

ÍNDICE

	Página.
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Índice	vii
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	
1. Respuesta a nivel celular y fisiológico de plantas en estrés abiótico	2
2. Respuesta a nivel molecular de las plantas bajo estrés abiótico	2
2.1 Vía I de señalización	3
2.2 Vía II de señalización	4
2.3 Vía III de señalización	4
3. Proteínas de choque térmico (HSP)	6
4. Proteínas de transferencia de lípidos (LTP)	6
5. Proteínas aquaporinas (AQP)	7
6. Proteínas (Late Embryogenesis Abundant (LEAs)	8
6.1 Clasificación de las proteínas LEA	
6.1.1 Proteínas LEA del grupo 1	9
6.1.2 Proteínas LEA del grupo 3	10
6.1.3 Proteínas LEA del grupo 4	11
6.1.4 Proteínas LEA atípicas del grupo 5	12
6.1.5 Proteínas LEA del grupo 6	12
6.1.6 Proteínas LEA del grupo 7	13
6.1.7 Proteínas LEA del grupo 2	14
6.1.7.1 Estructura de las dehidrinas	15
6.1.7.2 Clasificación de las dehidrinas	16
6.1.7.3 Localización de las dehidrinas	17
6.1.7.4 Posible función de las dehidrinas	17

ÍNDICE

	Página.
7. Estrés por bajas temperaturas	18
8. Ácido abscísico (ABA)	20
9.- Modelos de estudio	
9.1 Nopal (<i>Opuntia</i> spp.)	20
9.1.1 Características morfológicas y fisiológicas del nopal	21
9.1.2 Usos y aplicaciones del nopal	22
9.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
OBJETIVOS	24
1. Capítulo I	24
2. Capítulo II	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Material biológico, técnicas, condiciones de crecimiento y tratamientos	
1. <i>Opuntia streptacantha</i>	26
2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
4. <i>Escherichia coli</i>	27
5. Medios de cultivos	27
6. Vectores	28
7. Técnicas de transformación	
7.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y <i>Escherichia coli</i>	30
7.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
8.Tratamientos de estrés	
8.1 Estrés abiótico	31
8.2 Ácido Abscísico (ABA)	32

ÍNDICE

	Página.
9. Extracción de ácidos nucléicos	
9.1 Extracción de RNA de nopal	32
9.2 Extracción de DNA de nopal	33
10. Construcción de una biblioteca de cDNA de nopal	33
11. Análisis de expresión génica	
11.1 Ensayos de PCR en tiempo real (qRT-PCR)	35
12. Aislamiento de un fragmento de DNA genómico del gen <i>OpsDHN1</i> de nopal	36
13. Generación de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
13.1 Amplificación del cDNA y clonación mediante el sistema GATEWAY	36
14. Transformación de <i>A. thaliana</i>	37
15. Análisis de la sobreexpresión del gen <i>OpsDHN1</i>	37
16. Tratamiento de estrés por congelamiento en <i>A. thaliana</i> que sobreexpresa el gen <i>OpsDHN1</i>	37
17. Análisis de las secuencias obtenidas de la biblioteca de cDNA	38
RESULTADOS	39
Capítulo I Efector del estrés salino, prolina y poliaminas en la germinación de <i>Opuntia streptacantha</i>	39
Capítulo II Caracterización funcional de una dehidrina tipo SK ₃ aislada de una biblioteca de cDNA de <i>Opuntia streptacantha</i> sometida a estrés abiótico	57
DISCUSIÓN	125
REFERENCIAS	130

Resumen

“Caracterización funcional de una dehidrina SK₃ aislada de una biblioteca de cDNA de *Opuntia streptacantha*”

En este trabajo de tesis analizamos al nopal con un enfoque fisiológico y uno molecular. La primera etapa consistió en analizar el efecto de poliaminas y prolina en la germinación de semillas de nopal (*Opuntia streptacantha*) sometidas a estrés salino. Los resultados mostraron tendencias a un porcentaje de germinación mayor en comparación al control en semillas de nopal tratadas con prolina 1 mM. En los tratamientos de poliaminas exógenas, no se observó un efecto en el rompimiento de la latencia de las semillas. Por otro lado el estrés salino afectó la germinación de las semillas de nopal, sobretodo a las concentraciones de NaCl de 50 y 75 mM. En los tratamientos donde aplicamos tanto prolina (1 y 10 mM) como poliaminas (1 μ M de cada una), solo el tratamiento con espermina logró obtener una recuperación en el porcentaje de germinación al someter las semillas a una concentración de NaCl de 75 mM.

En la segunda etapa se aislaron, identificaron y caracterizaron genes de nopal inducidos durante estrés abiótico. Para ello se construyó una biblioteca de cDNA de cladodios de nopal sometidos a diferentes tipos de estrés: sequía, salinidad, calor y frío. De esta biblioteca se obtuvieron 329 unigenes a partir de 442 clonas seleccionadas al azar incluyendo genes que codifican proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), ERD15 (Early Responsive to the Dehydration 15), HSP (Heat Shock Protein), AQPs (aquaporins), entre otros. Se seleccionó el EST más abundante de la biblioteca, el unigen 33 (*OpsDHN1*), que codifica una dehidrina del tipo SK₃ de 248 aminoácidos, para su caracterización molecular y funcional. Además del cDNA se obtuvo un fragmento de DNA genómico del gen *OpsDHN1*, el cual tiene un intrón de 234 pb interrumpiendo el marco de lectura abierto de este gen. La expresión del gen *OpsDHN1* se analizó mediante RT-PCR en tiempo real a partir de muestras de cladodios sometidos a estrés, mostrando que el transcrito de *OpsDHN1* se acumula en respuesta a estrés por frío y por ABA. Por otro lado, se generaron líneas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen *OpsDHN1* de nopal, las cuales tuvieron una mayor tasa de sobrevivencia en comparación al control después de la recuperación de un estrés por congelamiento, mientras que bajo estrés salino, no se observaron diferencias en la tasa de sobrevivencia entre las líneas sobreexpresantes y la parental (Col-0). Con esta evidencia se sugiere que la dehidrina de nopal (*OpsDHN1*) puede estar involucrada en los mecanismos de respuesta al estrés por congelamiento. La información obtenida en esta tesis, que incluye el aislamiento e identificación de genes de nopal en respuesta a estrés abiótico, y la caracterización de uno de ellos, constituye una plataforma inicial para el estudio de genes en *Opuntia* spp. y la generación de una base de secuencias de nopal y posibles aplicaciones para conferir tolerancia a estrés abiótico a otras especies vegetales.

Palabras Clave: dehidrina, estrés abiótico, germinación de semillas, latencia, nopal, proteína LEA.