

## INDICE TEMATICO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>Efectos de las bajas temperaturas en los vegetales</b>	<b>2</b>
<b>Estrés por bajas temperaturas y alta intensidad lumínica</b>	<b>3</b>
<b>Tolerancia al frío en plantas en condiciones de alta intensidad lumínica</b>	<b>4</b>
<b>a) Mecanismos de prevención</b>	<b>5</b>
<b>b) Mecanismos de disipación de energía</b>	<b>5</b>
<b>c) Mecanismos antioxidantes</b>	<b>6</b>
<b>Ciclo de las xantofilas</b>	<b>6</b>
<b>Proteínas de los complejos antena: superfamilia de genes LHC</b>	<b>7</b>
<b>Respuesta a estrés y expresión diferencial de genes que codifican para proteínas LHC</b>	<b>8</b>
<b>Tomate como fuente de genes de tolerancia al estrés fotooxidativo</b>	<b>9</b>
<b>Hipótesis de trabajo</b>	<b>11</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>11</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>11</b>
<b>I. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
<b>Materiales</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Reactivos y Enzimas</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Material Vegetal</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Cepas bacterianas y vectores</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Oligonucleótidos</b>	<b>15</b>
<b>Métodos</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Identificación y aislamiento de los genes de interés</b>	<b>16</b>
<b>2.1.1 Diseño de partidores</b>	<b>16</b>
<b>2.1.2 Condiciones de crecimiento y ensayos de baja temperatura y alta intensidad lumínica</b>	<b>16</b>
<b>2.1.3 Extracción de ácido ribonucleico (ARN) total</b>	<b>17</b>
<b>2.1.4 Transcripción reversa y síntesis de ADN complementario (ADNc)</b>	<b>17</b>
<b>2.1.5 Aislamiento de genes mediante PCR “gen específico”</b>	<b>17</b>
<b>2.1.6 Clonamiento y secuenciación de genes aislados</b>	<b>18</b>

<b>2.2 Evaluación de parámetros fisiológicos en plantas expuestas a las condiciones experimentales ensayadas</b>	<b>18</b>
2.2.1 Análisis del ciclo de las xantofilas	18
2.2.2 Análisis de los parámetros de fluorescencia	19
2.2.3 Determinación de peroxidación lipídica	20
<b>2.3 Análisis transcripcional de los genes de interés</b>	<b>20</b>
2.3.1 PCR cuantitativa en tiempo real	20
<b>2.4 Obtención de ADNc de largo total</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Obtención de plantas transformadas mediante ingeniería genética</b>	<b>21</b>
2.5.1 Protocolos de cultivo in vitro	21
2.5.2 Diseño de vectores de expresión	22
2.5.3 Transformación de plantas mediada por <i>A. tumefaciens</i>	22
<b>2.6 Evaluación de plantas transgénicas</b>	<b>23</b>
2.6.1 Análisis de inserción de T-ADN en las plantas transformadas	23
2.6.2 Análisis de expresión en las plantas transformadas	23
<b>III. RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>1 Evaluación fisiológica de plantas de <i>Solanum chilense</i> sometidas a estrés por bajas temperaturas y alta intensidad lumínica</b>	<b>26</b>
a) Efectos sobre la eficiencia fotosintética	26
b) Efecto sobre el ciclo de las xantofilas	28
c) Efecto sobre la peroxidación de lípidos	29
<b>2.2 Expresión de genes <i>LHC</i> y su relación con la tolerancia al estrés foto-oxidativo en las especies <i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Solanum chilense</i></b>	<b>30</b>
3.2.1 Identificación y aislamiento de genes <i>LHC</i>	30
a) Identificación del gen que codifica para una proteína ELIP de <i>Solanum chilense</i>	30
b) Identificación del gen que codifica para la proteína PsbS de <i>Solanum chilense</i>	31
c) Identificación del gen que codifica para la proteína Lhca1 de <i>Solanum chilense</i>	33
3.2.2 Análisis de la expresión génica de los genes <i>LHC</i> identificados	35
<b>3.3 Sobreexpresión del gen <i>Lhca1</i> en plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> y su relación con la tolerancia al estrés foto-oxidativo</b>	<b>36</b>
3.3.1 Obtención de la secuencia codificante completa del gen <i>Lhca1</i> de <i>Solanum chilense</i>	36
3.3.2 Construcción del vector binario portando el gen quimérico 35S::Lhca1	38
3.3.3 Transformación genética y regeneración de <i>Solanum lycopersicum</i> variedad MoneyMaker mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
3.3.4 Confirmación de la integración del transgen en las putativas líneas transgénicas	43
3.3.5 Verificación de la expresión del transgen en la línea transgénica obtenida	44
3.3.6 Efecto de la sobreexpresión del gen <i>Lhca1</i> en la respuesta al estrés fotooxidativo	45

a) Efecto sobre la eficiencia fotosintética	45
b) Efecto sobre el ciclo de las xantofilas	47
c) Efecto sobre la peroxidación de lípidos	48
<b>4. Sobreexpresión del gen <i>Lhca1</i> en plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> y su relación con la tolerancia al estrés fotooxidativo</b>	<b>49</b>
3.4.1 Transformación genética y regeneración de <i>Nicotiana tabacum</i> var Xhanti mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
3.4.2 Confirmación de la expresión del transgen en las putativas líneas transgénicas	51
3.4.3 Efecto de la sobreexpresión del gen <i>Lhca1</i> en la respuesta al estrés fotooxidativo	52
a) Efecto sobre la eficiencia fotosintética	53
b) Efecto sobre el ciclo de las xantofilas	54
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>67</b>

## INDICE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Cambios en la eficiencia fotoquímica efectiva del PSII ( $\Phi$ PSII) en hojas de <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. chilense</i> durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$	27
<b>Figura 3.2.</b> Cambios en los parámetros de fluorescencia en hojas de <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. chilense</i> durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$	28
<b>Figura 3.3.</b> Variaciones en el contenido de pigmentos del ciclo de las xantófilas durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$ en <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. chilense</i>	29
<b>Figura 3.4.</b> Variación en el contenido de malondialdehído (MDA) en hojas de <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. chilense</i> durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$	30
<b>Figura 3.5.</b> Identificación del gen que codifica para una proteína ELIP de <i>S. chilense</i>	31
<b>Figura 3.6.</b> Comparación de la secuencia aminoacídica perteneciente a la putativa proteína OHP aislada desde <i>S. chilense</i> y <i>S. lycopersicum</i> con las secuencias disponibles en bases de datos	31
<b>Figura 3.7.</b> Identificación del gen que codifica para la proteína PsbS de <i>S. chilense</i>	32
<b>Figura 3.8.</b> Comparación de la secuencia nucleotídica del gen <i>PsbS</i> aislada de <i>S. chilense</i> y de la secuencia del gen <i>PsbS</i> de <i>S. lycopersicum</i> disponible en base de datos	33
<b>Figura 3.9.</b> Identificación del gen que codifica para la proteína Lhca1 de <i>S. chilense</i>	34
<b>Figura 3.10.</b> Comparación de la secuencia nucleotídica del gen <i>Lhca1</i> aislada de <i>S. chilense</i> y de la secuencia del gen <i>Lhca1</i> de <i>S. lycopersicum</i> disponible en base de datos	34
<b>Figura 3.11.</b> Análisis de la expresión de los genes <i>PsbS</i> , <i>ELIP</i> y <i>Lhca1</i> en hojas de <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. chilense</i> durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$	36
<b>Figura 3.12.</b> Obtención de la secuencia codificante completa del gen <i>Lhca1</i> de <i>S. chilense</i>	37
<b>Figura 3.13.</b> Comparación de la secuencia codificante completa del gen <i>Lhca1</i> de <i>S. chilense</i> y de la secuencia del gen <i>Lhca1</i> de <i>S. lycopersicum</i> disponible en base de datos	38
<b>Figura 3.14.</b> Oligonucleótidos con secuencias adaptadoras que permitieron recrear los sitios de restricción de las enzimas BamH1 y Sst1	39
<b>Figura 3.15.</b> Evaluación de la presencia de la región codificante del gen <i>Lhca1</i> en el vector pBluescript II KS <sup>+</sup>	40
<b>Figura 3.16.</b> Construcción del vector binario portando el gen quimérico 35S::Lhca1	41
<b>Figura 3.17.</b> Evaluación de la presencia de la región codificante del gen <i>Lhca1</i> en vectores recombinantes pBI121	42
<b>Figura 3.18.</b> Transformación y regeneración de <i>S. lycopersicum</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	43
<b>Figura 3.19.</b> Análisis de la inserción de T-ADN en las plantas transformadas	44
<b>Figura 3.20.</b> Reacción de PCR sobre ADNg de <i>S. lycopersicum</i> WT y de siete putativas líneas transgénicas	44
<b>Figura 3.21.</b> Análisis de la expresión del gen <i>Lhca1</i> mediante hibridación Northern en plantas de <i>S. lycopersicum</i> WT y la línea L3 de <i>S. lycopersicum</i> transformada con la construcción 35S::Lhca1	45
<b>Figura 3.22.</b> Cambios en la eficiencia fotoquímica efectiva del PSII ( $\Phi$ PSII) en <i>S. lycopersicum</i> WT y en la línea L3 de plantas transformadas con la construcción 35S::Lhca1 durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$	46

<b>Figura 3.23.</b> Cambios en los parámetros de fluorescencia en <i>S. lycopersicum</i> WT y en la línea L3 de plantas transformadas con la construcción 35S::Lhca1 durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$	<b>47</b>
<b>Figura 3.24.</b> Variaciones en el contenido de pigmentos del ciclo de las xantófilas durante iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$ en <i>S. lycopersicum</i> WT y en la línea L3 de plantas transformadas con la construcción 35S::Lhca1	<b>48</b>
<b>Figura 3.25.</b> Variación en el contenido de malondialdehído (MDA) en hojas de <i>S. lycopersicum</i> WT y en la línea L3 de plantas transformadas con la construcción 35S::Lhca1 durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$	<b>49</b>
<b>Figura 3.26.</b> Transformación de <i>N. tabacum</i> var Xhanti mediada por <i>A. tumefaciens</i>	<b>50</b>
<b>Figura 3.27.</b> Análisis de la inserción de T-ADN en las plantas transformadas	<b>51</b>
<b>Figura 3.28.</b> Reacción de PCR sobre ADNg de <i>N. tabacum</i> var Xhanti y de cinco putativas líneas transgénicas	<b>51</b>
<b>Figura 3.29.</b> Variación en el contenido de malondialdehído (MDA) en hojas de <i>N. tabacum</i> y en las líneas transformadas de <i>N. tabacum</i> con la construcción 35S::Lhca1 durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$	<b>52</b>
<b>Figura 3.30.</b> Cambios en la eficiencia fotoquímica del PSII ( $\Phi\text{PSII}$ ) en <i>N. tabacum</i> WT y en las líneas L1 y L4 de plantas transformadas de <i>N. tabacum</i> con la construcción 35S::Lhca1 durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$	<b>53</b>
<b>Figura 3.31.</b> Cambios en los parámetros de fluorescencia en <i>N. tabacum</i> WT y en las líneas L1 y L4 de plantas transformadas de <i>N. tabacum</i> con la construcción 35S::Lhca1 durante la iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$	<b>54</b>
<b>Figura 3.32.</b> Variaciones en el contenido de pigmentos del ciclo de las xantófilas durante iluminación con $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $4^\circ \text{C}$ en <i>N. tabacum</i> WT y en las líneas L1 y L4 de plantas transformadas de <i>N. tabacum</i> con la construcción 35S::Lhca1	<b>55</b>

## INDICE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos utilizados en la identificación y en el aislamiento de genes	<b>15</b>
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos con adaptadores utilizados para la introducción de la región codificante del gen <i>Lhca1</i> en el vector binario pBI121	<b>15</b>
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de los transcritos de los genes de interés mediante PCR en tiempo real	<b>16</b>
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos utilizados para la verificación de inserción de T-ADN y la normalización de señales de hibridación	<b>16</b>