

INDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIACIONES	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
I INTRODUCCIÓN	14
I.1 Generalidades sobre el estrés abiótico.	15
I.2 Papel del ácido abscísico en condiciones de estrés.	16
I.3 Genes de respuesta a estrés abiótico.	16
I.3.1 Proteínas ASR.	17
I.3.1.1 Genes <i>ASR</i> en plantas superiores.	18
I.3.1.2 Papel de las proteínas ASR.	19
I.3.1.3 Proteínas ASR en cereales.	21
Hipótesis de Trabajo	23
Objetivos	23
II MATERIALES Y MÉTODOS	24
II.1 MATERIALES	25
II.1.1 Material vegetal.	25
II.1.2 Medios y tampones utilizados para cultivo de tejido y transformación de arroz.	25
II.1.3 Secuencias nucleotídicas de los partidores.	26
II.2 MÉTODOS	28
II.2.1 Búsqueda de secuencias de genes <i>ASR</i> .	28
II.2.2 Análisis filogenético.	28
II.2.3 Tratamiento con ácido abscísico (ABA).	29
II.2.4 Tratamientos de estrés abiótico.	29
II.2.5 Extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA).	30
II.2.6 Obtención de región codificante de <i>HvASR5</i> y de secuencias promotoras de <i>OsASR1</i> y <i>OsASR5</i> .	31
II.2.7 Secuenciación y análisis de secuencias.	32
II.2.8 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.	32

	Página	
II.2.9	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).	33
II.2.10	Análisis <i>in silico</i> de las regiones promotoras.	34
II.2.11	Construcciones genéticas y vectores utilizados.	34
II.2.12	Generación de plantas transgénicas.	35
II.2.13	Localización sub-celular de HvASR5.	37
II.2.14	Análisis histoquímico para la actividad de la β -glucuronidasa.	38
II.3.15	Microarreglos y análisis de datos.	38
II.3.16	Análisis estadísticos	39
III	RESULTADOS	40
III.1	Identificación y análisis de secuencias ASR en <i>Oryza sativa</i> y <i>Hordeum vulgare</i> .	41
III.2	La transcripción de los genes <i>ASR</i> de arroz y cebada es diferencialmente regulada por ABA.	44
III.3	Sequía y bajas temperaturas afectan diferencialmente la expresión de los genes <i>OsASR</i> .	44
III.4	Los genes <i>OsASR</i> presentan un distinto patrón de expresión tejido-específico.	49
III.5	Análisis de los promotores de los genes <i>OsASR</i> revela elementos de respuesta a ABA, estrés y específicos de órganos.	52
III.6	Los promotores <i>OsASR</i> dirigen una expresión específica para tejidos.	55
III.7	La proteína HvASR5 se localiza en el núcleo y citoplasma.	58
III.8	Generación y caracterización molecular de plantas transgénicas de arroz que sobre-expresan <i>HvASR5</i> .	60
III.9	Sobre-expresión de <i>HvASR5</i> afecta la expresión de genes relacionados con estrés y desarrollo reproductivo.	63
III.10	Efecto de la sobreexpresión de <i>HvASR5</i> sobre parámetros de crecimiento de plantas sometidas a estrés por frío y sequía.	76
IV	DISCUSIÓN	80
IV.1	Las proteínas ASR de arroz y cebada mantienen características propias de la familia ASR.	81
IV.2	Regulación diferencial de los genes <i>ASR</i> por ABA y estrés abiótico.	82
IV.3	Los genes <i>OsASR</i> presentan un patrón de expresión tejido-específico.	84
IV.4	HvASR5 de cebada se localiza en el núcleo y en el citoplasma.	86
IV.5	Sobre-expresión de <i>HvASR5</i> en arroz no evidencia fenotipos visibles de tolerancia a estrés por frío y sequía.	86
IV.6	HvASR5 regula la expresión de genes relacionados con respuesta a estrés y con desarrollo reproductivo.	87
V	CONCLUSIONES	92
VI	BIBLIOGRAFÍA	94

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de los vectores binarios utilizados para la transformación estable de arroz.	35
Figura 2. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de HvASR5 de cebada y sus homólogos en <i>Oryza sativa</i>	42
Figura 3. Relación filogenética entre las proteínas ASR en especies monocotiledóneas.	43
Figura 4. Expresión relativa de los genes <i>OsASR</i> en hojas de plantas de arroz tratadas con ABA.	45
Figura 5. Expresión relativa de los genes <i>OsASR</i> en raíces de plantas de arroz tratadas con ABA.	46
Figura 6. Expresión relativa del gene <i>HvASR5</i> en hojas de plantas de cebada tratadas con ABA.	47
Figura 7. Perfil de expresión de los genes <i>OsASR</i> en plantas de arroz sometidas a deshidratación y bajas temperaturas.	48
Figura 8. Regulación de la expresión de <i>HvASR5</i> por bajas temperaturas, shock hídrico y salinidad.	50
Figura 9. Expresión tejido-específica y durante el desarrollo vegetal de los miembros de la familia <i>OsASR</i> en arroz.	51
Figura 10. Expresión tejido-específica y durante el desarrollo vegetal del gen <i>HvASR5</i> en cebada.	53
Figura 11. Esquema de los putativos elementos regulatorios en las regiones promotoras de los genes <i>OsASR</i> .	54
Figura 12. Localización histoquímica de la actividad GUS controlada por los promotores de arroz <i>OsASR1</i> y <i>OsASR5</i> en plantas transgénicas de arroz.	56
Figura 13. Localización subcelular de la proteína HvASR5.	59
Figura 14. Identificación de líneas transgénicas de arroz.	61

	Página
Figura 15. Fenotipo de plantas transgénicas de arroz que sobre-expresan <i>HvASR5</i> .	61
Figura 16. Expresión ectópica de <i>HvASR5</i> en líneas de arroz transgénicas.	62
Figure 17. Evaluación de parámetros de crecimiento y biomasa en plantas transgénicas y silvestres de arroz sometidas a estrés por sequía.	77
Figure 18. Evaluación de parámetros de crecimiento y biomasa en plantas transgénicas y silvestres de arroz sometidas a estrés por bajas temperaturas.	79

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de partidores usados en qRT-PCR y PCR convencional	27
Tabla 2. Genes inducidos en plantas de arroz que sobre-expresan <i>HvASR5</i> .	66
Tabla 3. Genes reprimidos en plantas de arroz que sobre-expresan <i>HvASR5</i> .	72

ABREVIACIONES

ABA	Ácido abscísico
ABA_WDS	ABA_water deficit stress
ABI4	ABA insensitive 4
ABRE	Elemento de respuesta a ABA
ASR	ABA, Stress, Ripening
bHLH	Basic helix-loop-helix
bZIP	Basic leucine zipper domain
CaMV 35S	Promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S
CBF/DREB	dehydration-responsive element (DRE) binding proteins
cDNA	DNA complementario
CE1	Elemento de unión 1
CHS	Chalcona sintasa
CO11	CORONATINE INSENSITIVE 1
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
cv	Cultivar
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNaseI	Desoxirribonucleasa I
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DPG	Días post-germinación
DREB	Dehydration response element binding protein
DS2	Proteína ASR de <i>Solanum tuberosum</i>
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EST	Expressed Sequence Tag
F.A.A	Formalina, Ácido acético, Alcohol
GA	Ácido giberélico
GFP	Green Fluorescent Protein
Glu	Ácido glutámico
GRP	Glycine-rich proteins
GST	Glutación-S-Transferasa
<i>GUS</i>	<i>β-glucuronidasa</i>
h	hora
HCl	Ácido clorídrico
His	Histidina
HvASR	ASR de <i>Hordeum vulgare</i>
HvGAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de <i>Hordeum vulgare</i>
INIA	Instituto de Investigaciones Agropecuarias
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
JA	Ácido jasmónico
JAZ	Jasmonate-ZIM domain protein
KOME	Knowledge-based Oryza Molecular biological Encyclopedia
LB	Luria-Bertani medium
LEA	Late embryogenesis abundant protein

LLA23	Lily ASR Protein
LTRE	Low Temperature Responsive Element
Lys	Lisina
μ M	micromolar
MADS	por las proteínas MCM1, AGAMOUS 1, DEFICIENS y SERUM RESPONSE FACTOR
min	minutos
mM	milimolar
NAA	Ácido naftalenacético
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>Nos</i>	<i>Nopalina sintasa</i>
OsINV4	Inverstasa 4 de <i>Oryza sativa</i>
OsNCED	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
psi	libras por pulgada al cuadrado
qRT-PCR	PCR cuantitativo o Real time-PCR
r.p.m	revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNasa	Ribonucleasa
seg	segundo
<i>SPS1</i>	<i>Sacarosa Fosfato Sintasa 1</i>
T ₀	Transformante 0 (inicial)
T ₁	Transformante, primera generación
TPR	Repetición de tetratricopeptido
Ubi1	Promotor de la Ubiquitina 1
<i>Udt1</i>	<i>Undeveloped tapetum 1</i>
<i>VvHT1</i>	<i>Transportador de hexosa 1 de Vitis vinifera</i>
<i>VvMSA</i>	gen <i>ASR</i> de <i>Vitis vinifera</i>
WRKY	Factor de transcripción con una región conservada en WRKYGQK
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
X-Gluc	Ácido 5-Bromo-4-cloro-1H-indol-3-yl β -D-glucopiranosidurónico