

## INDICE

<b>INDICE</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Déficit Hídrico.....	2
1.1.1 Estrés oxidativo .....	2
1.1.2 Mecanismos celulares antioxidantes.....	4
1.1.2.1 Tocoferoles.....	5
1.1.3 Metabolismo de los tocromanoles.....	7
1.1.4 Tocoferoles y resistencia a estrés abiótico.....	8
1.1.5 Estrategias de ingeniería genética y estrés abiótico.....	9
1.2 Hipótesis y objetivos .....	11
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 Obtención y análisis de promotores .....	13
2.1.1 Material vegetal .....	13
2.1.2 Selección de promotores.....	13
2.1.3 Análisis <i>in silico</i> de las promotores en los genes seleccionados.....	13
2.1.4 Promotores y construcciones para transformación transitoria.....	14
2.1.5 Transformación transitoria.....	15
2.1.6 Medición de actividad <i>gusA</i> .....	16
2.1.6.1 Tinción histoquímica de <i>gusA</i> .....	16
2.1.6.2 Medición enzimática de <i>gusA</i> .....	16
2.1.6.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	17
2.2 Obtención de líneas transgénicas que expresen el gen <i>ScVTE2.1</i> bajo el control del promotor inducible .....	17
2.2.1 Material Vegetal.....	17
2.2.2 Aislamiento de gen <i>VTE2.1</i> de <i>S. chilense</i> .....	17
2.2.2.1 Obtención de las construcciones para transformación estable.....	18
2.2.3 Transformación estable de plantas de <i>N. tabacum</i> .....	18
2.2.4 Selección de líneas transgénicas de tabaco .....	19
2.2.5 Medición de tocoferoles.....	19
2.3 Evaluación del grado de tolerancia al déficit hídrico.....	20
2.3.1 Material vegetal. ....	20
2.3.2 Tratamientos de déficit hídrico.....	20
2.3.3 Variables fisiológicas.....	20
2.3.3.1 Contenido relativo de agua.....	20
2.3.4 Parámetros de daño.....	20

2.3.4.1	Intercambio de gases en la hoja.....	20
2.3.4.2	Rendimiento cuántico del PS II.....	21
2.3.4.3	Determinación de clorofila y carotenoides totales.....	21
2.3.4.4	Expresión relativa de genes indicadores de estrés.....	21
2.3.4.5	Determinación de la lipoperoxidación.....	22
2.3.4.6	Determinación del contenido de prolina.....	22
2.3.4.7	Determinación del contenido de ABA.....	23
2.4	Análisis estadístico.....	23
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
3.1	Selección de regiones promotoras inducibles por estrés.....	26
3.1.1	Selección de regiones promotoras P05340, P47770, P80160.....	26
3.1.2	Activación de los promotores seleccionados por deshidratación <i>in planta</i> .....	27
3.2	Generación de plantas transgénicas con el gen <i>ScVTE2.1</i> .....	28
3.2.1	Identificación y análisis de secuencia de <i>ScVTE2.1</i> .....	28
3.2.2	Obtención de plantas de tabaco transgénicas que expresan <i>SCVTE2.1</i> bajo el control de promotores activados por estrés.....	32
3.3	Plantas transgénicas bajo condiciones de estrés.....	35
3.3.1	Daño en el sistema fotosintético.....	42
3.3.2	Contenido de y malondialdehído en las plantas sometidas a déficit hídrico.....	44
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
4.1	Las secuencias promotoras aumentan la expresión del gen reportero en condiciones de estrés.....	46
4.2	Incremento en la concentración de $\alpha$ -tocoferol en condiciones de estrés.....	48
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1. Lista de partidores utilizados.....</b>	<b>14</b>
---	-----------

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta Metabólica de vitamina E en plantas.....	7
Figura 2. Representación esquemática de los elementos reguladores en los tres promotores inducibles.....	26
Figura 3. Inducción de promotores por estrés. ....	27
Figura 4. Análisis de la inducción de los promotores por deshidratación.....	28
Figura 5. Relaciones filogenéticas entre las proteínas VTE2.1, VTE2.2 y HGGT .....	29
Figura 6. Comparación de la secuencia aminoacídica de VTE2.1, VTE2.2 y HGGT de plantas. ....	30
Figura 7. Análisis de topología de <i>ScVTE2.1</i> .....	31
Figura 8. Selección de líneas de tabaco transformadas genéticamente.....	33
Figura 9. Expresión relativa de <i>ScVTE2.1</i> inducidos por estrés en tabaco transgénico en condiciones de déficit hídrico.....	34
Figura 10. Concentración de $\alpha$ -tocoferol en plantas de tabaco en condiciones de déficit hídrico. ....	34
Figura 11. Concentración de $\gamma$ -tocoferol en plantas de tabaco en condiciones de déficit hídrico. ....	35
Figura 12. Fenotipo de plantas sometidas a déficit hídrico. ....	37
Figura 13. Contenido relativo de agua en plantas de tabaco transgénicas en condiciones de déficit hídrico.....	38
Figura 14. Tasa de asimilación de CO <sub>2</sub> en plantas de tabaco en condiciones de déficit hídrico. ....	38
Figura 15. Conductancia estomática en plantas de tabaco en condiciones de déficit hídrico. ....	39
Figura 16. Concentración de ácido abscísico en tabaco en condiciones de déficit hídrico. ....	39
Figura 17. Concentración de prolina en plantas de tabaco en condiciones de déficit hídrico. ....	40
Figura 18. Expresión relativa de <i>NtER10</i> y <i>NtRD29B.1</i> inducidos por estrés tabaco transgénico en condiciones de déficit hídrico. ....	41

<b>Figura 19. Daño ocasionado por efecto de sequía en plantas tipo silvestre y transgénicas que expresan el gen <i>ScVTE2.1</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 20. Concentración de malondialdehído en hojas de plantas de tabaco en condiciones de déficit hídrico.....</b>	<b>44</b>