

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. SEÑALIZACIÓN POR OXÍGENO Y ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN LAS RESPUESTAS A ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS	1
1.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	1
1.2. ESTRÉS NITROSATIVO, ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (RNS)	4
1.3. ESTRÉS POR HIPOXIA Y RE-OXIGENACIÓN EN PLANTAS.....	8
2. PROTEÍNAS CON DOMINIO VALINA-GLUTAMINA (VQ) EN PLANTAS	14
2.1. PROTEÍNAS VQ EN LA REGULACIÓN DEL DESARROLLO.....	16
2.2. PROTEÍNAS VQ EN LA DEFENSA CONTRA PATÓGENOS Y PLAGAS	17
2.3. PROTEÍNAS VQ EN LAS RESPUESTAS A ESTRÉS ABIÓTICO	19
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. MATERIAL BIOLÓGICO	27
1.1. MATERIAL VEGETAL.....	27
1.2. MATERIAL MICROBIOLÓGICO	28
2. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE ARABIDOPSIS	28
2.1. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS	28
2.2. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO	28
2.3. CRUCE DE PLANTAS Y SELECCIÓN	29
2.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIANTE INMERSIÓN FLORAL Y SELECCIÓN DE LOS TRANSFORMANTES	29
2.5. TRATAMIENTOS	30
2.5.1. HIPOXIA EN CÁMARA	30
2.5.2. ÓXIDO NÍTRICO	30
2.5.3. HIPOXIA Y RE-OXIGENACIÓN POR INUNDACIÓN.....	31
2.5.4. GERMINACIÓN BAJO ESTRÉS OXIDATIVO.....	31
2.5.5. DESETIOLACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILAS	31
2.6. TINCIÓN GUS.....	32
2.7. TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO.....	32
2.8. ESTIMACIÓN DE LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA.....	32

2.9. ANÁLISIS DE ISOPRENOIDES	32
3. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	33
3.1. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO	33
3.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA TRANSITORIA MEDIANTE AGROINFILTRACIÓN	33
3.3. VISUALIZACIÓN DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GFP Y RFP	34
4. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS.....	34
4.1. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> Y <i>A.</i> <i>TUMEFACIENS</i>	34
4.2. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES PARA LA TRANSFORMACIÓN	34
4.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	35
5. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE LEVADURAS	35
5.1. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO	35
5.2. TRANSFORMACIÓN Y GENERACIÓN DE LEVADURAS DIPLOIDES MEDIANTE APAREAMIENTO	36
5.3. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA (Y2H).....	37
5.4. RASTREO DE GENOTECA DE DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA (Y2H) MEDIANTE APAREAMIENTO	37
6. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	38
6.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	38
6.1.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE ARABIDOPSIS.....	38
6.1.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE ARABIDOPSIS.....	39
6.1.3. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE BACTERIAS	39
6.1.4. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE LEVADURAS	39
6.1.5. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE PRODUCTOS DE PCR O DE GELES DE AGAROSA	39
6.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	40
6.3. ANÁLISIS DE CALIDAD DE ARN	40
6.4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	40
6.4.1. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE PCR.....	40
6.4.2. ELECTROFORESIS DE ADN O ARN EN GEL DE AGAROSA	43
6.4.3. RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) DEL ARN	43

6.4.4. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR).....	43
6.4.5. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO.....	44
6.4.6. SECUENCIACIÓN SANGER DE ADN.....	44
6.4.7. DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	44
6.4.8. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS MEDIANTE TECNOLOGÍA GATEWAY	44
6.4.9. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES amiARN.....	46
7. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	46
7.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	46
7.1.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.....	46
7.1.2. INMUNOPRECIPITACIÓN Y CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS MARCADAS.....	46
7.2. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	46
7.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.....	46
7.2.2. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS CON SDS-PAGE.....	47
7.2.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	47
8. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	48
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49
RESULTADOS I.....	53
1. IDENTIFICACIÓN DE GENES <i>VQ</i> Y <i>WRKY</i> INDUCIBLES POR NO, HIPOXIA Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	53
2. LOS GENES <i>VQ1</i> Y <i>VQ10</i> PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE LA PLANTA Y EN LAS RESPUESTAS A ESTRÉS.....	56
3. INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS <i>VQ</i> Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN <i>WRKY</i> REGULADOS POR HIPOXIA, NO Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	60
4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INTERACTORAS DE <i>VQ1</i>	61
5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS <i>VQ1</i> Y <i>VQ10</i>	63
6. <i>VQ1</i> Y <i>VQ10</i> INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS CLOROPLÁSTICAS.....	66
7. <i>VQ1</i> Y <i>VQ10</i> PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN REDOX DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE <i>DXS</i>	68
RESULTADOS II.....	75
1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES <i>VQ10</i> Y <i>WRKY33</i>	75
2. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN PLANTAS <i>vsq10-HEN</i> NORMOXIA Y EN HIPOXIA.....	77

3. ANÁLISIS DEL PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DE ARNs EN PLANTAS <i>vq10-H</i> EN NORMOXIA Y EN HIPOXIA	85
4. FENOTIPOS DE PLANTAS <i>vq10-H</i> y <i>VQ10OX</i> RELACIONADOS CON EL DESARROLLO	87
5. FENOTIPOS DE PLANTAS <i>vq10-H</i> y <i>VQ10OX</i> RELACIONADOS CON LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO	92
6. EFECTO REGULADOR DE VQ1 Y VQ10 EN PROCESOS FOTOSINTÉTICOS	98
DISCUSIÓN.....	105
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	117
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA.....	125
ANEXOS.....	151