micro arreglo, aumenta su expresión en *A. thaliana* al someter la planta a estrés por daño oxidativo (datos de eFP

Browser, Winter *et al.*, 2007), y es la enzima común entre las dos vías de lipoilación (Ewald *et al.*, 2014).

Además de estudiar los efectos de la sobre expresión del gen endógeno de *A. thaliana*, se identificó y estudió el gen de lipoil sintasa proveniente desde *S. lycopersicum* cv Micro Tom, organismo que se sabe responde a estrés salino incrementando sus niveles de ácido lipoico (Sgherri *et al.*, 2008; Sgherri *et al.*, 2007).

4.1 Caracterización de Sllip1

Para seleccionar los genes candidatos que codificasen la enzima lipoil sintasa en *S. lycopersicum*, se realizó un BLAST utilizando las proteínas previamente caracterizadas en *A. thaliana* como molde (Yasuno y Wada, 1998, Yasuno y Wada, 2002). El estudio arrojó cuatro posibles candidatos (**Tabla 2**), de los cuales SILIP1 y SILIP1p presentaron la mayor identidad aminoacídica con AtLIP1 y AtLIP1p de *A. thaliana*, respectivamente. De ellos se caracterizó el gen que codifica a SILIP1 durante el desarrollo de esta tesis, mientras que el gen que codifica para SILIP1p fue estudiado por Simón Miranda en el contexto de su tesis de magister (Miranda, 2017).

Mediante la complementación heteróloga de la cepa KER176 de *E. coli*, la cual posee una mutación en el gen *lipA*, por lo cual no posee actividad lipoil sintasa (Vanden Boom *et al.*, 1991), se determinó que SILIP1 efectivamente posee actividad tipo lipoil sintasa (**Figura 6**), permitiendo la lipoilación de la sub unidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa (**Figura 7**) y E2 del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa, restableciendo el ciclo de Krebs y el crecimiento de la bacteria en un medio mínimo sin suplementar con acetato, succinato o AL (**Figura 8**). A pesar de tener niveles de

acumulación de las lipoil sintasas de origen vegetal similares (**Figura 6**), los niveles de lipoilación de la E2-PDH son menores en el caso de la cepa expresando SILIP1 comparada con AtLIP1 (**Figura 7**). Esto podría sugerir que SILIP1 es menos eficiente que AtLIP1 en el proceso de lipoilación, sin embargo, para poder afirmar esto es necesario realizar análisis bioquímicos con las proteínas purificadas para determinar parámetros como Km (constante de Michaelis-Menten) y velocidad máxima.

Sabiendo que SILIP1 es una lipoil sintasa, se determinó su localización sub celular. En plantas, se han caracterizado enzimas con actividad lipoil sintasa solo en *A. thaliana*. En esta especie, se encontraron dos isoformas, una con localización mitocondrial (Atlip1; Yasuno y Wada, 1998) y otra con localización plastidial (Atlip1p, Yasuno y Wada, 2002). En el caso de *S. lycopersicum*, predicciones *in silico* sugieren que la localización de SILIP1 es mitocondrial, mientras que la otra secuencia con alta identidad identificada, SILIP1p (**Tabla 2**), posee localización plastidial. Para corroborar esta información respecto a SILIP1, se realizó una infiltración transitoria de hojas de *N. tabacum* para la expresión de la proteína fusionada a YFP. El trabajar con este organismo permite verificar de forma rápida y eficiente (2 a 4 días post transformación) la localización de cualquier proteína fusionada a una proteína fluorescente sin importar la especie vegetal de origen (Sparkes *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos (**Figura 5**) muestran que SILIP1 posee una localización mitocondrial, lo que se hace evidente debido a la co-localización de la señal de YFP acoplada a la proteína con respecto a la señal emitida por la sonda de destinación mitocondrial MitoTracker. Por ende, al igual que en *A. thaliana*, *S. lycopersicum* posee

al menos 2 isoformas de la proteína LIP1, una con destinación mitocondrial (SILIP1; este trabajo) y otra con localización plastidial (SILIP1p; Miranda, 2017).

Por lo tanto, este es el primer trabajo que describe y caracteriza enzimas que participan en la ruta del AL en *S. lycopersicum*.

4.2 *A. thaliana* con niveles de expresión aumentados para el gen que codifica la enzima lipoil sintasa

Considerando que la enzima LIP1 participa tanto en la ruta *de novo* como en la de reciclaje de AL (Ewald *et al.*, 2014), durante el desarrollo de esta tesis se propuso como estrategia aumentar los niveles de expresión del gen que codifica esta enzima en plantas de *A. thaliana*. Con este objetivo, se utilizó tanto el gen endógeno de la planta (*Atlip1*) como el gen proveniente de tomate *Sllip1*. La estrategia utilizada para lograr la acumulación de LIP1 fue la sobre expresión del gen mediante la incorporación estable de éste mediante la técnica de inmersión floral (Clough y Bent, 1998) utilizando el vector pGWB8 el cual posee un promotor fuerte y constitutivo. Al momento de seleccionar las plantas transformantes, se encontró que la tasa de transformación verificada por PCR fue mucho menor a lo esperada (entre un 0,5 y 1%) alcanzando solo un 0,008% para el gen *Atlip1* y un 0,012% para el gen *Sllip1*.

Respecto a este comportamiento, se considera que este fenómeno podría producirse por dos motivos: Primero, se sabe que dependiendo del lugar donde se produzca la inserción del transgen en el genoma de la planta, los niveles de expresión pueden variar (Gelvin, 2003; Schnell *et al.*, 2015). Dado esto, cada evento de transformación tendrá distintos niveles de expresión del transgen y puede ser que

aquellos embriones transformantes cuyos niveles de expresión del gen sean muy elevados sean abortados en la silicua, lo cual disminuiría considerablemente el porcentaje de éxito. Esta posibilidad se ve apoyada por los resultados obtenidos al generar plantas de *S. lycopersicum* sobre expresoras de *Sllip1*, *Sllip1p*, o *Atlip1* (Miranda, 2017). Durante el desarrollo de esta tesis, no se lograron obtener líneas de *A. thaliana* transformadas con *Sllip1p*, forma plastidial de la enzima LIP1 (datos no mostrados), lo cual también ocurrió al transformar *S. lycopersicum* (Miranda, 2017). Junto con esto, se obtuvieron 2 tomates transformadas con *Atlip1* cuyo máximo nivel de expresión fue apenas 2 veces respecto al control (Miranda, 2017). Con respecto al gen *Sllip1*, se obtuvieron sólo 3 líneas de tomate con mayor expresión del gen que el control, alcanzando un máximo de 4 veces (Miranda, 2017). Considerando que el promotor 35S de CaMV típicamente produce niveles de expresión de hasta 800 veces siendo lo más típico entre 20 y 40 veces respecto a los niveles de una planta *wild type* (Guttikonda *et al.*, 2014; Trankner *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2014), los aumentos obtenidos en Miranda (2017) son significativamente menores. Finalmente, cabe mencionar que la planta de tomate con mayores niveles de expresión fue la que tuvo menor altura aérea, demoró el mayor tiempo en florecer y generó menos flores y frutos. Todos estos resultados sugieren que la sobre expresión constitutiva del gen *lip1* no es beneficiosa para la planta (*A. thaliana*, esta tesis; tomate, Miranda, 2017). Sin embargo, durante el desarrollo de esta tesis, solo fue posible determinar la presencia de los transgenes y no los niveles de expresión de estos.

El segundo motivo que puede explicar la baja tasa de transformación va de la mano con el primero. Durante el desarrollo de la tesis se vio que, en algunas ocasiones, plantas transformantes demoran más del tiempo normal en elongar su raíz principal (Figura 12C). Es por esto que existe la posibilidad que plantas T1 que si eran transformantes fueron confundidas con el fenotipo sensible al antibiótico.

Respecto a por qué la sobre expresión de *lip1* podría generar problemas de desarrollo en la planta esto no está claro. Hasta la fecha, no se ha reportado la sobre expresión de *lip1* en plantas. Pese a ello, cabe mencionar que una de las enzimas blanco es la sub unidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa (Cicchillo *et al.*, 2004; Perham, 2000), la cual es un regulador esencial de flujo hacia el ciclo de Krebs (Araujo *et al.*, 2012). Otra enzima blanco es la sub unidad E2 del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (Cicchillo *et al.*, 2004; Perham, 2000), la cual es un regulador esencial de flujo dentro del ciclo de Kebs cuya manipulación genera efectos negativos en el desarrollo de organismos vegetales (Araujo *et al.*, 2012). Considerando todos estos datos, queda abierta la pregunta sobre qué está ocurriendo con las rutas metabólicas que requieren la lipoilación para su funcionamiento, así como con la expresión de los genes relacionadas a la ruta de síntesis de éste en plantas que sobre expresan *lip1*. Sin embargo, esta pregunta se aleja del objetivo ulterior de esta tesis, pero queda como una proyección para seguir aportando al conocimiento del metabolismo del AL en plantas.

4.3 Efecto de la aplicación exógena de AL en *A. thaliana*

Como una segunda aproximación para generar una mayor tolerancia a estrés abiótico en plantas mediante la manipulación de AL, se realizó la aplicación de esta

molécula de manera exógena. En la literatura se encuentra descrita la aplicación exógena de AL a plantas para aumentar la tasa de su transformación estable mediante *A. tumefaciens* (Dan *et al.*, 2009), mientras que en *Saccharomyces cerevisiae* se ha visto que la aplicación de esta molécula en el medio de cultivo genera una mejora en la tolerancia a ROS (Wu *et al.*, 2011) lo cual sugiere que AL es capaz de atravesar paredes celulares y membranas biológicas. En humanos, se ha visto que el AL atraviesa la barrera hematoencefálica, además de interactuar con el transportador multivitamínico dependiente de sodio (Gomes y Negrato, 2014; Zehnpfennig *et al.*, 2015).

Durante el desarrollo de esta tesis, se encontró que aplicaciones sobre 500 nM de AL generan una disminución en el largo de la raíz principal (Figura 13 y Figura 14) mientras que con 100 nM no se afecta el largo de la raíz principal y se genera un aumento en el índice de raíces laterales (Figura 15). Respecto a la dosis respuesta de la planta a AL, este mismo comportamiento respecto al desarrollo de la raíz principal se ha visto en la aplicación exógena de brasinoesteroides, en donde bajas concentraciones aumentan el desarrollo de la raíz principal mientras que, a medida que se aumenta la concentración aplicada, el crecimiento se inhibe (Mussig *et al.*, 2003). También se ha visto un comportamiento similar respecto al largo del pelo radicular al tratar la planta con diferentes concentraciones de ácido indol acético (Kubes *et al.*, 2012). Respecto a la relación entre la aplicación de antioxidantes y el desarrollo de la raíz principal, no existe información en la literatura revisada al respecto, lo cual sugiere que el efecto en las raíces del AL no es una característica generalizada de los antioxidantes, sino que es un efecto particular de esta molécula.

La sobrevivencia y desempeño de la planta en diversos ambientes depende en gran medida de la habilidad de ésta para explorar el suelo en busca de minerales y agua. Es por esto que la arquitectura del sistema radicular es de suma importancia al momento de adaptarse a las condiciones del medio y determinar el volumen que la planta es capaz de explorar (Gruber *et al.*, 2013). En el caso de *A. thaliana* y otras dicotiledóneas, poseen una raíz principal que ramifica de forma repetitiva generando raíces laterales, las que a su vez pueden ramificarse también (Peret *et al.*, 2009). El patrón con el que se generan las raíces laterales está determinado por varios factores y puede ser inducido o reprimido en respuesta a condiciones ambientales (Van-Norman *et al.*, 2013). Respecto a la generación de las raíces laterales, la hormona auxina tiene un rol fundamental en el desarrollo de éstas, y se ha visto que la aplicación exógena de esta hormona genera un aumento en el número de raíces laterales (Perez-Henriquez *et al.*, 2012). Adicionalmente, la aplicación del compuesto químico Sortin-2 también es capaz de inducir la formación de raíces laterales independiente de la ruta de auxinas (Perez-Henriquez *et al.*, 2012). En la literatura, no se ha reportado una conexión entre el AL y la generación de raíces laterales. Por lo tanto, este es el primer trabajo en el cual se aplica de manera exógena AL en plantas y se analiza la respuesta de éstas, por lo que como proyección de los resultados obtenidos resulta interesante dilucidar si es que este efecto en cuanto al número de raíces laterales es o no dependiente de la ruta de auxinas.

Independiente de los mecanismos moleculares que generen el aumento en el índice de raíces laterales, el aumento de éste genera que la planta tenga una mayor superficie en la cual puede captar nutrientes y agua. Además, el hecho que haya un cambio fenotípico

en la estructura radicular sugiere que la molécula fue percibida y probablemente incorporada por la planta.

A través de análisis de qRT-PCR en plantas de 10 días se observó que el tratamiento con AL genera una disminución en los niveles de transcrito del gen *Atlip2* mientras que los niveles de transcrito de los genes *Atlip1* y *AtlplA* aumentaron (Figura 16), lo cual se puede interpretar como que el tratamiento con AL favorece la expresión de genes que participan en la ruta de reciclaje por sobre la síntesis *de novo* (Figura 3; Ewald *et al.*, 2014). Los resultados mostraron además que los niveles de transcrito del gen que codifica la principal isoforma de la sub unidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa (*AtmtE21*) disminuyen en alrededor de un 50%; sin embargo, esta reducción no se vio reflejada en la cantidad de proteína lipoilada (Figura 17) lo que puede deberse a la temporalidad de muestreo. Además, cabe mencionar que la inmuno detección realizada está dirigida a proteínas que hayan incorporado el AL y no al total de E2-PDH presente en la planta, por lo cual, debido a que no hay información respecto al momento en que el AL es incorporado a la proteína, podría existir una diferencia entre las cantidades de E2-PDH con AL y aquellas que no lo posean. De hecho, en *A. thaliana*, existe un "pool" de subunidades E2-PDH que no se encuentran lipoiladas completamente (Ewald *et al.*, 2014).

4.4 Efecto de la aplicación de AL en *A. thaliana* sometidas a estrés abiótico

Pese a que no fue posible cuantificar los niveles de AL en la planta como para afirmar fehacientemente que los tratamientos exógenos generan un aumento de la

molécula en la planta, los resultados obtenidos sugieren que la molécula aplicada exógenamente es percibida por la planta y probablemente incorporada a esta.

Considerando que el AL es una molécula con propiedades antioxidantes y que todos los estreses de tipo abiótico desencadenan un daño oxidativo en el organismo (Koyro *et al.*, 2012; Vinocur y Altman, 2005; Zhu, 2016), se analizó si la aplicación de AL tiene un efecto protector ante este tipo de estrés.

Para cuantificar el efecto del estrés por salinidad y metales pesados, el cual fue realizado *in vitro* en medio MS sólido, se midió la tasa de crecimiento de la raíz principal antes y después del estrés, porque la disminución en el crecimiento de ésta es un indicador de que existe daño fisiológico en el organismo (Potters *et al.*, 2007). No se encontró que tratamientos con AL mejorasen la tolerancia a estrés por NaCl o CdSO₄ puesto que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la elongación de la raíz principal del grupo control y el tratado con AL (**Figura 19**, **Figura 22B**). No obstante, se sabe que el tratamiento por estrés funcionó puesto que las raíces, tanto en el grupo que se aplicó AL como en el control, prácticamente no crecieron en comparación a plantas que no fueron sometidas a estrés (**Figura 18**). En el caso del tratamiento con CuSO₄, los resultados muestran que mientras el grupo control detiene el crecimiento de la raíz por completo, el grupo tratado con AL tiene una elongación de un 7% (**Figura 22A**), lo cual sugiere que el AL mejora la tolerancia a cobre. Cabe destacar que las concentraciones de metales pesados o sal utilizadas están cerca a los límites máximos utilizados en la literatura para generar estrés (Ji *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015; Brunetti *et*



al., 2011; Drazkiewicz *et al.*, 2004); esto fue realizado para simular suelos con altas concentraciones de estos metales, o que estén salinizados.

Para cuantificar el efecto del estrés hídrico, el cual fue realizado en plantas trasplantadas a tierra, se midió el contenido relativo de agua (RWC) en plantas completas y la tasa de sobrevivencia al tratamiento (Aguayo *et al.*, 2013). Durante el tratamiento por estrés hídrico, no se observó una diferencia del RWC entre el grupo control y el tratado con AL (**Figura 23A**), y tampoco en cuanto a la tasa de sobrevivencia luego del tratamiento (**Figura 23B**). La hipótesis tras este experimento fue que en plantas tratadas con AL, al haber una mayor superficie radicular (**Figura 15B**), serían capaces de aprovechar de mejor manera la disponibilidad de agua. Sin embargo, pese a que se observa una tendencia en los resultados que avalan esta hipótesis, estos no son estadísticamente significativos (**Figura 23B**). Quizás un tratamiento más prolongado de estrés hídrico genere resultados más evidentes, esto considerando que el RWC nunca bajo del 80% en el grupo control, siendo que en la literatura se alcanzan valores bajo el 50% en el mismo periodo de tratamiento (Aguayo *et al.*, 2013).

Siguiendo con esta misma línea, se evaluó si la modificación del sistema radicular podría generar una mejora en la captación de nutrientes. Para esto, plantas germinadas durante 7 días en AL fueron traspasadas a un medio con un 10% de nutrientes. Sin embargo, luego de 4 días no se encontró diferencia en la elongación de la raíz principal de la planta ni en la arquitectura radicular.

Finalmente, con el objetivo de generar daño oxidativo se realizaron tratamientos con paraquat el cual es un herbicida que en cloroplastos actúa como aceptor de

electrones de proteínas Fe-S del fotosistema I, inhibiendo la reducción de ferredoxina, la generación de NADPH y la regeneración de ácido ascórbico, por lo cual es considerado un potente inductor de estrés oxidativo. Además este herbicida genera un incremento en la producción de radical superóxido en mitocondrias, por lo que es ampliamente usado en la literatura para generar estrés oxidativo en este organelo (Lascano *et al.*, 2012). Junto con el tratamiento con paraquat, las plantas se mantuvieron durante 16 horas en oscuridad para luego ser expuestas a una fuente de luz roja/azul intensa (Murgia *et al.*, 2004). Los resultados muestran que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el contenido de clorofila A, clorofila B o carotenoides totales entre el grupo control y germinado en AL al ser tratados con paraquat y expuestos a luz intensa (**Figura 20** y **Figura 21** columnas Pq). Interesantemente, cuando todas las plantas (con y sin AL) no fueron tratados con paraquat pero si expuestos a luz intensa luego de estar 16 horas en oscuridad, el grupo control disminuyó en mayor medida su contenido de clorofilas y carotenoides totales (en comparación a mediciones realizadas antes de la exposición a luz intensa) que el grupo tratado con AL (**Figura 20** columna MS). Normalmente, cuando una planta es sometida a altas intensidades de luz, entre los mecanismos de aclimatación a ésta se encuentra la degradación del complejo de recolección de luz clorofila a/b (Horie *et al.*, 2009). Este resultado muestra que las plantas tratadas con AL poseen una mejor tolerancia a exceso de luz, lo cual puede atribuirse al efecto protector del AL gracias a sus características antioxidantes. Para complementar este resultado se hace imprescindible cuantificar la eficiencia fotosintética para dilucidar la funcionalidad de los fotosistemas. Un comportamiento similar ocurre con el contenido de carotenoides

totales, en donde el grupo tratado con AL posee una mayor cantidad luego de ser expuestos por 6 horas a luz intensa (Figura 21 columna MS).

4.5 Efecto de la aplicación de AL en tomate

Considerando los resultados obtenidos en *A. thaliana* respecto al aumento en el IRL y con el objetivo de seguir escalando hacia una especie con interés comercial, se analizó sus efectos en tomate. Se escogió el cultivar Micro Tom, el cual posee un ciclo de vida corto y el tamaño de la planta, al ser más pequeño que las variedades comerciales, permite una mejor manipulación en condiciones de laboratorio.

Al germinar y crecer las plantas en un sustrato inerte hidratado con medio hidropónico suplementado con 100 nM de AL, se observó que luego de 4 meses la producción de frutos por planta aumentó en un 60% (Tabla 5), y que al simular un medio pobre en nutrientes germinando y creciendo las plantas en medio hidropónico al 50%, la adición de AL 100 nM genera que la planta tenga una producción de frutos un 96% mayor que el control que no fue tratado con AL (Tabla 8) y que no hayan diferencias en cuanto a la producción de frutos o al fenotipo (Figura 26) con plantas crecidas en medio hidropónico al 100%. Todo lo antes mencionado indica que, al tratar las plantas con AL 100 nM, éstas no se ven afectadas por el déficit nutricional generado por crecerlas con medio hidropónico al 50%. Los resultados obtenidos apuntan a que el tratamiento con AL genera que la planta sea capaz de aprovechar de forma más eficiente los nutrientes presentes en el medio, lo que se traduce en una mayor producción de frutos en condiciones normales de crecimiento o en que la producción no se vea afectada cuando la carga nutricional del medio es reducida a la mitad. En la literatura, no existen

reportes respecto a la aplicación exógena de antioxidantes y el efecto que pueda tener en la captación de nutrientes, por lo que estos resultados probablemente se deban a mecanismos moleculares aún desconocidos por los cuales AL genera un aumento en el IRL. Si bien es cierto que el IRL no ha sido cuantificado en tomate debido a la imposibilidad de separar las raíces del sustrato utilizado sin dañarlas, es muy probable que el comportamiento sea el mismo que el observado en *A. thaliana* (Figura 15) lo cual se puede verificar a modo de proyección realizando un cultivo en medio hidropónico sin sustrato, permitiendo que las raíces crezcan en un medio líquido.

Con la idea de hacer un acercamiento a condiciones de campo, se analizó el efecto que tiene la molécula en plantas tratadas con AL desde la germinación o en el momento de ser trasplantadas a tierra, sin encontrar diferencias entre el grupo tratado y el control en ambos casos (Tabla 6 y Tabla 7). El por qué la molécula tiene efecto en las plantas cuando éstas son crecidas en un sustrato inerte hidratado con medio hidropónico y no en tierra puede explicarse por la dosis de la molécula que está detectando la planta (tomate). Como se vio en *A. thaliana*, existe una dosis-respuesta en cuanto al fenotipo causado por el AL (Figura 13). Mientras que, los tomates crecidos en medio hidropónico están en un ambiente cerrado, lo que hace que la cantidad de AL en el medio disminuya solamente a medida que la planta la absorba, esto no ocurre en plantas crecidas en tierra, en donde el macetero tiene orificios por lo que cada vez que la planta es regada con medio sin AL, la cantidad de ácido lipoico presente en la tierra va disminuyendo. Es por esto que, al momento de llevar estas aplicaciones a campo será

necesario realizar un ajuste en cuanto a la concentración y/o a la frecuencia de aplicación de la molécula en los cultivos que se quieran tratar.

4.6 Implicancia biotecnológica de los resultados obtenidos en esta tesis

Los resultados obtenidos tanto en *A. thaliana* como en tomate son muy alentadores. Si bien, la manipulación del metabolismo del ácido lipoico mediante la aplicación exógena de la molécula no generó tolerancia a todos los estreses abióticos estudiados, si se observó que en *A. thaliana* es capaz de modificar la arquitectura radicular generando un aumento en el índice de raíces laterales lo cual en tomates se ve extrapolado a generar una tolerancia al estrés generado por déficit nutricional y aumentar la producción de frutos cuando la planta es crecida en medio hidropónico, lo cual lo convierte en un promotor de crecimiento.

Mediante hidroponía es posible cultivar una planta durante todo su ciclo de vida fuera del suelo. Además, los cultivos hidropónicos son utilizados para la producción de almácigos (grupo de plantas en estado juvenil sembradas en un lugar protegido i.e. invernadero) los cuales son posteriormente trasplantados al suelo (Universidad de Talca y FAO, 2005). Dentro de las especies que se producen a través de almácigos se encuentra el tomate, con alrededor de 3.490 hectáreas sembradas en Chile durante el año 2016 (ODEPA, 2016). El rendimiento promedio estimado para un campo de tomates es de 42.000 kg/ha lo que se traduce en un margen neto de \$2.818.875 CLP por hectárea para el agricultor. Dentro de los costos calculados por hectárea, el agricultor gasta alrededor de \$720.000 CLP (18% del costo total) en concepto de plántulas de tomate comprándolas a un valor unitario de \$80 CLP (9000 plantines; ODEPA, 2013).

Para generar los plantines en medio hidropónico se utiliza entre 2 y 3,5 L de solución nutritiva por metro cuadrado, el tiempo que demora un almácigo hasta estar listo para ser traspasado a tierra es entre 18 y 22 días. Asumiendo que se utilizan 3,5L por metro cuadrado y se cultivan 50 almácigos por metro cuadrado (máximo puede ser hasta 100) y se trasplantan los almácigos al día 22, el costo para el productor de almácigos es de \$3,25 CLP adicionales por planta, esto considerando un margen de ganancia del 80% en el precio del promotor de crecimiento.

Considerando que el productor de plantines traspasa este costo adicional al precio del plantin y fija el precio de venta al agricultor en \$105 CLP (costo del promotor de crecimiento +25% de ganancia) y considerando que el efecto generado en la producción por hectárea por el promotor de crecimiento es de solo un 25% (en lugar del 60% obtenido durante el desarrollo de esta tesis) esto se traduce en un aumento en las ganancias netas para el agricultor de un 52%.

Todos estos resultados obtenidos permitieron redactar una solicitud de patente, la cual fue presentada al INAPI (2016-03333, "Composición bioestimulante natural para el mejoramiento de la producción agrícola, método de aplicación y de su uso para incrementar el número de raíces en las plantas") y que hace relación con la utilización del AL como un promotor de crecimiento natural para el mejoramiento de la producción agrícola.

El aporte que puede hacer este descubrimiento a la agricultura puede ser muy importante, sobre todo considerando que, debido al cambio climático y el aumento de la población mundial, se hace necesario mejorar la producción de cultivos (FAO, 2016).

5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante esta tesis muestran que *Sllip1* aislado desde tomate codifica una enzima lipoil sintasa, la cual tiene destinación mitocondrial.

Al transformar *A. thaliana* de manera estable con el gen *Atlip1* o *Sllip1* la tasa de transformación es menor a la esperada y la planta presenta un fenotipo con retardo en el crecimiento y genera menos semillas que una planta *wild type*, esto, junto con resultados obtenidos por Miranda (2017) sugiere que la expresión constitutiva de *lip1* no es beneficiosa para la planta.

Respecto a la aplicación exógena de AL sólo una aplicación desde la germinación gatilla un efecto positivo en el fenotipo de las plantas crecidas *in vitro* o en medio hidropónico.

El principal efecto generado en plantas de *A. thaliana* fue la generación de más raíces laterales (dejando abierta la pregunta sobre qué es lo que ocurre a nivel molecular), lo cual queda como una proyección para futuras investigaciones. Además, en plantas de tomate crecidas en medio hidropónico, AL aumenta la producción total de frutos de tomate en un 60%.

Pese a que no fue posible determinar si es que la aplicación de AL exógeno modificaba los niveles de ácido lipoico en la planta, se determinó que el tratamiento con 100 nM de ácido lipoico modifica los niveles de expresión de los genes que participan en la ruta de biosíntesis, favoreciendo la ruta de reciclaje, con lo cual se concluye que este tratamiento efectivamente modifica el metabolismo de la molécula en la planta.

Los resultados muestran que la aplicación de AL genera tolerancia a estrés por déficit nutricional en tomates crecidos en medio hidropónico, lo cual se traduce en una mejora de un 95% en la producción de frutos respecto a una planta que no fue tratada con la molécula. Este resultado avala la hipótesis de que la manipulación del metabolismo del AL es capaz de generar tolerancia a estrés abiótico.

ANEXO 1: Partidores utilizados

N°	Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
1	Atlip1_F	ATGCATTTCGCGCTCCGCC	Este trabajo
2	Atlip1_R	CTACGGGGATGTAGAAGGAGAAGCC	Este trabajo
3	Atlip1_Rns	CGGGGATGTAGAAGGAGAAGCC	Este trabajo
4	Sllip1_F	ATGAATTCCCCTTTCACATCTCTCGTTT	Este trabajo
5	Sllip1_R	CTAAGACAACGATGCTGCACGATCAGAT	Este trabajo
6	Sllip1_Rns	AGACAACGATGCTGCACGATCAGAT	Este trabajo
7	Atlip1RT_F	CCTGCAGGCACCTTAACAAAGACT	Este trabajo
8	Atlip1RT_R	AAGGCATCTGGTGTACGTAAGCTCA	Este trabajo
9	Atlip2RT_F	CCTTCCATGGCCCTCATCAAGCC	Este trabajo
10	Atlip2RT_R	CCTGCTCGAGCTTTCACGCCA	Este trabajo
11	AtlipART_F	TGGTGATCGTAAGTTCGGTGGGA	Este trabajo
12	AtlipART_R	TGTGGCACTCTCGAAGGCAGC	Este trabajo
13	mtE21RTF	TAGACGGTGCCATTGGAGCTGA	Este trabajo
14	mtE21RTR	TTCCATTGCGTGGTTGGTTCTC	Este trabajo
17	SILIP1expF	GCTACACCAGCATCTCCACCTC	Miranda, 2017
18	AtlipExpF	TTCTCCTCTTCTCGGCTGTAAGT	Yasuno y Wada, 1998
19	gapaF	GGTAGGATCGGGAGGAAC	Disponible en laboratorio
20	gapaR	GATAACCTTCTTGGCACCAG	Disponible en laboratorio
21	hptF	TTTGTGTACGCCCCGACAGT	Disponible en laboratorio
22	hptR	AAGACCTGCCTGAAACCGA	Disponible en laboratorio
23	HISR	GCATGATGATGATGATGATGGCTG	Disponible en laboratorio

ANEXO 2: programas de PCR

Nombre	Nº Ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)
Atlip1 genHIS	1	Desnaturalización	94	05:00
	42	Desnaturalización	94	00:30
		Hibridación	60	00:45
		Extensión	72	01:00
	1	Extensión	72	10:00
Slip1	1	Desnaturalización	94	05:00
	42	Desnaturalización	94	00:30
		Hibridación	66	00:50
		Extensión	72	01:00
	1	Extensión	72	10:00
HPT gapa	1	Desnaturalización	94	05:00
	42	Desnaturalización	94	00:30
		Hibridación	63	00:45
		Extensión	72	00:45
	1	Extensión	72	10:00
qRT-PCR	1	Desnaturalización	95	10:00
	40	Desnaturalización	95	00:15
		Hibridación	60	00:15
		Extensión	72	00:15
	1	Curva disociación	95	01:00
			60	00:30
			95	00:30

REFERENCIAS

- Aguayo MF, Ampuero D, Mandujano P, Parada R, Munoz R, Gallart M, Altabella T, Cabrera R, Stange C, Handford M (2013) Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 205-206:63-75.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 (3):403-410.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64 (15):5245-5250.
- Angelides KJ, Akiyama SK, Hammes GG (1979) Subunit stoichiometry and molecular weight of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (7):3279-3283.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-399.
- Araujo WL, Nunes-Nesi A, Nikoloski Z, Sweetlove LJ, Fernie AR (2012) Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant Cell Environ* 35 (1):1-21.
- Biblioteca del Congreso Nacional (2007) Cambio climático: sus efectos en Chile y las acciones para combatirlo. http://www.bcn.cl/carpeta_temas_profundidad/temas_profundidad.2007-04-11.5841476988. revisado el 30/06 2017
- Brunetti P, Zanella L, Proia A, De Paolis A, Falasca G, Altamura MM, Sanita di Toppi L, Costantino P, Cardarelli M (2011) Cadmium tolerance and phytochelatin content of *Arabidopsis* seedlings over-expressing the phytochelatin synthase gene *AtPCS1*. *J Exp Bot* 62 (15):5509-5519.
- Busse E, Zimmer G, Schopohl B, Kornhuber B (1992) Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung* 42 (6):829-831.
- Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihm BH (1998) Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med* 24 (6):1023-1039.
- Cabello JV, Lodeyro AF, Zurbriggen MD (2014) Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Curr Opin Biotechnol* 26:62-70.

- Cicchillo RM, Booker SJ (2005) Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in *Escherichia coli*: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide. *J Am Chem Soc* 127 (9):2860-2861.
- Cicchillo RM, Iwig DF, Jones AD, Nesbitt NM, Baleanu-Gogonea C, Souder MG, Tu L, Booker SJ (2004) Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry* 43 (21):6378-6386.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16 (6):735-743.
- Christensen QH, Cronan JE (2010) Lipoic acid synthesis: a new family of octanoyltransferases generally annotated as lipoate protein ligases. *Biochemistry* 49 (46):10024-10036.
- Dan Y, Armstrong CL, Dong J, Feng X, Fry JE, Keithly GE, Martinell BJ, Roberts GA, Smith LA, Tan LJ, Duncan DR (2009) Lipoic acid—an unique plant transformation enhancer. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45:630-638.
- Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109:212-228.
- Departamento de Cambio Climático del Ministerio del Medio Ambiente (2015) Plan Nacional de Adaptación al Cambio Climático. Gobierno de Chile.
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rebeille F (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci* 6 (4):167-176.
- Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Krupa Z (2004) Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biomaterials* 17 (4):379-387.
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* 45 (4):616-629.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300 (4):1005-1016.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8 (5):978-984.
- Ewald R, Hoffmann C, Florian A, Neuhaus E, Fernie AR, Bauwe H (2014) Lipoate-Protein Ligase and Octanoyltransferase Are Essential for Protein Lipoylation in Mitochondria of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 165 (3):978-990.
- FAO (2016) The State of Food and Agriculture 2016. Climate change, agriculture and food security.

- Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (1):16-37, table of contents.
- Gomes MB, Negrato CA (2014) Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 6 (1):80.
- Gruber BD, Giehl RF, Friedel S, von Wiren N (2013) Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol* 163 (1):161-179.
- Gueguen V, Macherel D, Jaquinod M, Douce R, Bourguignon J (2000) Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J Biol Chem* 275 (7):5016-5025.
- Guttikonda SK, Valliyodan B, Neelakandan AK, Tran LS, Kumar R, Quach TN, Voothuluru P, Gutierrez-Gonzalez JJ, Aldrich DL, Pallardy SG, Sharp RE, Ho TH, Nguyen HT (2014) Overexpression of AtDREB1D transcription factor improves drought tolerance in soybean. *Mol Biol Rep* 41 (12):7995-8008.
- Hayden MA, Huang I, Bussiere DE, Ashley GW (1992) The biosynthesis of lipoic acid. Cloning of lip, a lipoate biosynthetic locus of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267 (14):9512-9515.
- Hermes FAM, Cronan JE (2009) Scavenging of Cytosolic Octanoic Acid by Mutant LplA Lipoate Ligases Allows Growth of *Escherichia coli* Strains Lacking the LipB Octanoyltransferase of Lipoic Acid Synthesis. *J Bacteriol* 191 (22):6796-6803.
- Horie Y, Ito H, Kusaba M, Tanaka R, Tanaka A (2009) Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 284 (26):17449-17456.
- IPPC (2013) Fifth Assessment Report, WG1 AR5.
- Jako C, Kumar A, Wei Y, Zou J, Barton DL, Giblin EM, Covello PS, Taylor DC (2001) Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol* 126 (2):861-874.
- Ji H, Pardo JM, Batelli G, Van Oosten MJ, Bressan RA, Li X (2013) The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Mol Plant* 6 (2):275-286.
- Jimenez-Lopez JC, Wang X, Kotchoni SO, Huang S, Szymanski DB, Staiger CJ (2014) Heterodimeric capping protein from *Arabidopsis* is a membrane-associated, actin-binding protein. *Plant Physiol* 166 (3):1312-1328.
- Jocelyn PC (1967) The standard redox potential of cysteine-cystine from the thiol-disulphide exchange reaction with glutathione and lipoic acid. *Eur J Biochem* 2 (3):327-331.

- Jutsz AM, Gnida A (2015) Mechanisms of stress avoidance and tolerance by plants used in phytoremediation of heavy metals. *Arch Environ Prot* 41 (4):104-114.
- Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L (1992) Dihydrolipoic acid--a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 44 (8):1637-1649.
- Kang SG, Jeong HK, Lee E, Natarajan S (2007) Characterization of a lipoate-protein ligase A gene of rice (*Oryza sativa* L.). *Gene* 393 (1-2):53-61.
- Khanna S, Atalay M, Laaksonen DE, Gul M, Roy S, Sen CK (1999) Alpha-lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. *J Appl Physiol* (1985) 86 (4):1191-1196.
- Koyro H-W, Ahmad P, Geissler N (2012) Abiotic Stress Responses in Plants: An Overview. En: Ahmad P, Prasad MNV (eds) *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. doi:10.1007/978-1-4614-0815-4_1
- Kubes M, Yang H, Richter GL, Cheng Y, Mlodzinska E, Wang X, Blakeslee JJ, Carraro N, Petrasek J, Zazimalova E, Hoyerova K, Peer WA, Murphy AS (2012) The *Arabidopsis* concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *Plant J* 69 (4):640-654.
- Lascano R, Muñoz N, Robert Gn, Rodriguez M, Melchiorre M, Trippi V, Quero Gn (2012) Paraquat: An Oxidative Stress Inducer. En: Hasaneen MN (ed) *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350-382.
- Matsuura HN, Rau MR, Fett-Neto AG (2014) Oxidative stress and production of bioactive monoterpene indole alkaloids: biotechnological implications. *Biotechnol Lett* 36 (2):191-200.
- Miranda S (2017) Estudio de la función de las lipoil sintasas SLLIP1 y SLLIP1p mediante su sobre-expresión en tomate. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas, Universidad de Chile,
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7 (9):405-410.
- Mooney BP, Miernyk JA, Randall DD (1999) Cloning and characterization of the dihydrolipoamide S-acetyltransferase subunit of the plastid pyruvate dehydrogenase complex (E2) from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 120 (2):443-452.
- Mooney BP, Miernyk JA, Randall DD (2002) The complex fate of alpha-ketoacids. *Annu Rev Plant Biol* 53:357-375.

- Morris TW, Reed KE, Cronan JE (1994) Identification of the Gene Encoding Lipoate-Protein Ligase-a of Escherichia-Coli - Molecular-Cloning and Characterization of the Lpla Gene and Gene-Product. *J Biol Chem* 269 (23):16091-16100.
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3):473-497.
- Murgia I, Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Carravieri S, Soave C (2004) Arabidopsis thaliana plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J* 38 (6):940-953.
- Mussig C, Shin GH, Altmann T (2003) Brassinosteroids promote root growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133 (3):1261-1271.
- Nallamsetty S, Austin BP, Penrose KJ, Waugh DS (2005) Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His6-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of Escherichia coli. *Protein Sci* 14 (12):2964-2971.
- NCBI Resource Coordinators (2017) Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 45 (D1):D12-D17.
- ODEPA (2013). <http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2013/09/12261.pdf>. revisado el 15/09 2017
- ODEPA (2016). <http://www.odepa.cl/estadisticas/productivas/>. revisado el 15/09 2017
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ (1995) alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19 (2):227-250.
- Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplace L, Beeckman T, Bennett MJ (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 14 (7):399-408.
- Perez-Henriquez P, Raikhel NV, Norambuena L (2012) Endocytic trafficking towards the vacuole plays a key role in the auxin receptor SCF(TIR)-independent mechanism of lateral root formation in A. thaliana. *Mol Plant* 5 (6):1195-1209.
- Perez-Lopez U, Robredo A, Lacuesta M, Sgherri C, Mena-Petite A, Navari-Izzo F, Munoz-Rueda A (2010) Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to salinity and elevated CO₂. *Physiol Plant* 139 (3):256-268.
- Perham RN (2000) Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: Catalytic machines for multistep reactions. *Annu Rev Biochem* 69:961-1004.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8 (10):785-786.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MA (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci* 12 (3):98-105.

- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339 (1):62-66.
- Ramaswamy AV, Maurelli AT (2010) *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 Can Utilize Exogenous Lipoic Acid through the Action of the Lipoic Acid Ligase LplA1. *J Bacteriol* 192 (23):6172-6181.
- Rebeille F, Alban C, Bourguignon J, Ravanel S, Douce R (2007) The role of plant mitochondria in the biosynthesis of coenzymes. *Photosynth Res* 92 (2):149-162.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9 (7):671-675.
- Schnell J, Steele M, Bean J, Neuspiel M, Girard C, Dormann N, Pearson C, Savoie A, Bourbonniere L, Macdonald P (2015) A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments. *Transgenic Res* 24 (1):1-17.
- Schutzendubel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53 (372):1351-1365.
- Sgherri C, Kadlecova Z, Pardossi A, Navari-Izzo F, Izzo R (2008) Irrigation with diluted Seawater improves the nutritional value of cherry tomatoes. *J Agr Food Chem* 56 (9):3391-3397.
- Sgherri C, Navari-Izzo F, Pardossi A, Soressi GP, Izzo R (2007) The influence of diluted seawater and ripening stage on the content of antioxidants in fruits of different tomato genotypes. *J Agric Food Chem* 55 (6):2452-2458.
- Sgherri C, Quartacci MF, Izzo R, Navari-Izzo F (2002) Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper. *Plant Physiol Bioch* 40 (6-8):591-597.
- Sparkes IA, Runions J, Kearns A, Hawes C (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* 1 (4):2019-2025.
- Sun Y, Kong X, Li C, Liu Y, Ding Z (2015) Potassium Retention under Salt Stress Is Associated with Natural Variation in Salinity Tolerance among *Arabidopsis* Accessions. *Plos One* 10 (5):e0124032.
- Tomato Genome C (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485 (7400):635-641.
- Trankner C, Lehmann S, Hoenicka H, Hanke MV, Fladung M, Lenhardt D, Dunemann F, Gau A, Schlangen K, Malnoy M, Flachowsky H (2010) Over-expression of an FT-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232 (6):1309-1324.

- Universidad de Talca, FAO (2005) Almacigera flotante para producción de almácigos agrícolas. http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/2932/1/Carrasco_G.pdf. revisado el 15/09 2017
- Van-Norman JM, Xuan W, Beeckman T, Benfey PN (2013) To branch or not to branch: the role of pre-patterning in lateral root formation. *Development* 140:4301-4310.
- Vanden Boom TJ, Reed KE, Cronan JE, Jr. (1991) Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: isolation of null mutants defective in lipoic acid biosynthesis, molecular cloning and characterization of the *E. coli* lip locus, and identification of the lipoylated protein of the glycine cleavage system. *J Bacteriol* 173 (20):6411-6420.
- Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotech* 16 (2):123-132.
- Wada H, Shintani D, Ohlrogge J (1997) Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *P Natl Acad Sci USA* 94 (4):1591-1596.
- Wada M, Yasuno R, Wada M (2001) Identification of an *Arabidopsis* cDNA encoding a lipoyltransferase located in plastids. *Febs Lett* 506 (3):286-290.
- Wang WX, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218 (1):1-14.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *Plos One* 2 (8).
- World Bank (2007) World development report 2008: Agriculture for development. World Bank, Washington, DC.
- Wu MJ, O'Doherty PJ, Fernandez HR, Lyons V, Rogers PJ, Dawes IW, Higgins VJ (2011) An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 11 (4):379-387.
- Xiong H, Li J, Liu P, Duan J, Zhao Y, Guo X, Li Y, Zhang H, Ali J, Li Z (2014) Overexpression of OsMYB48-1, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice. *Plos One* 9 (3):e92913.
- Yasuno R, von Wettstein-Knowles P, Wada H (2004) Identification and molecular characterization of the beta-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase component of the *Arabidopsis* mitochondrial fatty acid synthase. *J Biol Chem* 279 (9):8242-8251.
- Yasuno R, Wada H (1998) Biosynthesis of lipoic acid in *Arabidopsis*: cloning and characterization of the cDNA for lipoic acid synthase. *Plant Physiol* 118 (3):935-943.

- Yasuno R, Wada H (2002) The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Lett* 517 (1-3):110-114.
- Yu H, Du X, Zhang F, Zhang F, Hu Y, Liu S, Jiang X, Wang G, Liu D (2012) A mutation in the E2 subunit of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex in *Arabidopsis* reduces plant organ size and enhances the accumulation of amino acids and intermediate products of the TCA cycle. *Planta* 236 (2):387-399.
- Zehnpfennig B, Wiriyasermkul P, Carlson DA, Quick M (2015) Interaction of alpha-Lipoic Acid with the Human Na⁺/Multivitamin Transporter (hSMVT). *J Biol Chem* 290 (26):16372-16382.
- Zhu JK (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167 (2):313-324.