

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Mejora vegetal de cultivos alimenticios	3
1.1.1 Importancia de la mejora vegetal.....	3
1.1.2 La biotecnología como herramienta para la mejora vegetal.....	6
1.2 El problema de la salinidad	10
1.2.1 Antecedentes históricos y estado actual del problema.....	10
1.2.2 Definición de suelo salino.....	12
1.2.3 Causas de la salinidad.....	13
1.3 La salinidad y el desarrollo vegetal	14
1.3.1 Glicofitas <i>versus</i> halofitas.....	14
1.3.2 Efectos causados por la salinidad en las plantas.....	17
1.4 Mecanismos de adaptación al estrés salino	24
1.4.1 Exclusión e inclusión de iones tóxicos.....	24
1.4.2 Flujo a través de la membrana plasmática y compartimentación de iones tóxicos.....	25
1.4.3 Regulación de la distribución de Na ⁺ y Cl ⁻ en la parte aérea.....	29
1.4.4 Moléculas, sensores y vías de señalización que regulan la homeostasis iónica.....	31
1.4.5 Producción de osmolitos.....	35
1.4.6 Respuesta antioxidante en condiciones de estrés salino.....	36
1.5 El empleo de sistemas modelo en biología molecular	37
1.5.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo.....	38
1.5.2 Uso de <i>A. thaliana</i> en estudios de estrés salino.....	38
1.5.3 Estrategias para la identificación de genes involucrados en la tolerancia a estrés salino en <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
1.5.4 Activación transcripcional en <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
1.6 Policones como herramientas para dilucidar los mecanismos de la tolerancia a estrés salino	42

1.7 Sistemas de transporte de iones a través de las membranas vegetales	44
1.7.1 Transporte pasivo de iones.....	46
1.7.2 Transporte activo de iones.....	47
1.8 Mecanismos de transporte de potasio	48
1.8.1 Canales de K ⁺	49
1.8.2 Transportadores de K ⁺	54
1.9 Regulación de la toma y transporte de K⁺ en la planta	57
1.9.1 Factores que regulan el transporte de K ⁺ en la planta.....	58
1.10 Toma de iones en la raíz: Transporte a corta distancia	67
1.10.1 Transporte radial de iones a través de la raíz.....	68
1.10.2 Liberación de iones en el xilema.....	69
1.11 Plegamiento de proteínas y familia de las sulfidril oxidasas	70
1.11.1 Familia de las sulfidril oxidasas.....	72
1.11.2 Familia de sulfidril oxidasas QSOX.....	74
2. OBJETIVOS	81
3. MATERIALES Y MÉTODOS	85
3.1 Material biológico	87
3.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	87
3.1.2 <i>Nicotiana benthamiana</i>	89
3.1.3 <i>Escherichia coli</i>	89
3.1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89
3.1.5 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	89
3.1.6 Vectores de clonación y transformación.....	90
3.2 Medios de cultivo y solución nutritiva	93
3.2.1 Medios para crecimiento de <i>Arabidopsis</i>	93
3.2.2 Medios para crecimiento de bacterias.....	93
3.2.3 Medios para crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	94
3.2.4 Solución nutritiva.....	94

3.3 Manipulación y crecimiento de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	95
3.4 Manipulación y condiciones de crecimiento de <i>E. coli</i>	95
3.4.1 Preparación de células competentes.....	95
3.4.2 Transformación de células competentes.....	96
3.5 Manipulación y condiciones de crecimiento de <i>A. tumefaciens</i>	96
3.5.1 Preparación de células competentes.....	97
3.5.2 Transformación mediante electroporación.....	97
3.6 Manipulación y condiciones de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	97
3.6.1 Preparación de células competentes.....	97
3.6.2 Transformación por choque térmico.....	98
3.7 Búsqueda y análisis de mutantes	98
3.7.1 Rastreo de líneas de <i>A. thaliana</i>	98
3.7.2 Comprobación de la presencia de T-DNA.....	98
3.7.3 Análisis genético.....	99
3.7.4 Análisis de cosegregación.....	100
3.7.5 Rescate plasmídico.....	100
3.8 Ensayo de aparición de cotiledones	101
3.9 Ensayos de crecimiento en invernadero	101
3.10 Ensayos de peso fresco	101
3.11 Ensayo de toma y acumulación de cationes y norespermidina	101
3.11.1 Potasio, sodio, litio y norespermidina.....	101
3.11.2 Rubidio.....	102
3.12 Ensayo de acumulación de iones en el xilema	103
3.13 Medida de cationes y norespermidina	103
3.13.1 Cationes.....	103
3.13.2 Norespermidina.....	103

3.14 Medida del potencial de membrana	104
3.15 Purificación y análisis de ácidos nucleicos	105
3.15.1 Aislamiento de DNA plasmídico.....	105
3.15.2 Aislamiento de DNA genómico de <i>Arabidopsis</i>	106
3.15.3 Electroforesis de DNA.....	106
3.15.4 Análisis “Southern blot”.....	107
3.15.5 Aislamiento de RNA de <i>Arabidopsis</i>	108
3.15.6 Electroforesis de RNA.....	108
3.15.7 Análisis “Northern blot”.....	109
3.15.8 Marcaje radioactivo de sondas.....	109
3.16 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	110
3.16.1 Oligonucleótidos cebadores.....	110
3.16.2 Condiciones de PCR.....	110
3.16.3 PCR diagnóstica.....	111
3.16.4 RT-PCR cuantitativa.....	111
3.17 Construcción de plantas transgénicas	112
3.17.1 Transformación de <i>A. thaliana</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	112
3.17.2 Selección de líneas transgénicas.....	113
3.18 Transformación transitoria de <i>N. benthamiana</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	113
3.19 Ensayo de coexpresión en <i>S. cerevisiae</i>	114
3.20 Preparación y análisis de proteínas	114
3.20.1 Preparación de extracto crudo de proteínas de <i>A. thaliana</i>	114
3.20.2 Preparación de extractos de proteínas soluble e insoluble de <i>S. cerevisiae</i>	115
3.20.3 Preparación de extractos de proteínas extra e intracelular de <i>S. cerevisiae</i>	116
3.20.4 Preparación y purificación de proteína recombinante.....	116
3.20.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE).....	117
3.20.6 Análisis “Western Blot”.....	117

3.21 Ensayos enzimáticos	119
3.21.1 Medida de la actividad H ⁺ -ATPasa.....	119
3.21.2 Ensayo de la actividad sulfidril oxidasa.....	119
4. RESULTADOS	121
4.1 Rastreo de líneas de inserción de T-DNA	123
4.1.1 Condiciones de búsqueda.....	123
4.1.2 Aislamiento de mutantes resistentes a norespermidina.....	124
4.1.3 Determinación del número de inserciones de T-DNA.....	126
4.2 Análisis genético del mutante <i>par1</i>	127
4.2.1 Localización de la inserción de T-DNA en el genoma de <i>Arabidopsis</i> mediante rescate plasmídico.....	127
4.2.2 Estudios de segregación.....	127
4.2.3 Análisis de cosegregación.....	129
4.2.4 Análisis de expresión de genes adyacentes a la inserción de T-DNA en el mutante <i>par1</i>	129
4.2.5 Identificación de nuevos alelos mutantes en el <i>locus</i> At1g15020.....	132
4.2.6 Expresión del <i>locus</i> At1g15020 en los alelos mutantes.....	132
4.3 Caracterización fenotípica de los alelos <i>par1</i>	133
4.3.1 <i>par1-1D</i> presenta un fenotipo pleiotrópico de tolerancia a cationes tóxicos.....	133
4.3.2 <i>par1-2</i> , <i>par1-3</i> y <i>par1-4</i> son sensibles a cationes tóxicos.....	138
4.3.3 <i>par1-1D</i> presenta una menor toma y acumula menor cantidad de cationes tóxicos en condiciones de estrés.....	140
4.3.4 La acumulación y toma de K ⁺ varía en los alelos <i>par1</i>	143
4.3.5 El potencial de membrana de la epidermis radicular no está afectado en los alelos <i>par1</i>	144
4.3.6 Los alelos <i>par1</i> están afectados en la acumulación de cationes en la parte aérea.....	144
4.3.7 Los alelos <i>par1</i> están afectados en la acumulación de cationes en el xilema.....	147

4.4 La sobreexpresión del locus At1g15020 reproduce el fenotipo del mutante <i>par1-1D</i>	148
4.5 Análisis bioinformático del locus At1g15020	152
4.5.1 Predicciones informáticas.....	152
4.5.2 Análisis proteico de la familia QSOX en <i>Arabidopsis</i>	154
4.6 Aislamiento y caracterización fenotípica de mutantes en el gen <i>AtQSO1</i>	156
4.6.1 Identificación de líneas mutantes del gen <i>AtQSO1</i>	156
4.6.2 La mutación del gen <i>AtQSO1</i> presenta diferentes grados de sensibilidad a cationes tóxicos.....	157
4.7 Analisis de la expresión de los genes <i>AtQSO1</i> y <i>AtQSO2</i>	159
4.7.1 Expresión de los genes <i>AtQSO1</i> y <i>AtQSO2</i> en diferentes tejidos.....	159
4.7.2 Expresión de los genes <i>AtQSO1</i> y <i>AtQSO2</i> en condiciones de estrés.....	161
4.8 Caracterización funcional de la proteína AtQSO2	163
4.8.1 La proteína AtQSO2 se ubica en la matriz extracelular.....	164
4.8.2 La proteína AtQSO2 presenta actividad sulfidril oxidasa.....	166
4.8.3 La proteína AtQSO2 no regula la expresión y/o actividad de la bomba H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática.....	167
4.8.4 La proteína AtQSO2 no regula la expresión y/o función del canal de K ⁺ AKT1 de membrana plasmática.....	168
4.8.5 El gen <i>SKOR</i> no es epistático respecto al gen <i>AtQSO2</i>	169
5. DISCUSIÓN	173
5.1 Búsqueda y aislamiento de mutantes resistentes a noespermidina	175
5.2 <i>par1-1D</i> es un mutante de ganancia de función del locus At1g15020	176
5.3 El gen <i>AtQSO2</i> codifica una proteína de la familia QSOX con actividad sulfidril oxidasa	177
5.4 El aumento de expresión de <i>AtQSO2</i> produce un fenotipo pleiotrópico de resistencia a cationes tóxicos	180

5.5 Fenotipo del mutante <i>qsol</i> y expresión de los genes <i>AtQSO1</i> y <i>AtQSO2</i>.....	183
5.6 <i>AtQSO2</i> no regula la toma de K^+ en la epidermis de la raíz.....	186
5.7 La acumulación de K^+ y cationes tóxicos en el xilema y la parte aérea depende de la expresión de <i>AtQSO2</i>.....	187
5.8 Un modelo para la tolerancia a cationes tóxicos regulado por <i>AtQSO2</i>.....	191
6. CONCLUSIONES.....	199
7. BIBLIOGRAFÍA.....	203
8. ANEXOS.....	235