

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIACIONES</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
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
<b>Hipótesis de Trabajo</b>	<b>23</b>
<b>Objetivos</b>	<b>23</b>
<b>II MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
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
<b>II.2 MÉTODOS</b>	<b>28</b>
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

	<b>Página</b>	
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 $\beta$ -glucuronidasa.	38
II.3.15	Microarreglos y análisis de datos.	38
II.3.16	Análisis estadísticos	39
<b>III</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
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
<b>IV</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>80</b>
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
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>92</b>
<b>VI</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

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

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

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Secuencias nucleotídicas de partidores usados en qRT-PCR y PCR convencional	27
<b>Tabla 2.</b> Genes inducidos en plantas de arroz que sobre-expresan <i>HvASR5</i> .	66
<b>Tabla 3.</b> 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><math>\beta</math>-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- $\beta$ -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
$\mu$ 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 <sub>0</sub>	Transformante 0 (inicial)
T <sub>1</sub>	Transformante, primera generación
TPR	Repetición de tetratricopectido
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- $\beta$ -D-galactopiranosido
X-Gluc	Ácido 5-Bromo-4-cloro-1H-indol-3-yl $\beta$ -D-glucopiranosidurónico