

Contenido

1. RESUMEN.....	10
2. ABSTRACT.....	12
3. MARCO TEÓRICO	14
3.1. Introducción.....	14
3.2. Problema de estudio	15
3.3. Metales pesados en el ambiente y relación con las plantas.....	16
3.4. Ventajas y limitaciones de la fitorremediación.....	17
3.5. Mecanismos de tolerancia al cobre	18
3.6. Proteínas inhibidoras de proteasas, su importancia en las plantas y la interacción con metales pesados	19
3.7. Gen <i>PdKTI3</i> y su importancia en <i>Populus deltoides</i>	20
3.8. Transformación genética de plantas	23
3.9. <i>Arabidopsis thaliana</i> y método de inmersión floral para transformación	23
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	25
5.1. Objetivo general	25
5.2. Objetivos específicos	25
6. METODOLOGÍA:	26
6.1. Material vegetal y tratamiento.	26
6.2. Aislación de gen <i>PdKTI3</i> de Álamo.....	26
6.3. Obtención de vector de expresión y transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
6.3.1 Obtención del vector de expresión.	27
6.3.2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28

6.4. Generación de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgénica y evaluación de la presencia de gen <i>PdKTI3</i>	28
7. RESULTADOS	30
7.1. Producción de plantas de <i>A. thaliana</i>	30
7.2. Obtención del gen <i>PdKTI3</i> de Álamo.	31
7.3. Producción del vector de expresión y transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
7.3.1. Producción del vector de expresión.....	32
7.3.2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
7.4. Generación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgénicas y evaluación de la presencia del gen <i>PdKTI3</i>	38
7.4.1. Generación de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgénicas.....	38
7.4.2. Evaluación de presencia de gen <i>PdKTI3</i>	40
8. DISCUSIÓN.....	42
8.1. Producción de plantas para realizar la transformación genética	42
8.2. Elaboración del vector de expresión para la transformación.....	42
8.3. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
8.4. Evaluación de presencia del gen <i>PdKTI3</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgénicas.....	44
8.5. Importancia del estudio, resultados obtenidos y proyecciones futuras	45
9. CONCLUSIÓN.....	46
10. REFERENCIAS	47
11. ANEXOS	50
11.1. Anexo 1: Análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	51
11.1.1. Partidores	51

11.1.2.	Programas de amplificación	52
	Mix 1 (36 ciclos).....	52
	Programa 1	52
	Mix 2 (25 ciclos).....	53
	Programa 2.....	54
	Mix 3 (30 ciclos).....	54
	Programa 3.....	55
11.1.2.1.	Diseño de partidores para la amplificación de un gen específico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
11.2.	Anexo 2: Protocolo de aislación de ADN desde gel de agarosa	58
11.3.	Anexo 3: Preparación del vector de expresión I. Ligación de vector de entrada (pENTR) con el gen <i>PdKTI3</i>	60
11.4.	Anexo 4: Preparación del vector de expresión II. Ligación de vectores pENTR- <i>PdKTI3</i> con <i>pK7WGF2</i>	61
11.5.	Anexo 5: Extracción de ADN plasmidial desde bacterias	62
11.6.	Anexo 6: Digestión de ADN con enzimas de restricción	64
11.7.	Anexo 7: Extracción de ADN desde tejidos vegetales con el sistema DNeasy plant mini kit	65
11.8.	Anexo 8: Preparación células quimio competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
11.9.	Anexo 9: Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	68
11.10.	Anexo 10: Preparación de medios.....	69
11.11.	Anexo 11: Protocolo de transformación de <i>A. thaliana</i> por inmersión floral	72
11.12.	Anexo 12: Protocolo de esterilización de semillas (obtenidas de plantas transformadas).....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia.....	30
Figura 2. Fragmento de amplificación correspondiente al gen <i>PdKTI3</i> obtenido desde ADN de álamo mediante PCR.....	31
Figura 3. Colonias de <i>E. coli</i> cepa <i>suirval</i> crecidas sobre medio de selección.	32
Figura 4. Fragmento correspondiente al gen <i>PdKTI3</i> amplificado desde vector completo extraído de <i>E. coli suirval</i>	33
Figura 5. Fragmento de amplificación correspondiente al promotor del gen CaMV 35S desde vector completo extraído desde <i>E. coli</i> <i>Suirval</i> . p).	34
Figura 6. Colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformadas.	35
Figura 7. Fragmento de amplificación correspondiente al gen <i>PdKTI3</i> desde vector completo extraído desde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformadas.	36
Figura 8. Fragmento correspondiente al promotor del gen CaMV 35S, amplificado desde ADN proveniente de transformantes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
Figura 9. Procedimiento de inmersión floral en <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
Figura 10. Plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en placas con medio MS, con antibióticos para selección de transgénicas..	39
Figura 11. Fragmento de amplificación correspondiente al gen <i>PdKTI3</i> extraído desde plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas.	40
Figura 12. Fragmento de amplificación correspondiente al gen <i>AtBZIP53CS</i> extraído desde plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas.	41
Figura 13. Programa de PCR de 36 ciclos.	53
Figura 14. Programa de PCR de 25 ciclos.	54
Figura 15. Programa de PCR de 30 ciclos.	56
Figura 16. Resultado de diseño de partidores <i>AtbZIP53CS</i> con primer3.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Expresión de genes en <i>Populus</i> sometidos a estrés por cobre.	21
Tabla 2. Partidores utilizados.	51
Tabla 3. Reactivos utilizados para PCR de 36 ciclos.	52
Tabla 4. Reactivos utilizados para preparar medio LB.	69
Tabla 5. Reactivos utilizados para preparar medio YEB.	69
Tabla 6. Reactivos utilizados para preparar medio de infiltración.	70
Tabla 7: Reactivos utilizados para preparar medio MS.	71