

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	2
1.2 Objetivo general	2
1.2.1 Objetivos específicos	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Importancia del arroz en el mundo y en Chile.....	3
2.2 Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	4
2.3 Estrés por salinidad.....	5
2.4 Proteínas ricas en glicina (GRPs)	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1 Material biológico	11
3.1.1 Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	11
3.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
3.1.3 <i>Escherichia coli</i>	11
3.1.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
3.1.5 Vectores de clonación y transformación	11
3.2 Medios de cultivo.....	13
3.2.3 Antibióticos para selección en bacterias y plantas	13
3.3 Condiciones de crecimiento de arroz.....	14
3.4 Ensayos <i>in vitro</i> y en invernadero de <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
3.4.1 Transformación estable de <i>A. thaliana</i> mediante <i>A. tumefaciens</i>	14
3.4.2 Selección de líneas transgénicas y obtención de homocigotos.....	15
3.4.3 Análisis fenotípico	16
3.5 Manipulación y crecimiento de <i>E. coli</i>	16
3.5.1 Transformación de células competentes	16
3.6 Manipulación y crecimiento de <i>A. tumefaciens</i>	16
3.6.1 Transformación de células competentes	17
3.7 Purificación, manipulación y análisis de ácidos nucleicos	17
3.7.1 Aislamiento de ADN plasmidial de <i>E. coli</i>	17
3.7.2 Aislamiento de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i>	17
3.7.3 Tratamiento de ADN con endonucleasas de restricción	18
3.7.4 Reacciones de ligación de ADN.....	18

3.7.5 Electroforesis de ADN	18
3.7.6 Purificación de fragmentos de ADN	18
3.7.7 Aislamiento de ARN de arroz	19
3.7.8 Aislamiento de ARN de Arabidopsis	19
3.7.9 Electroforesis de ARN	19
3.7.10 Síntesis de <i>ADNc</i>	19
3.7.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
3.7.11.1 Oligonucleótidos partidores	20
3.7.11.2 PCR convencional	21
3.7.11.3 PCR en tiempo real	22
3.7.12 Secuenciación y análisis de secuencias	22
3.8 Herramientas de análisis bioinformático	22
3.9 Diseño experimental	23
3.10 Análisis estadístico	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Identificación y características del gen <i>OsGRPP</i> (Os07g0511100)	24
4.2 Estudio filogenético de <i>OsGRPP</i>	27
4.3 Perfil de expresión del gen <i>OsGRPP</i> en arroz	31
4.4 Clonación de <i>OsGRPP</i>	32
4.5 Obtención y selección de plantas transgénicas	33
4.6 Estrés por salinidad	34
4.7 Análisis fenotípico del estado vegetativo en plantas silvestres y líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	37
5. DISCUSIÓN	43
6. CONCLUSIONES	46
7. BIBLIOGRAFÍA	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la clasificación GRPs en plantas.....	10
Figura 2. Esquema de los vectores utilizados para clonación y transformación de <i>A. thaliana</i>	12
Figura 3. Construcción génica portadora del T-ADN.....	15
Figura 4. Secuencia nucleotídica del gen <i>OsGRPP</i>	26
Figura 5. Relación filogenética entre las GRPs en diversas especies.....	28
Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas correspondientes al grupo I de las GRPs.....	30
Figura 7. Expresión tejido-específica del gen <i>OsGRPP</i> en arroz.....	32
Figura 8. Electroforesis de producto de PCR para identificación de líneas transgénicas T1.....	33
Figura 9. Expresión ectópica de <i>OsGRPP</i> en líneas de <i>A. thaliana</i> transgénicas.....	34
Figura 10. Número de hojas de la roseta.....	35
Figura 11. Área de la roseta.....	36
Figura 12. Diámetro de la roseta.....	37
Figura 13. Peso seco de plantas a los 27 días.....	39
Figura 14. Desarrollo de las líneas transgénicas y plantas silvestres.....	40
Figura 15. Largo de raíz.....	40
Figura 16. Peso fresco.....	41
Figura 17. Plantas sometidas a estrés salino.....	42

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencias nucleotídicas de partidores empleados en qRT-PCR y PCR convencional.....	21
Cuadro 2. Genes inducidos en plantas de arroz que sobreexpresan <i>HvASR5</i>.....	25

