



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CHILE

Patricio Arce Johnson
Facultad de Ciencias Biológicas



El Caso de la Tolerancia a la Salinidad



DESERTIFICACIÓN MUNDIAL



NATURE|Vol 452|20 March 2008

- La desertificación es un fenómeno mundial que afecta a un 40% de la masa terrestre de nuestro planeta (CNULD, 2006)
- El 22% de la producción mundial de alimentos procede de zonas áridas y semiáridas, las cuales “están en riesgo de desertificación” y concentran “la mayoría de la población pobre del planeta” (CNULD, 2008)
- La desertificación en Chile abarca un 66% del territorio (40 millones de hectáreas), lo que constituye el problema ambiental más grave del país (CODEFF, 2006)
- Para el 2025, más de la mitad de las naciones del mundo se enfrentarán a estrés o escasez de agua dulce, y para el año 2050, un 75% de la población mundial podría enfrentarse a la escasez de agua dulce

PROBLEMA: Suelos Altamente Salinos



Clementines



Valles	Conductividad eléctrica (uS/cm)	Cloro (mg/l)	Boro (mg/l)
Río Copiapó	1.000-2.200	40-160	1,0-2,2
Río Huasco	500-1.200	20-50	1,0-1,1
Río Limarí	200-600	15-80	0,4-0,7

General Direction of Water, 2004.

IMPORTANCIA DE LOS CITRICOS

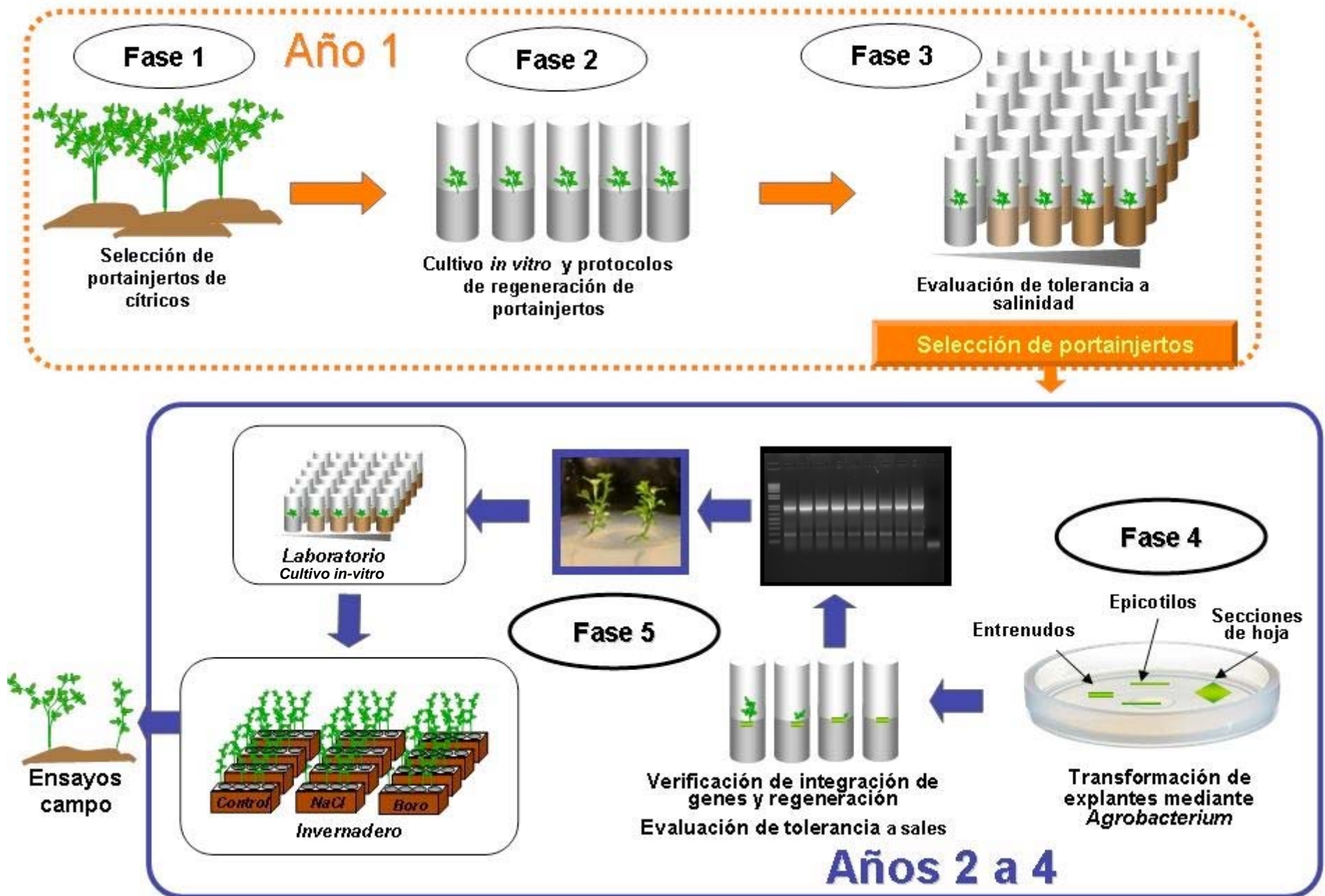
- En Chile 20.398 Ha plantadas (2008)
- 7,9% de esta superficie Principalmente Región Metropolitana, Valparaíso y O`Higgins
- Temperatura óptima: Valle de limarí, Elqui, Huasco y Copiapó
- Producción mundial de 108 millones de toneladas, superficie de 7,4 millones de Ha.
- Brasil (20,5 millones de toneladas), EEUU (15) y China (14.5)



www.studio73.ca

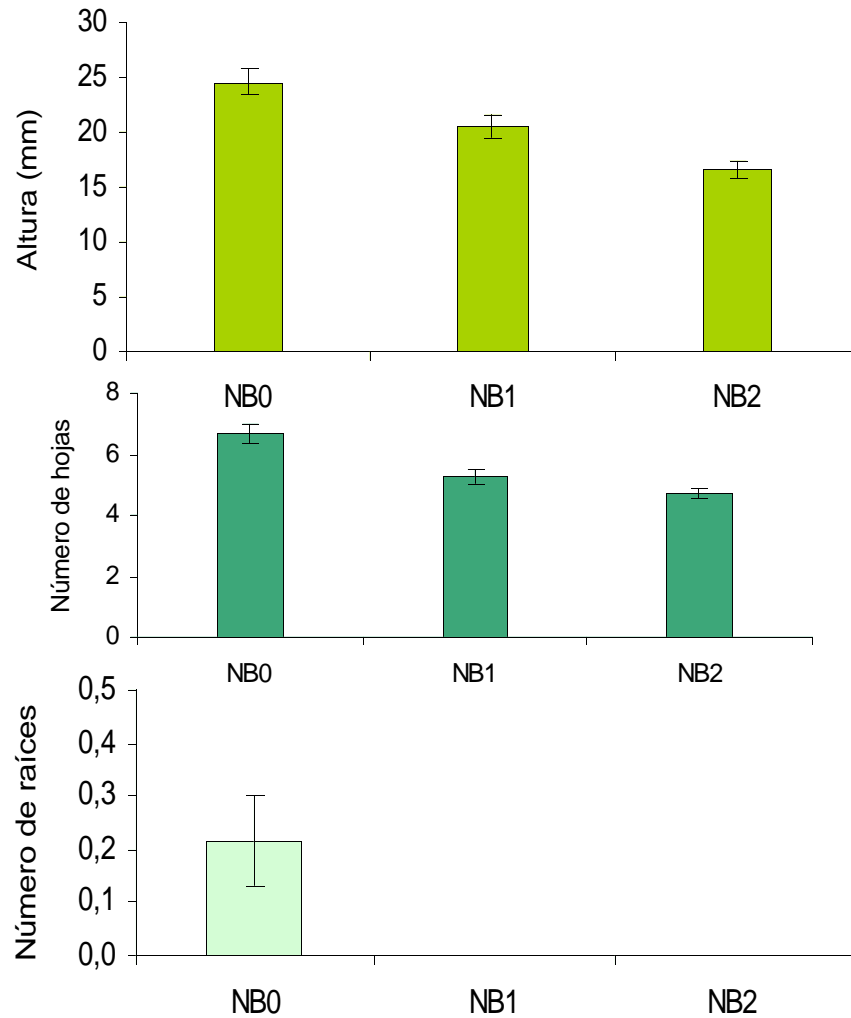


Incremento de Tolerancia a Salinidad en Cítricos





Tolerancia a NaCl + B

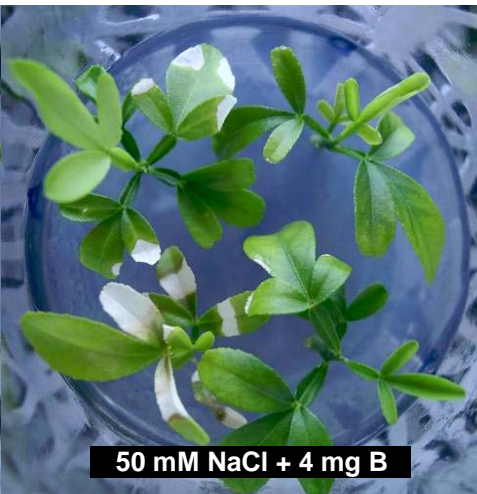
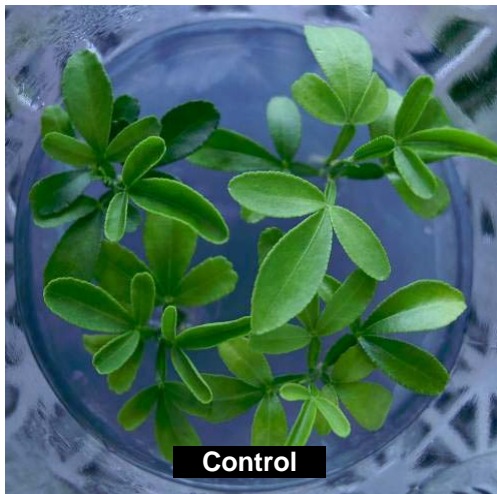
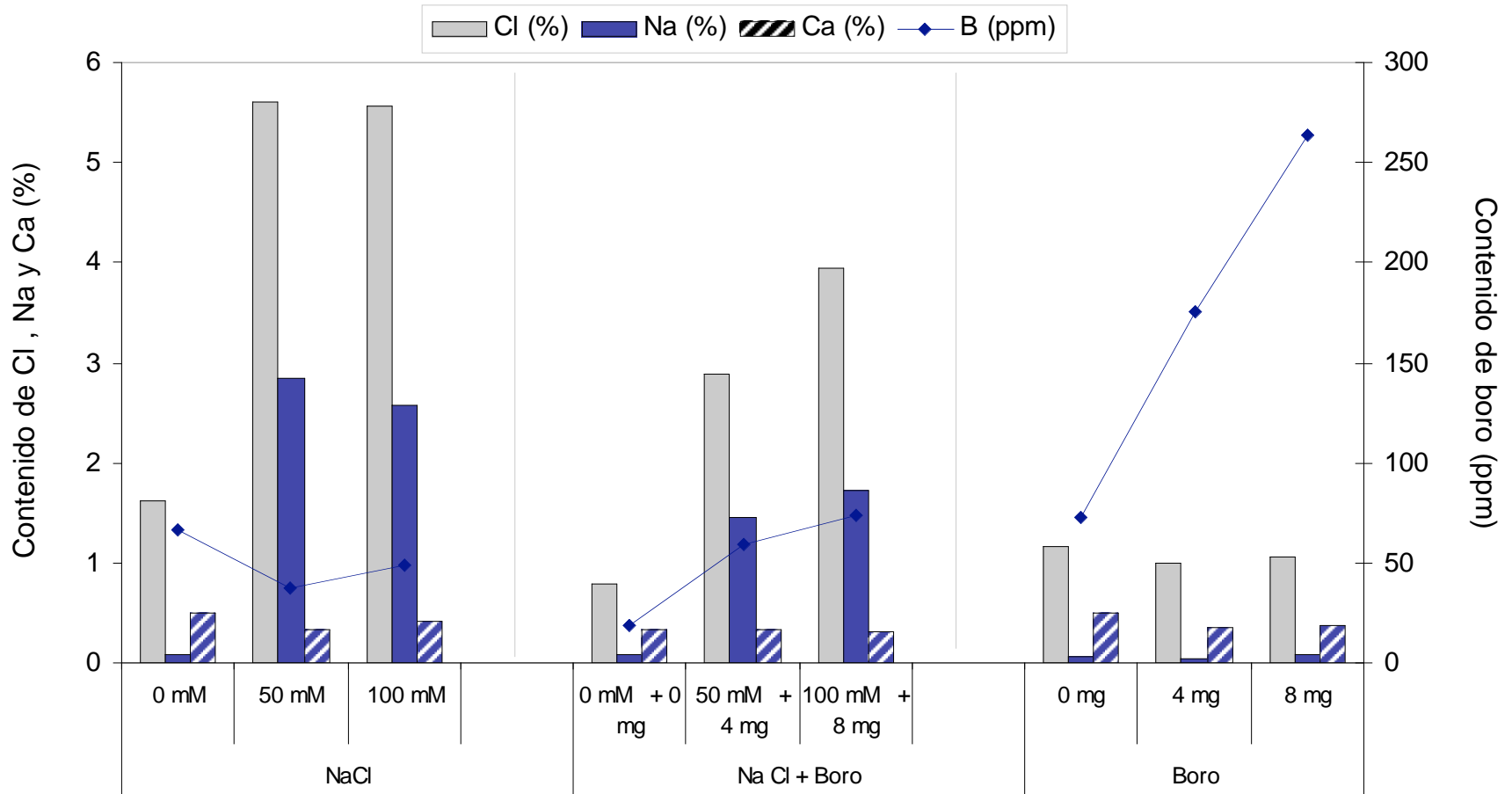


NB0: control, medio MS+vitaminas

NB1: NaCl 50 mM + B 4 mg/l

NB2: NaCl 100 mM + B 8 mg/l





Portainjerto C-35

0 mM NaCl



50 mM NaCl



100 mM NaCl

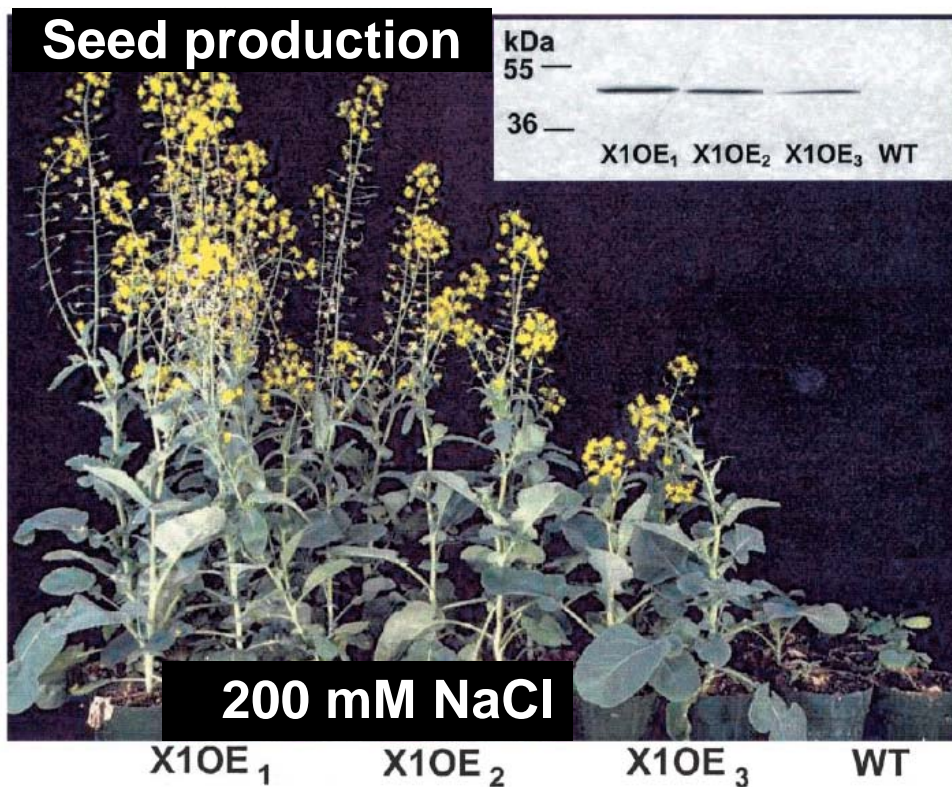


200 mM NaCl

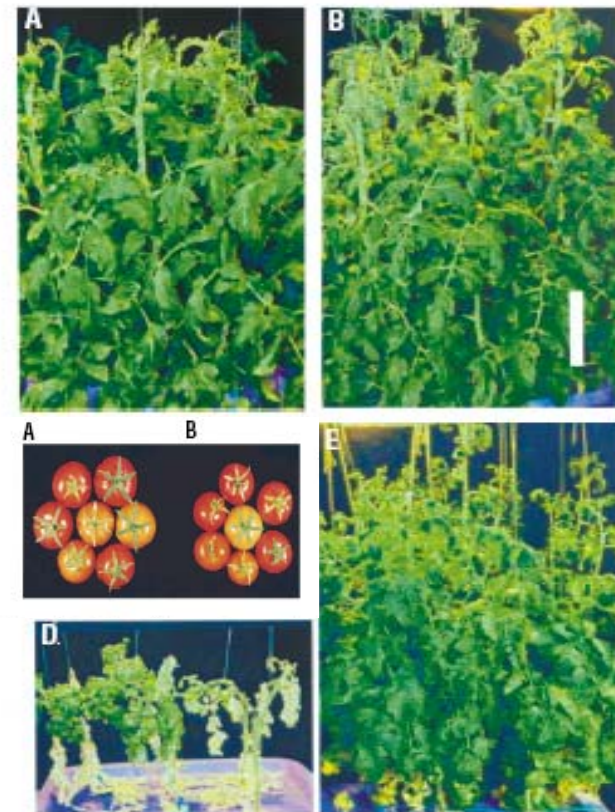


Transportador de Na utilizado en transformación de Canola y Tomate

Canola: sobre-expresión del antiporter Na^+/H^+ vacuolar AtNHX1



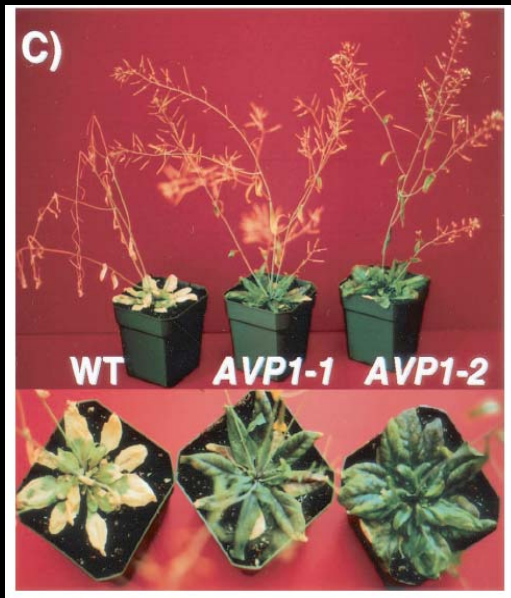
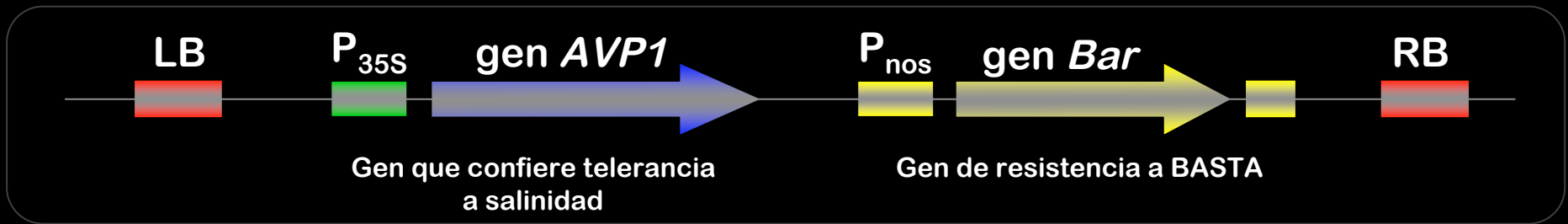
Plantas de tomate tolerante a 200mM NaCl



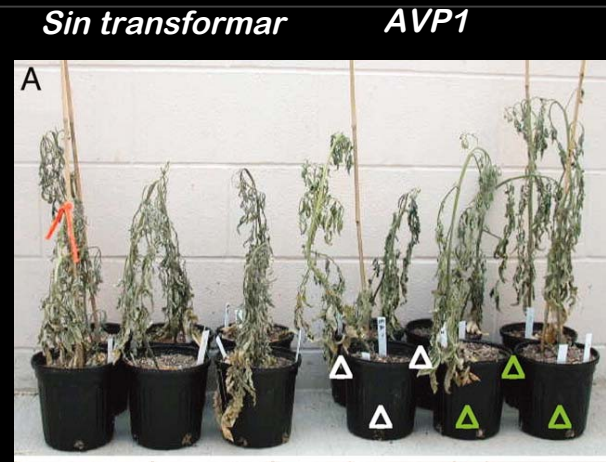
Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, **Blumwald E** (2001) Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12832-12836

Zhang H-X, **Blumwald E** (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnol* 19: 765-768

Sobre-expresión de AVP1 Confiere Tolerancia a la Salinidad y Sequía



Planta modelo, *Arabidopsis thaliana*
10 días en 250uM NaCl



Tomate, *Lycopersicon esculentum*

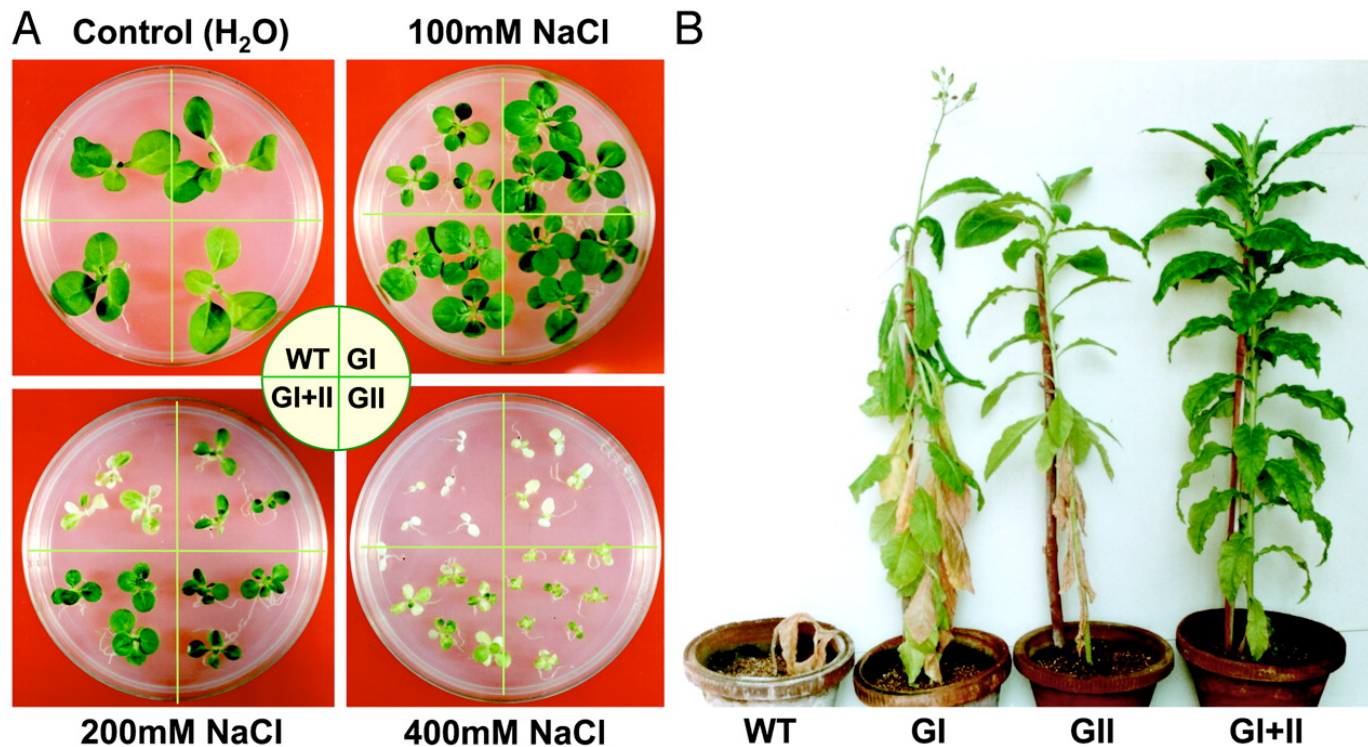
A) 13 días sin riego

B) 1 días después de la re-hidratación

Sobrexpresión de GlyI-GlyII Confiere Tolerancia a la Salinidad

Tolerancia relativa a la salinidad en plantas de tabaco que sobrexpresan la GLIOXALASA I y II → evaluación en semillas

→ evaluación en plantas completas



Construcciones utilizadas para transformación genética de cítricos, que confieren tolerancia a la salinidad

Construcción	Genes	<i>E. coli</i>	<i>Agrobacterium</i>	Planta	Gen rep
Resistencia a antibióticos					
AtNHX1	Antiporter vacuolar pBX1	Kan	Rif + Gen + Kan	Kan	GUS
AtNHX5	Antiporter pBX5	Kan	Rif + Gen + Kan	Kan	GUS
AtNHX1-5'UTR	Antiporter pB5UX1	Kan	Rif + Gen + Kan	Kan	GUS
pSB109-TPSP	Fusión genes TPSP Promotor ABA inducible	Spect	Rif + Gen + Kan	BASTA	
pSB-RTSP	Promotor rbcS Target cloroplasto	Spect	Rif + Gen + Kan	BASTA	
DCH	Glyoxilase I (<i>Brassica</i>) + Glyoxilase II (<i>Pennisetum</i>)	Kan	Rif + Gen + Kan	Higro	Fusión GFP+GUS
PgNHX1	Antiporter NHX	Kan	Rif + Gen + Kan	Higro	GUS
CBF3	CBF3 (DREB1A)	Kan	Rif + Gen + Kan	Kan	
GUS 1	<i>uidA</i>	Kan	Rif + Gen + Kan	Kan	GUS
BOR1	Boron transporter	Kan	Rif + Gen + Kan	Kan	
MYB60	Factor transcripción	Kan	Rif - Kan	Kan	
AVP1	Pyrofosfatasa vacuolar	Kan	Rif - Kan	Kan	

Blumwald

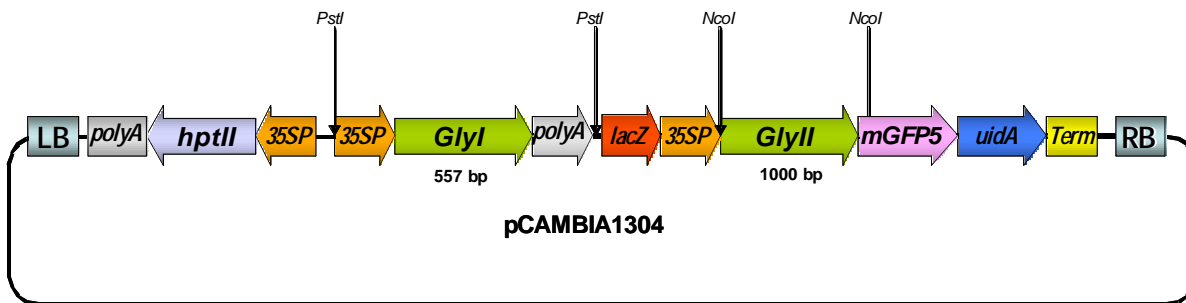
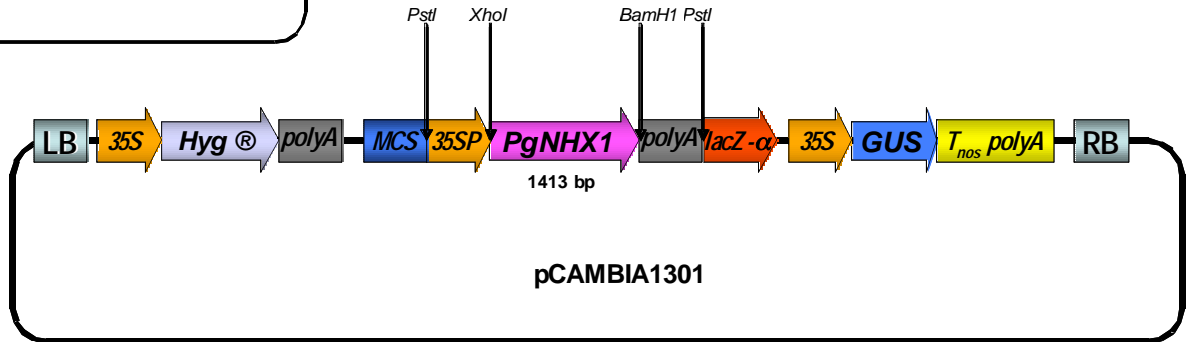
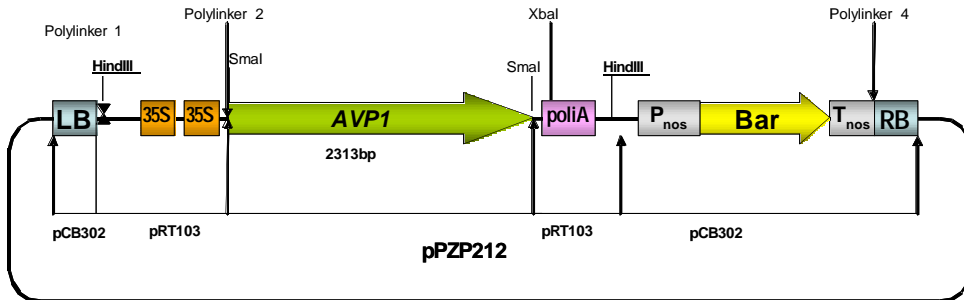
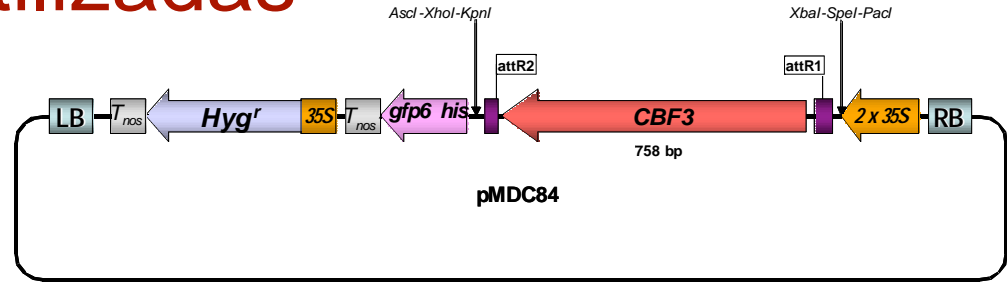
Dr. Wu

Dr. Sopory

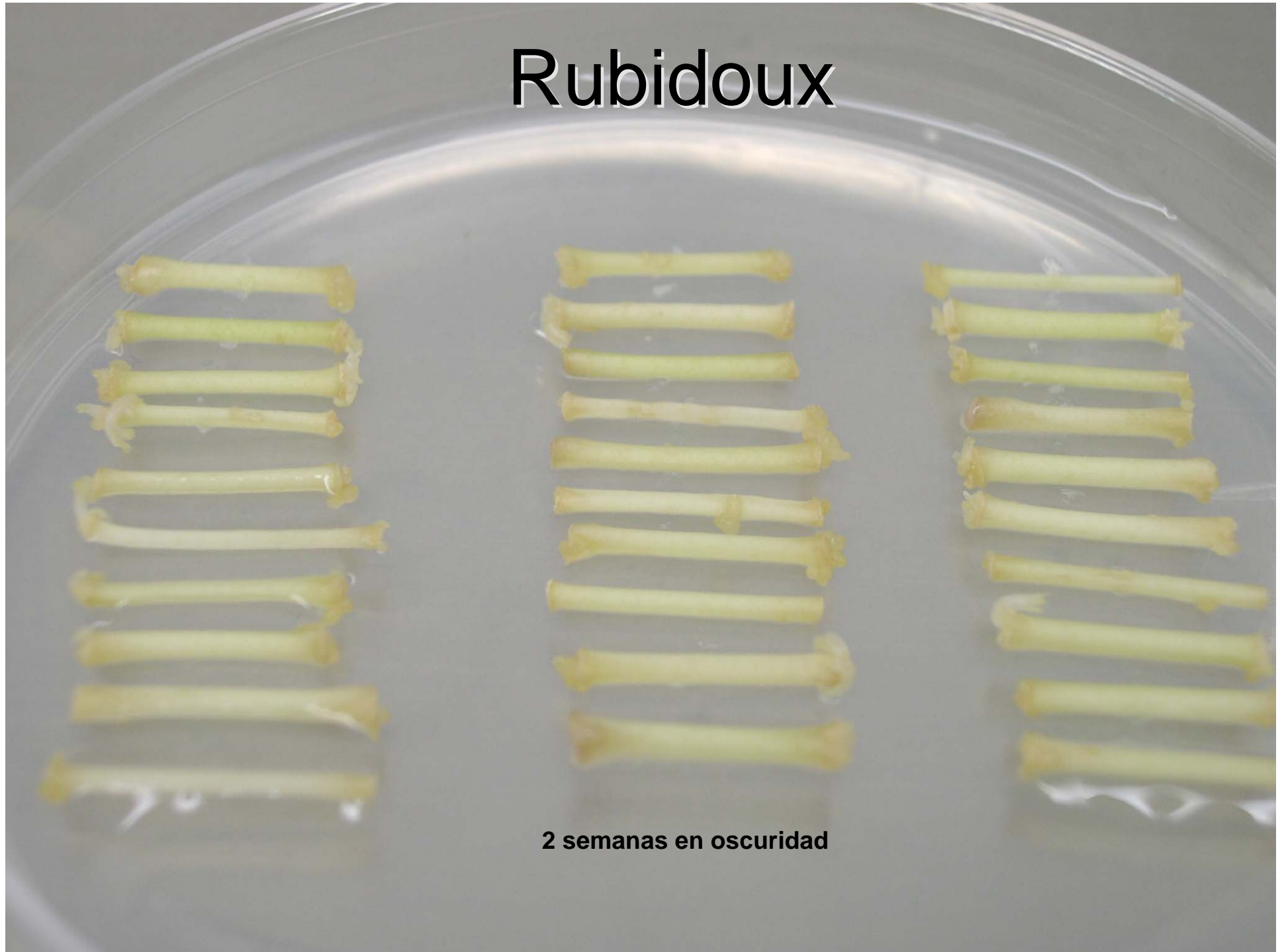
Dr. Arce

Dr. Gaxiola

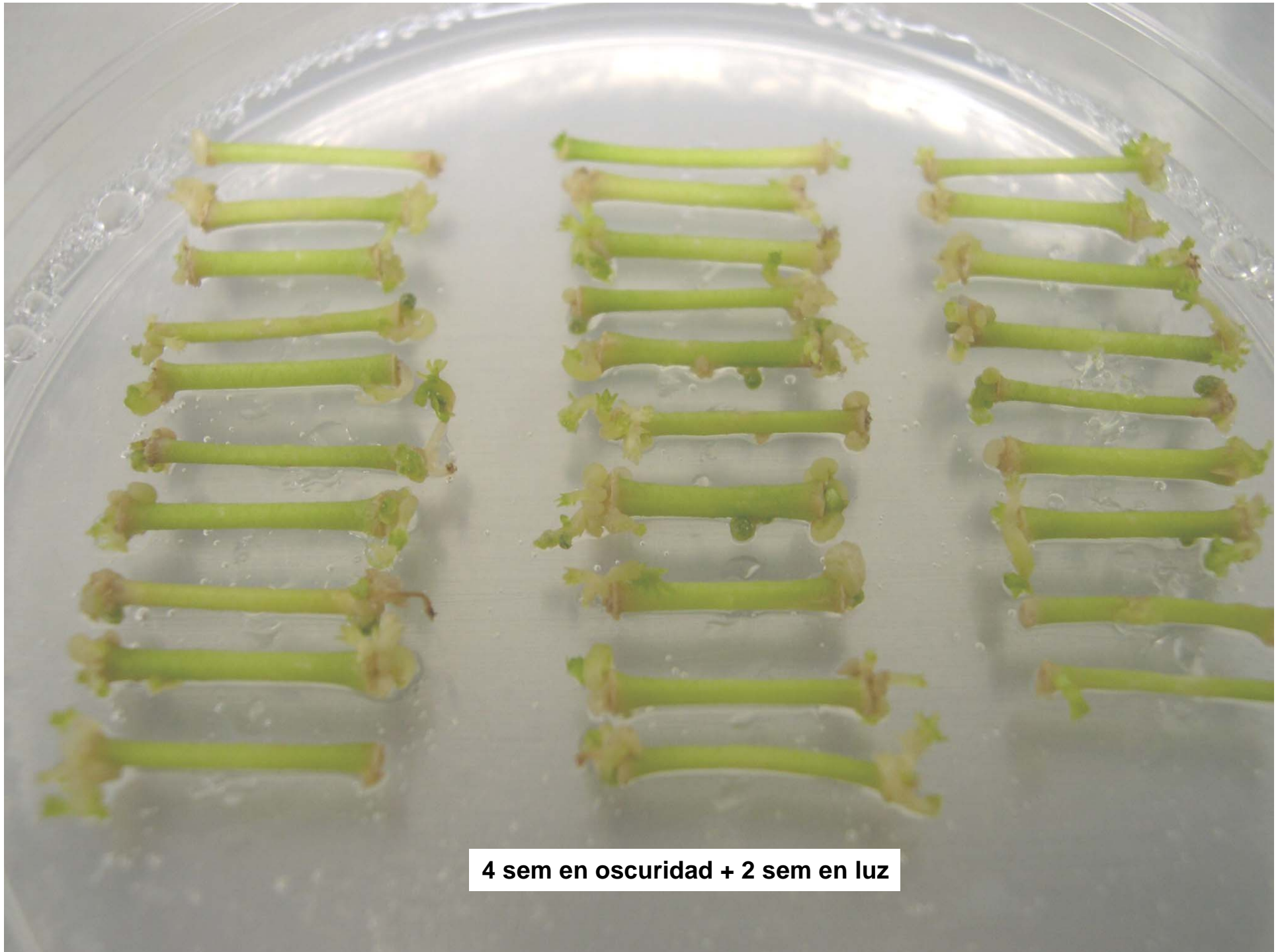
• Construcciones Utilizadas



Rubidoux

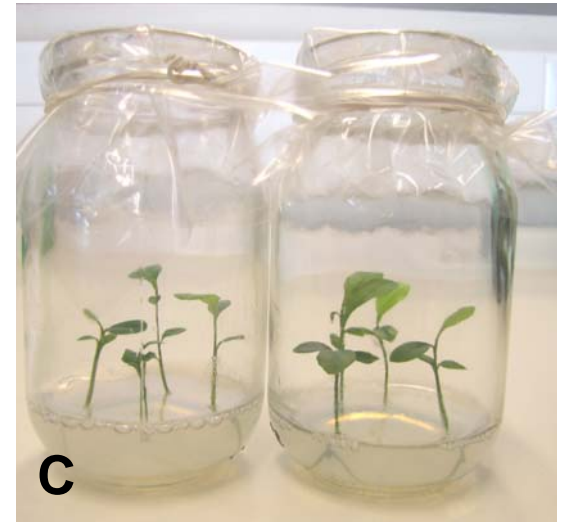
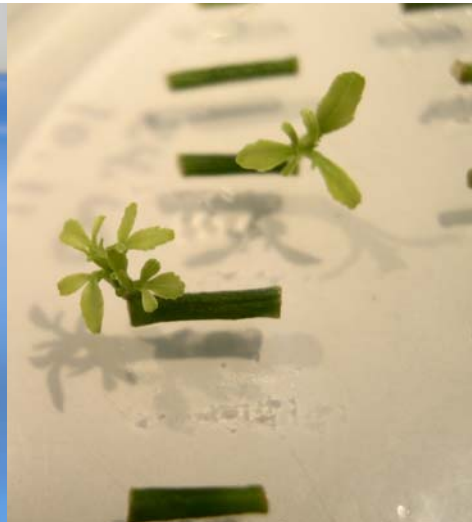
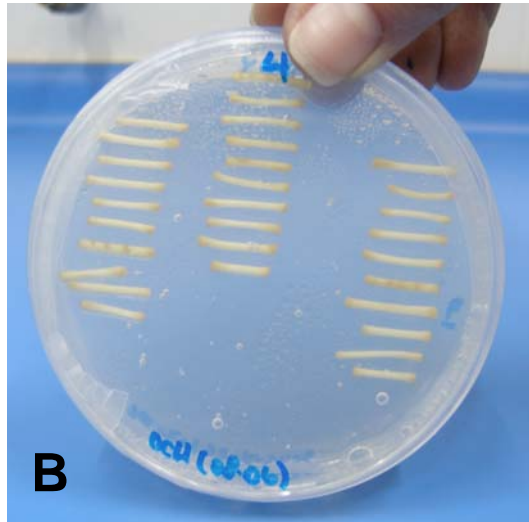


2 semanas en oscuridad

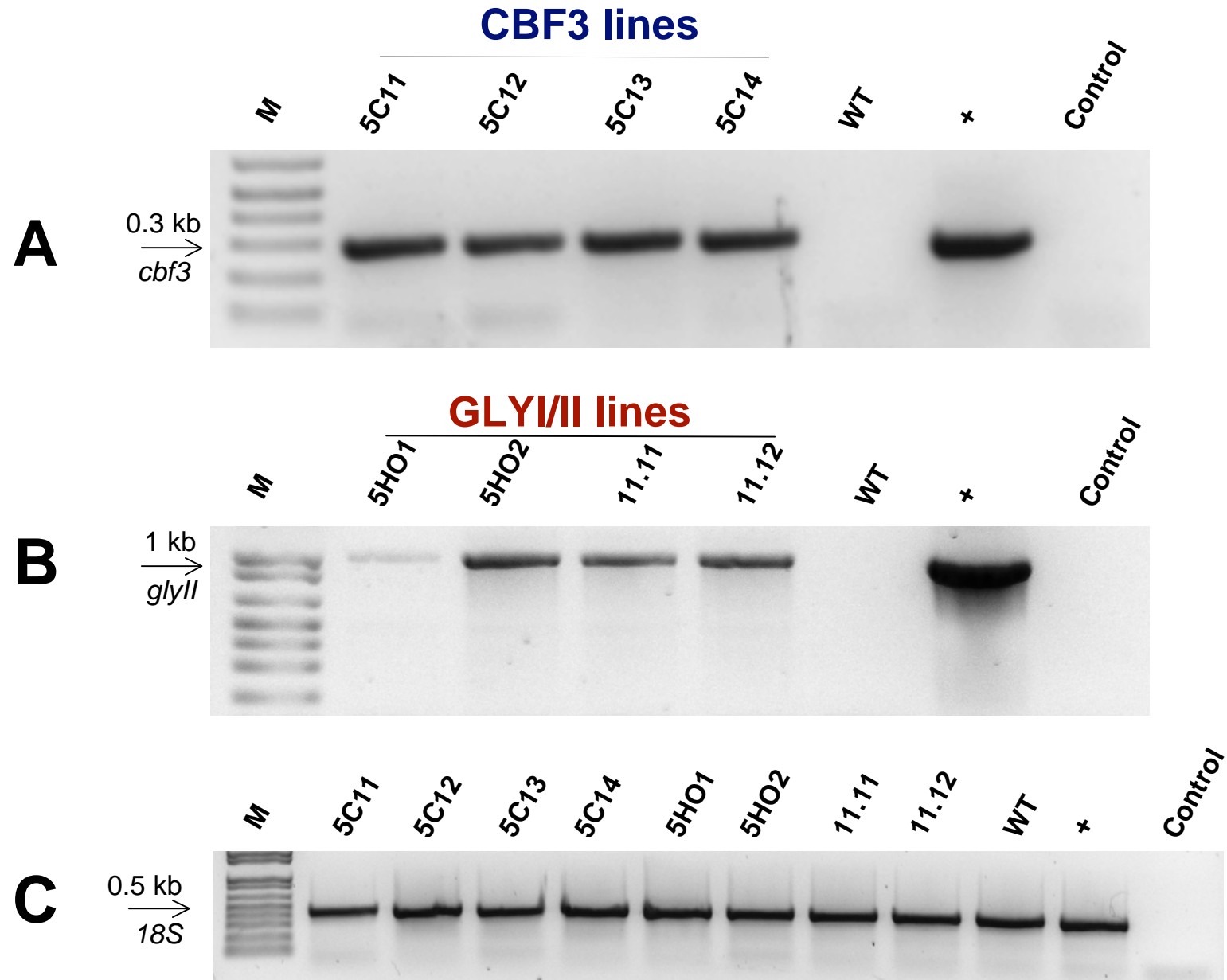


4 sem en oscuridad + 2 sem en luz

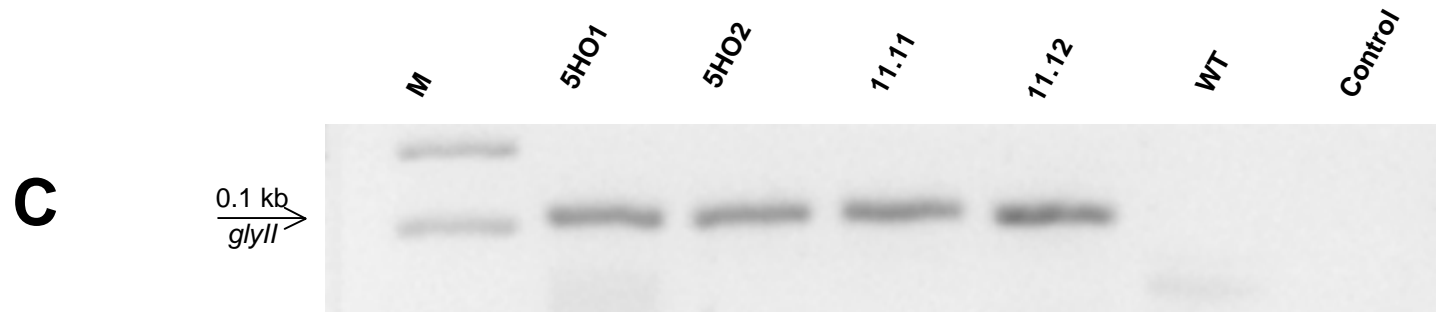
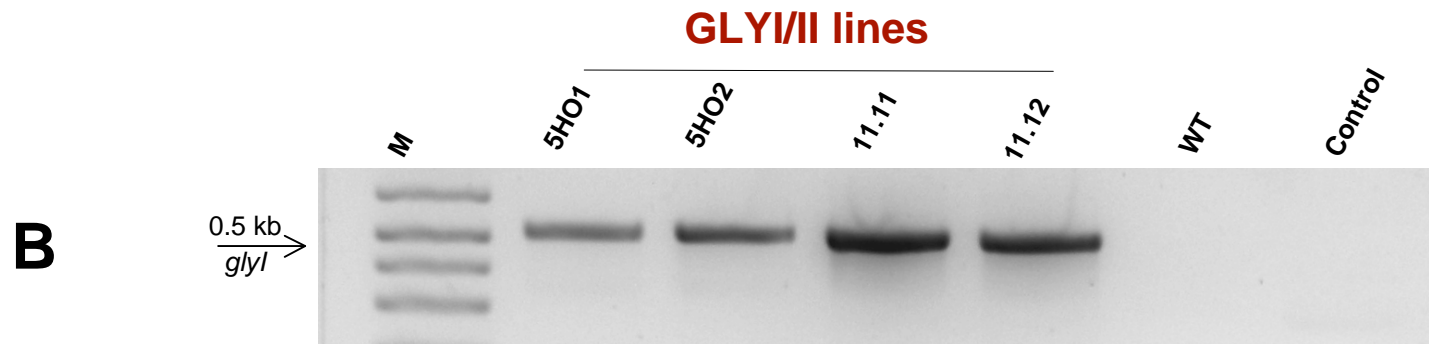
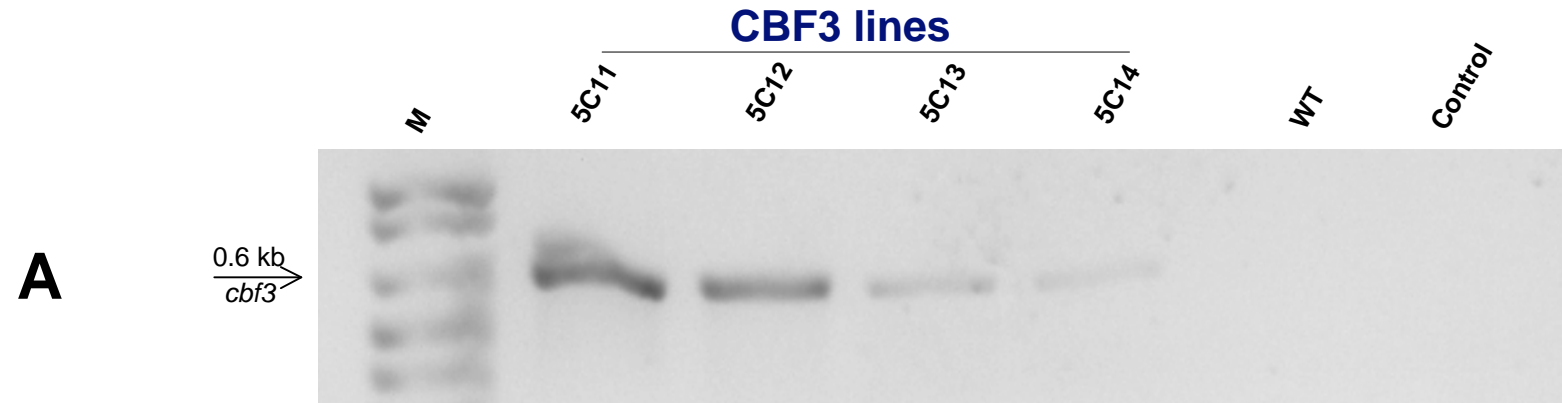
Procedimiento de Transformación Genética de Cítricos



Caracterización Molecular Mediante PCR



Caracterización Molecular Mediante RT-PCR



Porta Injertos Transgénicos Generados

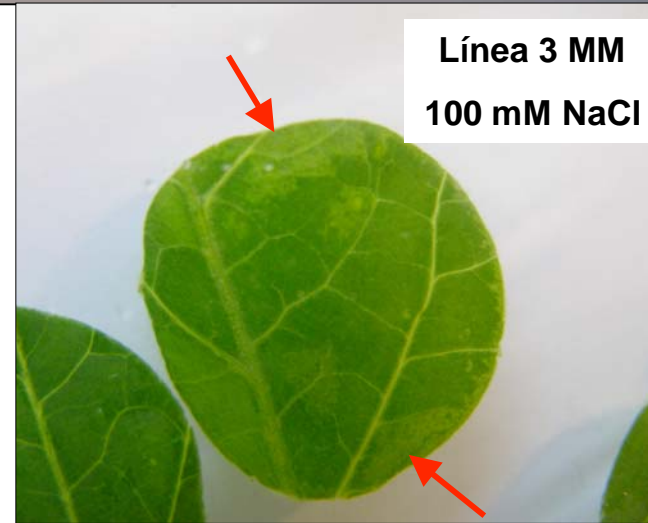
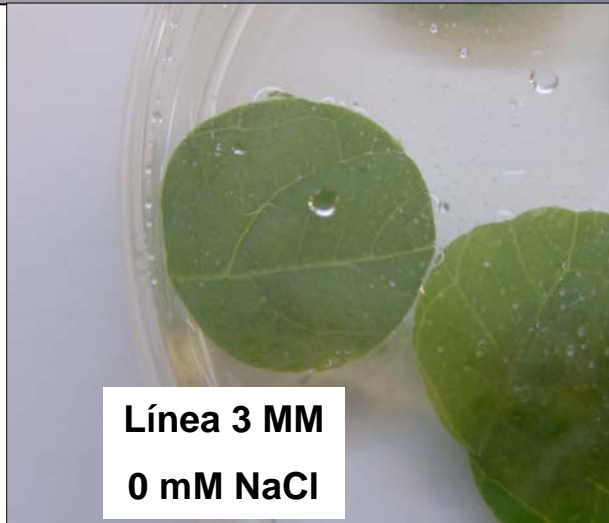
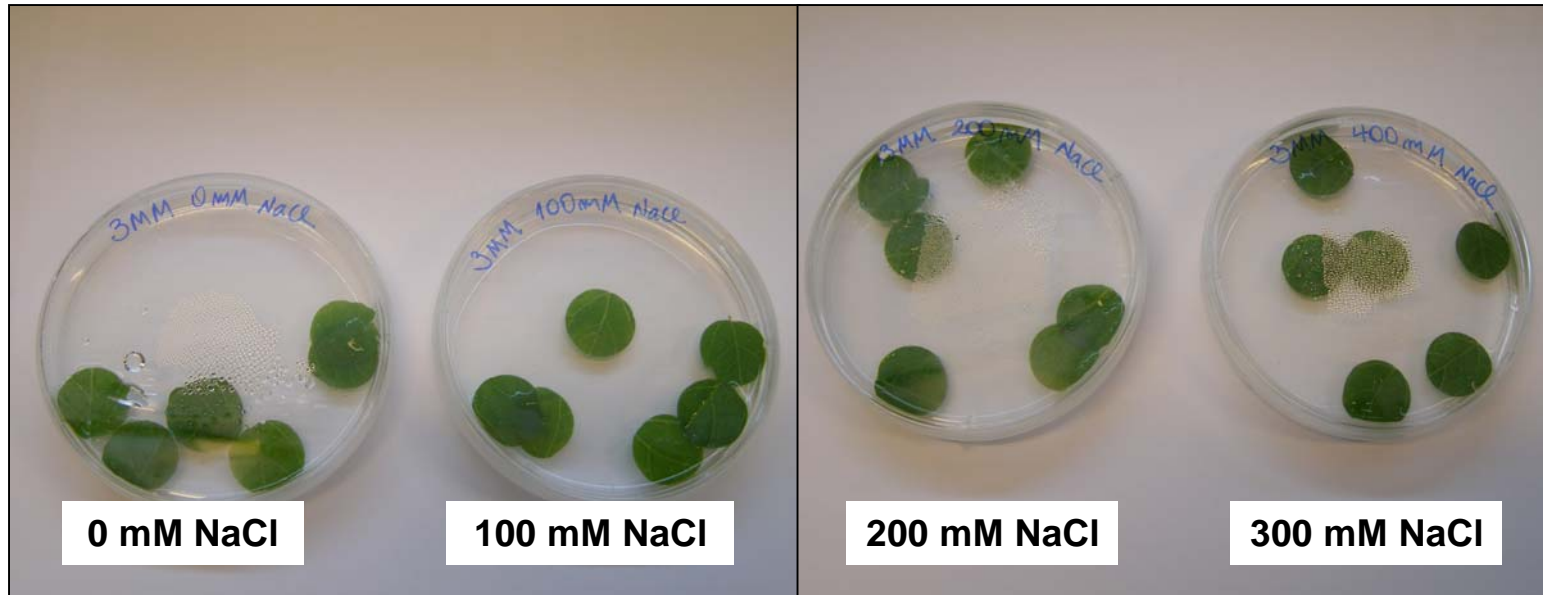
Patrón	C-35	Macrophylla	Carrizo	Rubidoux	Total
Gen					
AVP1	5	4	2		11
CBF3	5	2	21	9	37
DCH		1	5	2	8
PgNHX1			2	1	3
Total	10	7	30	12	59



Plantas Transgénicas en Maceta en Invernadero



Evaluación de Portainjertos Transformados



Selección y Evaluación de Portainjertos Transgénicos

<i>Constructions</i>	<i>Number of explants per transformation</i>	<i>Number of transformation events</i>	<i>Number of Higromycin-tolerant shoots per transformation</i>	<i>Number of PCR positive lines</i>	<i>Transformation efficiency (%)*</i>	<i>LINES used in this work</i>
CBF3	300 ± 10	5	50 ± 5	15	1	5C11B
						5C12B
						5C13B
						5C14D
GLYI/II	300 ± 15	8	42 ± 8	8	0.3	11.11
						11.11B
						5HO1A
						5HO1C

Clonación de Líneas Seleccionadas



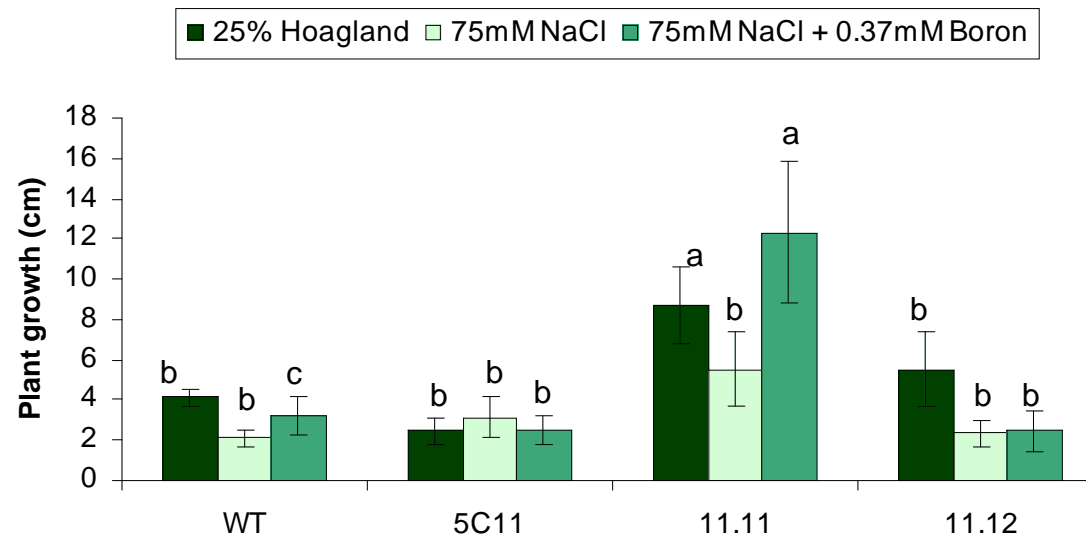
Evaluación de Tolerancia a la Salinidad en Líneas Seleccionadas

Tratamientos

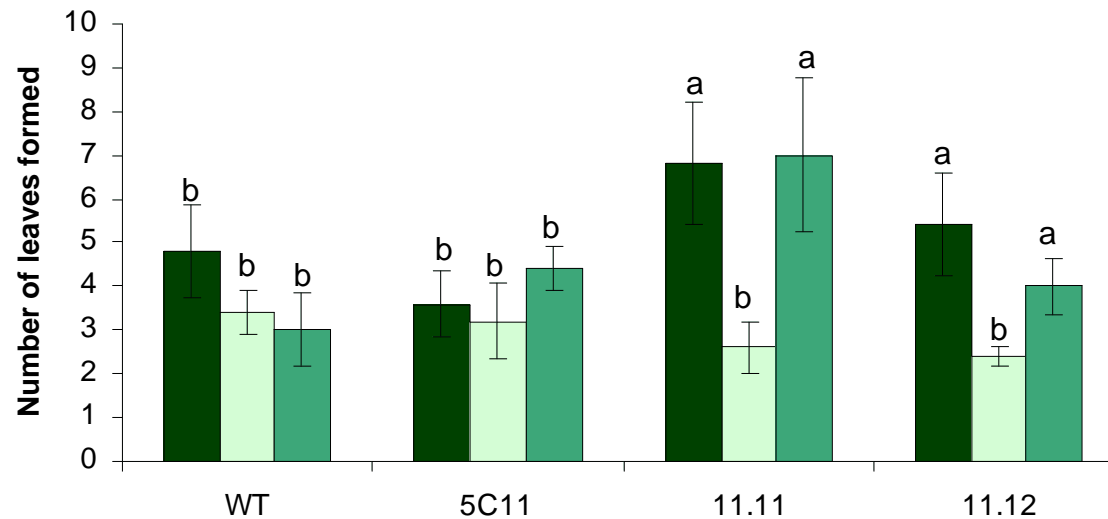
PLANTS	75mM NaCl Cl (mg/100g)		75mM NaCl + 0.37mM B Boron (mg/Kg)	
	SHOOT	ROOT	SHOOT	ROOT
WT	7.00±0.8	2.3±0.3	181.6±12.4	84.5±5.7
CBF3	5.2±0.5	2.8±0.4	180.4±7.2	91.6±10.2
GLYI/II	5.3±0.3	2.7±0.2	182.8±9.3	96.6±10.6

Evaluación de Tolerancia a la Salinidad en Líneas Seleccionadas

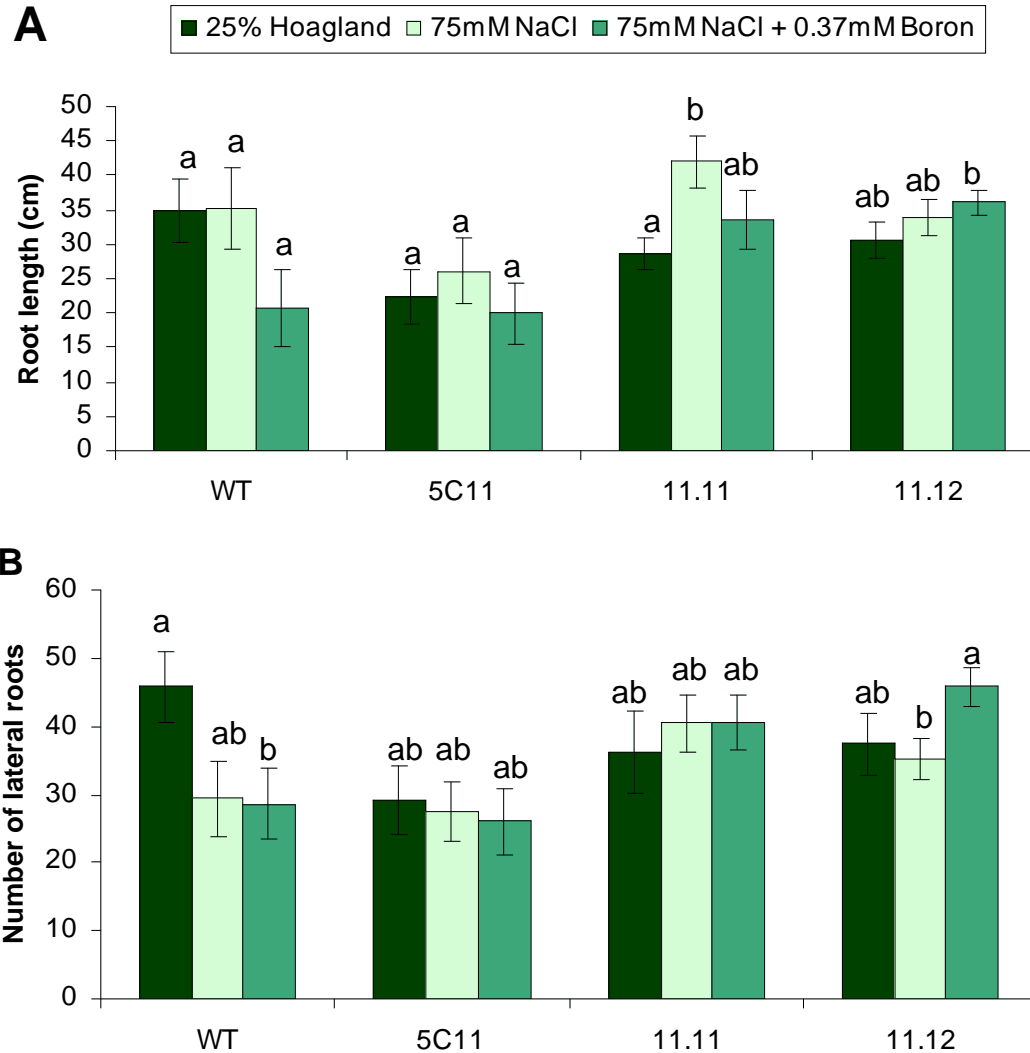
A



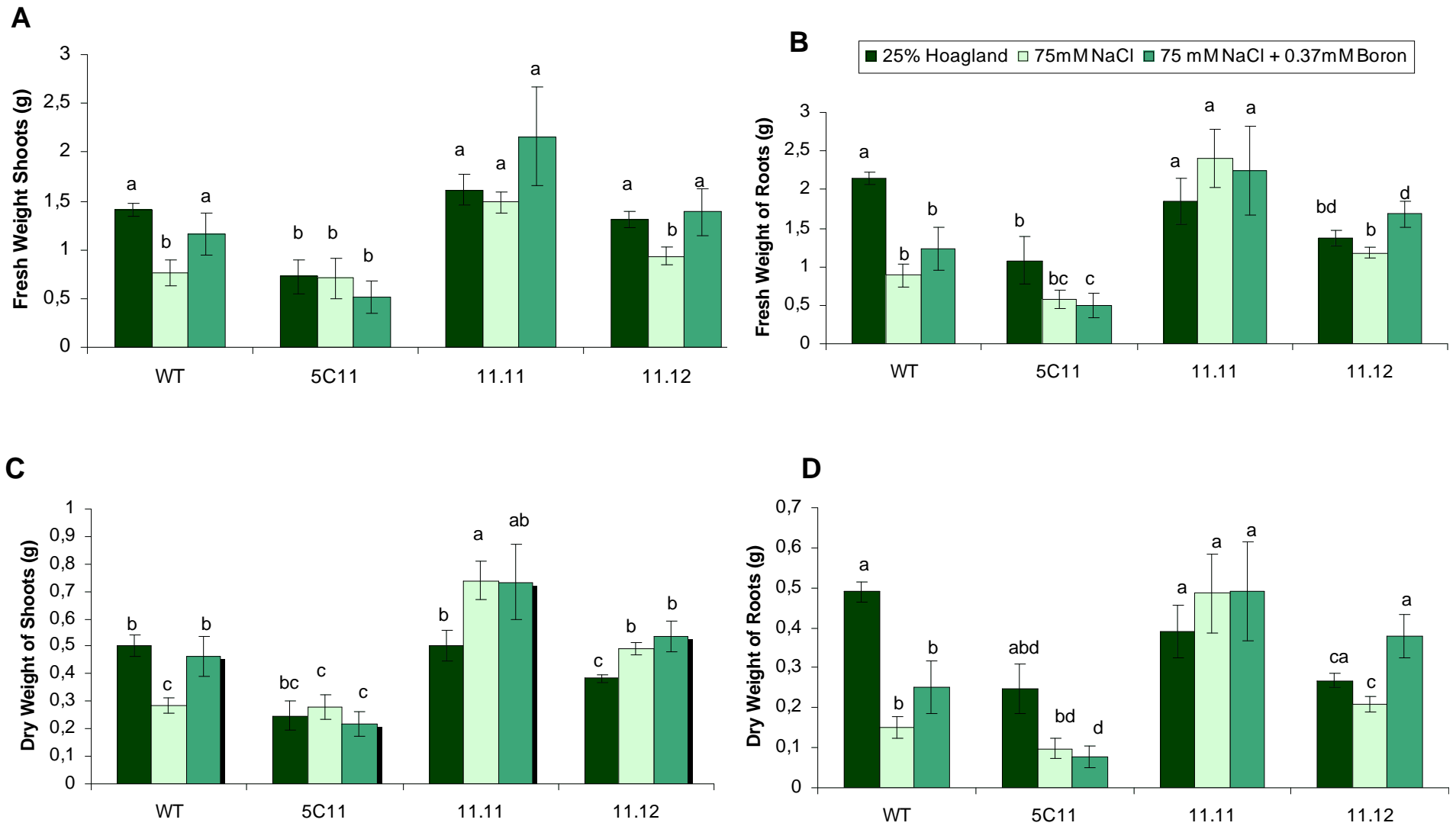
B



Evaluación de Tolerancia a la Salinidad en Líneas Seleccionadas



Evaluación de Tolerancia a la Salinidad en Líneas Seleccionadas



Salt treatment



Carrizo, 90 mM NaCl 0 d



Inicio del ensayo

Carrizo, 90 mM NaCl 35 d



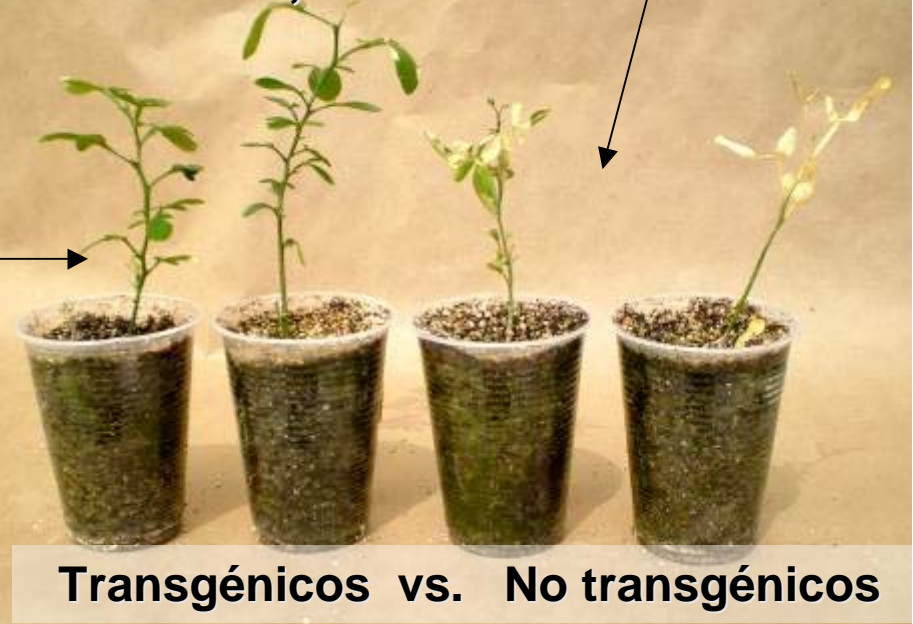
No transgénicos

Carrizo, 90 mM NaCl 35 d



Transgénicos

Carrizo, 90 mM NaCl 35 d



Transgénicos vs. No transgénicos

Transformación de Portainjertos de Cítricos para Incrementar la Tolerancia a la Salinidad



← Cultivar

← Portainjerto transgénico

AGRADECIMIENTOS



Paola Cañon



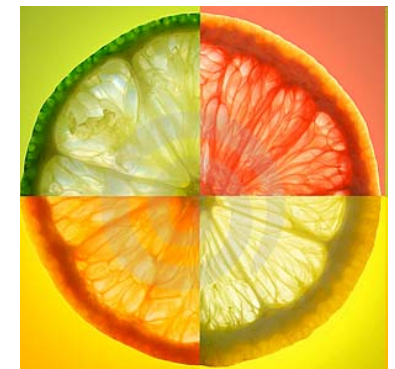
Rowena Cortés



Ximena Alvarez



Amparo Rodríguez



Problema de Salinidad en Chile

- Concentraciones de iones en Copiápo

Suelo (localidad)	pH	Conductividad eléctrica	Contenido en el extracto de saturación		
			Na⁺	Cl⁻	B
		(dS/m)	(mmol/l)	(mmol/l)	(mg/l)
Cerrillos	8,1	2,5	7,4	4,4	1,3
Pichincha	8,1	5,7	25,8	33,8	4,1
Chañar	8,0	6,7	29,3	25,7	4,1
Chamonate	8,2	10	60,3	66	2,5
Nantoco	8,2	9,5	61,5	69	27,1
Linderos	8,2	1	72,4	30,7	27,5
Apacheta	8,1	11,3	81,1	64,8	9,5
Rodeo	8,1	1,4	98,0	71,4	15,8
Toledo	8,1	16,2	138,9	89,3	20,5
E. De Bordos	8,2	19,1	149,5	119,4	8,6
Ramadilla	8,2	5,5	165,8	140,1	20,1