

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE | 1 |
| 1-INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.1 Homeostasis de pH en la célula vegetal..... | 9 |
| 1.1.1 Importancia del mantenimiento de la homeostasis de pH..... | 9 |
| 1.1.2 Regulación del pH en plantas..... | 13 |
| 1.2 Trabajos previos relacionados con la homeostasis de pH..... | 24 |
| 1.2.1 Trabajos empleando ácidos débiles..... | 24 |
| 1.2.2 Otros trabajos relacionados con la homeostasis de pH..... | 37 |
| 1.3 Homeostasis de otros cationes monovalentes..... | 38 |
| 1.3.1 Homeostasis de potasio en <i>A. thaliana</i> | 39 |
| 1.3.2 Homeostasis de sodio en <i>A. thaliana</i> | 51 |
| 1.4 Tráfico de vesículas en plantas..... | 54 |
| 1.4.1 Sistema de endomembranas y tráfico de vesículas..... | 54 |
| 1.4.2 Proceso de formación de vesículas..... | 57 |
| 1.4.3 Principales tipos de cubierta..... | 59 |
| 1.4.4 Complejos adaptadores (APs)..... | 64 |
| 1.4.5 El complejo AP3..... | 68 |
| 1.5 El ácido abscísico en la célula vegetal..... | 74 |
| 1.5.1 Funciones fisiológicas del ácido abscísico..... | 74 |
| 1.5.2 Biosíntesis del ABA..... | 76 |
| 1.5.3 Cascadas de señalización del ácido abscísico..... | 78 |
| 1.6 Biología molecular en <i>A. thaliana</i> | 82 |
| 1.6.1 Empleo de <i>A. thaliana</i> como sistema modelo..... | 82 |
| 1.6.2 Estrategias para la identificación de genes involucrados en la tolerancia a estrés..... | 83 |
| 1.6.3 Activación transcripcional en <i>A. thaliana</i> | 84 |
| 2- OBJETIVOS | 87 |
| 3- MATERIALES Y MÉTODOS | 91 |
| 3.1 Material biológico..... | 93 |
| 3.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> | 93 |
| 3.1.2 <i>Escherichia coli</i> | 95 |
| 3.1.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 96 |
| 3.1.4 Vectores de clonación y transformación..... | 96 |
| 3.2 Medios de cultivo y solución nutritiva..... | 98 |
| 3.2.1 Medios para crecimiento de <i>A. thaliana</i> | 98 |
| 3.2.2 Medios para el crecimiento de bacterias..... | 99 |
| 3.2.3 Solución nutritiva..... | 99 |
| 3.3 Manipulación y crecimiento de <i>A. thaliana</i> | 100 |
| 3.3.1 Esterilización de semillas..... | 100 |
| 3.3.2 Cultivo <i>in vitro</i> en medio sólido..... | 100 |
| 3.3.3 Cultivo <i>in vitro</i> en medio líquido..... | 100 |
| 3.3.4 Cultivo en invernadero..... | 101 |
| 3.3.5 Cultivo hidropónico..... | 101 |
| 3.4 Manipulación y crecimiento de <i>Escherichia coli</i> | 101 |
| 3.4.1 Preparación de células competentes..... | 101 |
| 3.4.2 Transformación de células competentes..... | 102 |
| 3.5 Manipulación y crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 102 |
| 3.5.1 Preparación de células competentes..... | 103 |
| 3.5.2 Transformación mediante electroporación..... | 103 |
| 3.6 Purificación y manipulación de ácidos nucleicos..... | 103 |

| | |
|--|-----|
| 3.6.1 Aislamiento de DNA plasmídico | 103 |
| 3.6.2 Aislamiento de DNA genómico de <i>A. thaliana</i> | 104 |
| 3.6.3 Electroforesis de DNA | 105 |
| 3.6.4 Aislamiento de RNA de <i>A. thaliana</i> | 105 |
| 3.6.5 Electroforesis de RNA | 106 |
| 3.6.6 Marcaje radioactivo de sondas | 106 |
| 3.6.7 Análisis “Southern blot” | 107 |
| 3.6.8 Análisis “Northern blot” | 108 |
| 3.6.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 108 |
| 3.7 Búsqueda y caracterización genética de mutantes | 110 |
| 3.7.1 Rastreo de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 110 |
| 3.7.2 Comprobación de la presencia de T-DNA | 111 |
| 3.7.3 Análisis genético | 111 |
| 3.7.4 Análisis de cosegregación | 111 |
| 3.7.5 Rescate plasmídico | 112 |
| 3.8 Ensayo de aparición de cotiledones en diferentes medios | 113 |
| 3.9 Ensayo de sensibilidad a etileno | 113 |
| 3.10 Ensayos de crecimiento de plántulas en vertical | 113 |
| 3.11 Ensayo de respuesta gravitrópica | 114 |
| 3.12 Medida simultánea del potencial de membrana y pH citosólico | 114 |
| 3.13 Ensayos de crecimiento en invernadero | 115 |
| 3.14 Ensayo de pérdida de peso por transpiración | 115 |
| 3.15 Construcción de plantas transgénicas | 115 |
| 3.15.1 Obtención de las construcciones para transformar <i>A. thaliana</i> | 115 |
| 3.15.2 Transformación de <i>A. thaliana</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> | 116 |
| 3.15.3 Selección de líneas transgénicas y obtención de homocigotos | 117 |
| 3.16 Ensayo de toma de acetato radiactivo | 117 |
| 3.16.1 Preparación de las muestras | 117 |
| 3.16.2 Extracción y medida de acetato radiactivo | 118 |
| 3.17 Ensayo de medida del contenido en malato | 118 |
| 3.17.1 Preparación de las muestras | 118 |
| 3.17.2 Extracción y medida de malato | 118 |
| 3.18 Medida de la actividad H⁺-ATPasa de membrana plasmática (MP) <i>in vitro</i> | 119 |
| 3.18.1 Aislamiento de proteínas de PM en gradiente de sacarosa | 119 |
| 3.18.2 Ensayo de medida actividad H⁺-ATPasa <i>in vitro</i> | 120 |
| 3.19 Ensayos de acidificación del medio externo | 121 |
| 3.19.1 Medida empleando bromocresol | 121 |
| 3.19.2 Medida directa de la acidificación del medio externo | 121 |
| 3.20 Ensayos de toma y acumulación de cationes | 122 |
| 3.20.1 Ensayo de toma de sodio y litio | 122 |
| 3.20.2 Ensayo de toma de rubidio | 122 |
| 3.20.3 Ensayos de acumulación de cationes | 123 |
| 3.21 Extracción y medida de cationes | 124 |
| 3.22 Medida del contenido en ácido abscísico (ABA) | 124 |
| 3.22.1 Obtención de las muestras | 124 |
| 3.22.2 Extracción y medida de ácido abscísico | 124 |
| 3.23 Análisis de la expresión génica en condiciones de estrés por ácido acético mediante micromatrices de oligos | 125 |
| 3.23.1 Características de las micromatrices empleadas | 125 |
| 3.23.2 Preparación de las muestras | 125 |

| | |
|---|-----|
| 3.23.3 Preparación de la sonda de RNA para la hibridación | 126 |
| 3.23.4 Preparación de las micromatrices para la hibridación | 127 |
| 3.23.5 Prehibridación e hibridación de las micromatrices | 127 |
| 3.23.6 Lavado y escaneado de las micromatrices | 127 |
| 3.23.7 Preprocesamiento de los datos con genepix | 128 |
| 3.23.8 Procesamiento de los datos con Accuity y análisis estadístico | 128 |
| 4-RESULTADOS | 129 |
| 4.1 Rastreo de líneas mutantes “ <i>activation tagging</i> ” | 131 |
| 4.1.1 Aislamiento de mutantes resistentes a ácido acético | 131 |
| 4.1.2 Confirmación de la presencia de T-DNA en los mutantes y determinación del número de inserciones | 132 |
| 4.2 Caracterización fenotípica del mutante <i>wat1-1</i> | 133 |
| 4.2.1 Caracterización fenotípica en germinación y aparición de cotiledones | 133 |
| 4.2.2 Caracterización fenotípica en plántulas de 15-20 días de edad | 138 |
| 4.2.3 Caracterización fenotípica en plantas adultas | 144 |
| 4.3 Caracterización genética del mutante <i>wat1-1</i> | 150 |
| 4.3.1 <i>wat1-1</i> presenta una mutación dominante (<i>wat1-ID</i>) | 150 |
| 4.3.2 La tolerancia a acético del mutante correlaciona con la inserción de T-DNA | 151 |
| 4.3.3 Localización de la inserción de T-DNA en el mutante <i>wat1-ID</i> | 152 |
| 4.3.4 Análisis de expresión de los genes adyacentes al T-DNA | 152 |
| 4.4 Los fenotipos del mutante <i>wat1-ID</i> no se deben a la sobreexpresión del gen At3g55470 | 154 |
| 4.4.1 Fenotipo en presencia de ácido acético de mutantes de pérdida de función del gen At3g55470 | 154 |
| 4.4.2 Fenotipo en presencia de ácido acético de plantas transgénicas sobreexpresando el gen At3g55470 | 155 |
| 4.5 Los fenotipos del mutante <i>wat1-ID</i> se deben a la sobreexpresión de una adaptina truncada | 156 |
| 4.5.1 Fenotipos de plantas sobreexpresando una versión truncada de At3g55480 | 156 |
| 4.5.2 Fenotipos de plantas transgénicas antisentido para el gen At3g55480 | 158 |
| 4.5.3 El mutante <i>wat1-ID</i> presenta fenotipos similares al mutante <i>pat2</i> | 159 |
| 4.6 Análisis bioinformático del locus At3g55480 | 161 |
| 4.6.1 Análisis de expresión del gen <i>WAT</i> | 162 |
| 4.6.2 Análisis de la proteína WAT1 de Arabidopsis | 164 |
| 4.7 La toma de acético del mutante <i>wat1-ID</i> es similar a la del control | 168 |
| 4.8 El consumo de malato es similar en el mutante y el control | 168 |
| 4.9 La sobreexpresión de la pirofosfatasa vacuolar comparte fenotipos con el mutante <i>wat1-ID</i> | 170 |
| 4.9.1 Fenotipo en presencia de ácido acético | 171 |
| 4.9.2 Fenotipo en presencia de litio, bajo potasio y estrés osmótico | 171 |
| 4.10 La pérdida de función de la H ⁺ -ATPasa vacuolar tiene fenotipos contrarios al mutante <i>wat1-ID</i> | 172 |
| 4.10.1 Fenotipo en presencia de ácido acético | 172 |
| 4.10.2 Fenotipo en presencia de litio, bajo potasio y estrés osmótico | 173 |
| 4.11 La pérdida de función del antiportador NHX es sensible a ácido acético | 174 |
| 4.12 Estudio de la expulsión de protones a nivel de membrana plasmática | 175 |
| 4.12.1 Medida de la actividad de la H ⁺ -ATPasa <i>in vitro</i> | 175 |
| 4.12.2 Medida de la acidificación del medio externo <i>in vivo</i> | 176 |

| | |
|--|-----|
| 4.13 Medida del potencial de membrana del mutante y el control | 178 |
| 4.14 Toma de rubidio en condiciones normales y en condiciones de estrés por ácido acético | 179 |
| 4.15 Toma y acumulación de cationes en el mutante <i>wat1-ID</i> | 181 |
| 4.15.1 Ensayos realizados en plántulas completas | 181 |
| 4.15.2 Ensayos de acumulación de cationes en raíz y parte aérea | 184 |
| 4.16 Estudio de la relación entre ácido acético y abscísico | 186 |
| 4.16.1 Fenotipos en presencia de acético de mutantes en biosíntesis o ruta de señalización por ABA | 186 |
| 4.16.2 El ácido acético promueve la síntesis de ABA | 187 |
| 4.17 Respuesta transcripcional al estrés por ácido acético | 189 |
| 5- DISCUSIÓN | 195 |
| 5.1 Aislamiento y caracterización genética del mutante <i>wat1-ID</i> | 197 |
| 5.1.1 Rastros en germinación y establecimiento de la plántula | 197 |
| 5.1.2 Empleo de líneas “<i>activation tagging</i>” | 197 |
| 5.1.3 <i>wat1-ID</i> es un mutante dominante negativo | 199 |
| 5.2 <i>WAT1</i> codifica para la adaptina β del complejo AP-3 | 200 |
| 5.2.1 Análisis de la expresión del gen <i>WAT1</i> | 200 |
| 5.2.2 Análisis bioinformático de la proteína WAT1 | 200 |
| 5.2.3 Efectos de la pérdida de función de subunidades del complejo AP3 | 201 |
| 5.3 Homeostasis de pH en el mutante <i>wat1-ID</i> | 201 |
| 5.3.1 “<i>Biochemical pH stat</i>” en el mutante <i>wat1-ID</i> | 203 |
| 5.3.2 “<i>Biophysical pH stat</i>” en el mutante <i>wat1-ID</i> | 204 |
| 5.3.3 Modelo propuesto (primera parte) | 209 |
| 5.4 Homeostasis de otros cationes monovalentes | 210 |
| 5.4.1 Homeostasis de sodio, litio, y potasio en el mutante <i>wat1-ID</i> | 210 |
| 5.4.2 Modelo propuesto (segunda parte) | 212 |
| 5.5 El ácido abscísico y la homeostasis de cationes monovalentes | 216 |
| 5.5.1 Comportamiento en presencia de ABA del mutante <i>wat1-ID</i> | 216 |
| 5.5.2 El ácido acético induce la síntesis de ABA | 217 |
| 5.5.3 Modelo para la inhibición de la germinación y crecimiento mediado por ABA | 218 |
| 5.6 Respuesta transcripcional al ácido acético | 220 |
| 6-CONCLUSIONES | 225 |
| 7- BIBLIOGRAFÍA | 231 |
| 8-ANEJOS | 257 |