

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del
Medio Natural



Identificación de mutantes y genes que proporcionen tolerancia a estrés ácido intracelular

TRABAJO FINAL DE GRADO

Titulación:

Grado en Biotecnología

Curso académico:

2013-2014

Presentado por:

Ignacio Selgas Sanchis

Tutorizado por:

Dr. Jesús Muñoz Bertomeu

Dr. Ramón Serrano Salom

Reserva de todos los derechos

Valencia, Julio 2014



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
Y DEL MEDIO NATURAL

Ficha resumen del Trabajo Fin de
Grado

Datos personales

Nombre y apellidos: Ignacio Selgas Sanchis

Datos del trabajo de fin de carrera

Título del TFC: Identificación de mutantes y genes que proporcionen tolerancia a estrés ácido intracelular

Localidad: Valencia Fecha: Julio de 2014

Tutor académico: Jesús Muñoz Bertomeu

Cotutor: Ramón Serrano Salom

Tipo de licencia de autorización de acceso y difusión del TFG : Reserva de todos los derechos

Resumen

Las plantas son organismos inmóviles que habitan en ambientes cambiantes, por tanto han desarrollado mecanismos de respuesta a todo tipo de estreses entre ellos el estrés ácido intracelular. La homeostasis de pH permite a las células vegetales mantener un valor de pH dentro de un estrecho rango en los diferentes compartimentos, por tanto el pH será diferente según la localización en la planta.

Este trabajo se ha dividido en dos partes: por un lado identificación de nuevos mutantes tolerantes a ácido acético durante el establecimiento de plántula, y por otro lado determinación de la zona de inserción del T-DNA mediante rescate plasmídico en mutantes previamente identificados en el laboratorio del profesor Ramón Serrano.

En el primer apartado del proyecto se emplearon cerca de 11000 líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* de la colección FOX, para ello se realizó un rastreo con aproximadamente 88000 semillas en un medio basal suplementado con 6 mM de ácido acético. En este rastreo primario se obtuvieron 132 de mutantes tolerantes durante la germinación, que tras dar semillas en el invernadero se volvieron a analizar mediante un rastreo secundario confirmándose solamente tres mutantes.

En cuanto a la segunda parte del trabajo, se intentó localizar el punto de inserción del T-DNA en 4 líneas mutantes de la colección de Somerville obtenidas en el laboratorio en rastreos previos. Se pudo identificar la zona de inserción, así como la orientación del T-DNA, en 3 de ellas mediante la técnica del rescate plasmídico. Se determinó también, que tanto la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' como la cepa DH5 α pueden ser utilizadas en estos experimentos.

Teniendo en cuenta que el T-DNA tiene cuatro copias del activador transcripcional 35S y que el alcance de estos es de unas 10000 pares de bases, se determinaron los posibles genes que podrían verse involucrados en la resistencia al estrés ácido intracelular en los mutantes estudiados.

Palabras clave

pH homeostasis, ácido acético, acidificación intracelular, rescate plasmídico

Resum

Les plantes són organismes immòbils que habiten en ambients canviants, per tant han desenvolupat mecanismes de resposta a tot tipus de estressos entre ells l'estrès àcid intracel·lular. L'homeòstasi de pH permet a les cèl·lules vegetals mantindre un valor de pH dins d'un estret rang en els diferents compartiments, per tant el pH serà diferent segons la localització a la planta.

Aquest treball s'ha dividit en dues parts: d'una banda identificació de nous mutants tolerants durant l'establiment de plàntula a àcid acètic, i d'altra banda determinació de la zona d'inserció del T-DNA mitjançant rescat plasmídic en mutants prèviament identificats en el laboratori del professor Ramón Serrano.

En el primer apartat del projecte es van utilitzar prop de 11000 línies mutants d'*Arabidopsis thaliana* de la col·lecció FOX, per això es va realitzar un rastreig amb aproximadament 88000 llavors en un medi basal suplementat amb 6 mM d'àcid acètic. En aquest rastreig primari es van obtenir 132 de mutants tolerants durant la germinació, que després de donar llavors a l'hivernacle es van tornar a analitzar mitjançant un rastreig secundari confirmant solament tres mutants.

Quant a la segona part del treball, es va intentar localitzar el punt d'inserció del T-DNA en 4 línies mutants de la col·lecció de Somerville obtingudes en el laboratori en rastrejos previs. Es va poder identificar la zona d'inserció, així com l'orientació del T-DNA, en 3 d'elles mitjançant la tècnica del rescat plasmídic. Es va determinar també, que tant la soca de *E. coli* XL1-Blue MRF 'com el cep DH5 α poden ser utilitzades en aquests experiments.

Tenint en compte que el T-DNA té quatre còpies de l'activador transcripcional 35S i que l'abast d'aquests és d'unes 10000 parells de bases, es van determinar els possibles gens que podrien veure involucrats en la resistència a l'estrès àcid intracel·lular en els mutants estudiats.

Paraules clau

pH homeòstasi, àcid acètic, acidificació intracel·lular, rescat plasmídic

Abstract

Plants are immobile organisms that live in changing environments therefore have developed mechanisms to respond to all kinds of stresses including intracellular acid stress. PH homeostasis allows plant cells to maintain a pH within a narrow range in the different compartments, so the pH will be different depending on the location on the ground.

This work is divided into two parts: first identification of new tolerant mutants during seedling establishment to acetic acid, and secondly determining the insertion point of T-DNA by plasmid rescue mutants previously identified in Ramón Serrano laboratory.

In the first part of the project about 11,000 *Arabidopsis thaliana* mutant lines FOX collection were employed, with about 88000 seeds, in a basal medium supplemented with 6 mM acetic acid was made. In this primary screen were obtained 132 tolerant mutants during germination, which after giving seeds in the greenhouse were analyzed using a secondary screen that confirmed only three mutants.

As for the second part of the work, we attempted to locate the insertion point of the T-DNA in 4 Somerville collection mutant lines obtained in the laboratory in previous scans. We could identify the insertion and orientation of the T-DNA in 3 of them by the technique of plasmid rescue. It was also determined that both the *E. coli* strain XL1-Blue MRF 'and the strain DH5 α it can be used in these experiments.

These results obtained may be used for investigation of the different pathways which possess plant to maintain intracellular pH during different abiotic stress conditions.

Key words

pH homeostasis, acetic acid, intracellular acidification, plasmid rescue

AGRADECIMIENTOS

Toca poner fin a cuatro años de esfuerzo y sacrificio, es algo que veía muy lejano cuando entré a la universidad, pero como se suele decir transcurre en un abrir y cerrar de ojos.

Tengo que dar las gracias en primer lugar a mis compañeras de clase, que literalmente desde el primer día me ofrecieron su ayuda, sin la cual he de admitir que me habría ido bastante peor. Me gustaría agradecer a todas las personas que conforman el laboratorio 1.10 por crear un clima tan agradable donde he podido aprender mientras realizaba este trabajo y por facilitarme todas las cosas.

Agradecer por supuesto a Ramón y Mariche, por darme la oportunidad de poder realizar el TFG con ellos y haberme ayudado en todo, sois unas personas increíbles, gracias por el apoyo que me habéis dado durante todos estos meses.

Agradecer a Jesús su dedicación y ayuda, por no dejarme solo a mi suerte en ningún momento y a la vez allanarme el trabajo en cualquier situación, es sencillo encontrar a alguien que te diga lo costoso que es sembrar semillas mientras te mira hacerlo, pero realmente muy difícil encontrar a alguien que te lo diga mientras está sembrándolas contigo, espero que todo tu trabajo tenga una más que merecida recompensa.

No olvidarme de mencionar a mi familia por preocuparse y darme ánimos todos estos años en cualquier situación, gracias

Finalmente un agradecimiento general a todas las personas que han puesto su pequeña aportación en favorecer mi paso por la universidad en estos cuatro años.

Gracias a todos

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ASPECTOS GENERALES DEL PROBLEMA DEL ESTRÉS EN LAS PLANTAS.....	1
1.2. HOMEOSTASIS DE pH.....	2
1.2.1. Concepto de homeostasis de pH.....	2
1.2.2. Importancia de la homeostasis del pH.....	2
1.2.3. Mecanismos de regulación del pH en plantas.....	4
1.2.4. Los ácidos débiles como herramienta para el estudio de la homeostasis de pH.....	6
1.3. EMPLEO DE <i>Arabidopsis thaliana</i> COMO SISTEMA MODELO.....	7
1.4. ESTRATEGIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS.....	8
1.4.1. Creación de colecciones de mutantes de T-DNA en <i>A. thaliana</i>	10
1.4.2. Mutantes de pérdida de función de en <i>A. thaliana</i>	10
1.4.3. Activación transcripcional en <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. RASTREO DE MUTANTES TOLERANTES A ÁCIDO ACÉTICO POR APARICIÓN DE COTILEDONES VERDES.....	14
3.1.1. Material vegetal.....	14
3.1.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
3.1.2. Medios y soluciones de crecimiento.....	14
3.1.2.1. Medio MS.....	15
3.1.2.2. Solución nutritiva.....	15
3.1.3. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
3.1.3.1. Esterilización de semillas.....	15
3.1.3.2. Cultivo in vitro.....	16
3.1.3.3. Cultivo en tierra.....	16
3.1.4. Rastreo de mutantes.....	16
3.1.4.1. Ensayo de aparición de cotiledones.....	16
3.1.4.2. Determinación de la tolerancia a higromicina en los mutantes putativos.....	17
3.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DE INSERCIÓN DEL T-DNA MEDIANTE RESCATE PLASMÍDICO EN MUTANTES CONFIRMADOS TOLERANTES A ÁCIDO ACÉTICO.....	18
3.2.1. Material biológico.....	18
3.2.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
3.2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	19
3.2.2. Manipulación y crecimiento de <i>A. thaliana</i>	19
3.2.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> y en invernadero.....	19
3.2.3. Crecimiento de <i>E. coli</i>	19
3.2.3.1. Manejo de <i>E. coli</i>	19

3.2.3.2. Medios de cultivo.....	20
3.2.3.2.1. Medio LB.....	20
3.2.3.2.2. Medio SOC.....	20
3.2.3.3. Preparación de células competentes.....	20
3.2.3.4. Transformación por electroporación.....	20
3.2.3.5. Transformación por choque térmico.....	21
3.2.3.6. Mantenimiento de las cepas de <i>E. coli</i>	21
3.2.4. Purificación y análisis de los ácidos nucleicos.....	21
3.2.4.1. Aislamiento de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3.2.4.2. Extracción de plásmidos de <i>E. coli</i>	22
3.2.4.3. Electroforesis de ADN.....	23
3.2.4.4. Rescate plasmídico.....	23
3.2.5. Análisis estadísticos.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1. RASTREO DE MUTANTES EN ÁCIDO ACÉTICO.....	25
4.1.1. Condiciones del rastreo.....	25
4.1.2. Rastreo primario.....	25
4.1.3. Rastreo secundario. Tolerancia a acético.....	26
4.1.4. Tolerancia a higromicina.....	27
4.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DE INSERCIÓN EN MUTANTES PREVIAMENTE IDENTIFICADOS MEDIANTE RESCATE PLASMÍDICO.....	28
4.3. ANÁLISIS FUTUROS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES RESPONSABLES DE LA TOLERANCIA.....	35
5. CONCLUSIONES.....	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	37

Índice de Siglas y Abreviaturas

ABA: Abcisic acid (Ácido abcísico)

ABRC: Arabidopsis Biological Resource Center

ATP: Adenosine Tri-Phosphate (Adenosín trifosfato)

ATPase: Adenosinetriphosphatase (Adenosinatrifosfatasa)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CaMV: Cauliflower Mosaic Virus (virus del mosaico de la coliflor)

Col 0: Columbia 0

DNA: Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FOX: Full-length cDNA Over-eXpressing gene hunting system

LB: Lysogenic broth (medio lisogénico)

MES: Ácido 2-N-morfolino etanosilfónico

MS: Medio Murashige-Skoog

NaCl: Cloruro sódico

NASC: Nottingham Arabidopsis Stock Center

NCBI: National Center for Biotechnology Information

OAA: oxalacetato

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PEP: fosfoenol piruvato

PVP: Polivinil pirrolidona

RNA: Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

ROS: Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SOC: Super optimal broth with Catabolite repression

TAIR: The Arabidopsis Information Resource

TBE: Tris/Borate/EDTA

Tris: Tris(hidoximetil)aminometano

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES DEL PROBLEMA DEL ESTRÉS EN LAS PLANTAS

Los recursos agrícolas son la base y el sustento de la población mundial, la cual se encuentra continuamente en crecimiento. Es lógico pensar que para poder abastecer a toda la población, los cultivos deben aumentar su producción y de la misma manera disminuir las limitaciones durante el desarrollo de las plantas.

Entre los factores que limitan de forma más acentuada la producción vegetal están los estreses y en concreto el estrés abiótico es el más significativo. Condiciones como las altas o bajas temperaturas, la sequía, la salinidad, la contaminación de suelos por metales pesados, etc., provocan que no se den las condiciones óptimas para los vegetales, afectando por tanto al crecimiento y a la supervivencia de las plantas. Según Bray y colaboradores (2000) se estima que debido al estrés abiótico existe aproximadamente una reducción del 50% en la producción de los cultivos.

Las plantas son organismos inmóviles, y por tanto, la imposibilidad de movimiento cuando las condiciones del medio no son las adecuadas, les obliga a desarrollar mecanismos de respuesta frente a todo tipo de estreses: plagas, temperatura, sequía, salinidad, etc. Los efectos fisiológicos como consecuencia de las diferentes condiciones adversas son la generación de estrés osmótico (Chinnusamy y col., 2004), la producción de estrés oxidativo (Price y Hendry, 1991; Zhu, 2001), toxicidad iónica (Wyn y Pollard, 1983; Marschner, 1995; Serrano, 1996; Forment y col., 2002), disminución del crecimiento celular, reducción de la evapotranspiración y disminución de la eficiencia fotosintética (Munns y Tester, 2008), o la acidificación intracelular (Katsuhara y col., 1989; Piper y col., 1997; Fernandes y col., 1998). Este último efecto es lo que se conoce como "estrés ácido intracelular". El estrés oxidativo y el estrés ácido intracelular, aunque pueden aparecer de forma primaria, por la aparición de oxidantes y ácidos en el medio, normalmente son estreses secundarios, generados dentro de células que sufren estreses de temperatura, hídricos, salinos, etc.

La homeostasis de pH en plantas ha sido poco estudiada y por tanto, se necesita conocer en mayor profundidad los mecanismos que regulan el pH intracelular en la célula vegetal, así como las consecuencias funcionales de los cambios en el pH citoplasmático. En la planta coexisten varios sistemas que se encargan de regular el pH dentro de la célula.

Relacionado también con el estrés abiótico se encuentra el estrés debido al crecimiento en suelos con pH ácido. En estas condiciones el crecimiento está muy limitado y por tanto la producción vegetal también, debido a que existen problemas de toxicidad provocados por el exceso de iones como el manganeso o aluminio, o por la falta de algunos nutrientes necesarios

como los fosfatos (Kochian y col., 2004). Si bien tanto el estrés ácido como el estrés producido por los suelos ácidos tienen en común su carácter de bajo pH, son dos condiciones totalmente distintas, ya que en el primer caso la variación de pH se produce en el medio intracelular y en el segundo caso se produce en el medio externo, y ésta no tiene por qué ir correlacionada con una acidificación del citoplasma.

En este trabajo se pretende estudiar la homeostasis del pH intracelular, como factor a tener en cuenta en las respuestas que da la planta a diferentes condiciones de estrés y así poder en un futuro mejorar las condiciones de crecimiento vegetal.

1.2. HOMEOSTASIS DE pH

1.2.1. Concepto de homeostasis de pH

La homeostasis, concepto introducido por Walter Cannon, es la tendencia de un organismo vivo a regular su ambiente interno para mantener una condición estable y constante (Cannon, 1928). La célula empleando diversos mecanismos mantiene sus condiciones en un rango óptimo frente a los cambios o estímulos externos. La homeostasis de pH permite a las células vegetales mantener un valor de pH dentro de un estrecho rango pese a la tendencia de numerosos procesos a romper dicho equilibrio, como la toma y el metabolismo de nutrientes, que implica la producción o consumo de protones (H^+). Sin embargo el pH no es constante en toda la planta, varía según el compartimento celular: aproximadamente pH 5 en el apoplasto, entre 5 y 5,5 en la vacuola (adecuado para la acción de las hidrolasas ácidas y los procesos de fusión de vesículas). Aunque sea una simplificación referirse al citoplasma como una fase uniforme, puede considerarse que en su conjunto el pH citoplasmático se encuentra entre 7 y 7,5 (Felle, 2001).

Por tanto se deduce que la homeostasis de pH en la célula vegetal consiste en mantener el pH apropiado en cada compartimento.

1.2.2. Importancia de la homeostasis del pH

El mantenimiento de un pH adecuado en la célula vegetal es primordial, pues numerosos procesos celulares se ven afectados por las variaciones en el pH intracelular:

a) Efecto en las enzimas intracelulares:

Los cambios en el pH afectan a la mayoría de las enzimas debido a varios motivos. Por una parte, la estructura tridimensional de las enzimas puede verse influida por las variaciones en la concentración de protones, que pueden provocar un cambio en el estado de ionización de los aminoácidos polares que constituyen las enzimas (Figura 1.1; Trivedi y Danforth, 1966), y afectar

así a su función.

Por otra parte, el pH puede influir en la actividad de las enzimas, ya que esta varía alrededor de un pH óptimo propio de cada una. El pH puede afectar de esta manera a multitud de procesos como la glucólisis o la síntesis de ARN, ADN y proteínas, procesos en los que intervienen gran cantidad de enzimas. Un ejemplo de esto sería la ADN polimerasa, la cual incrementa su actividad en un pH alto (Nuccitelli y Deamer, 1982).

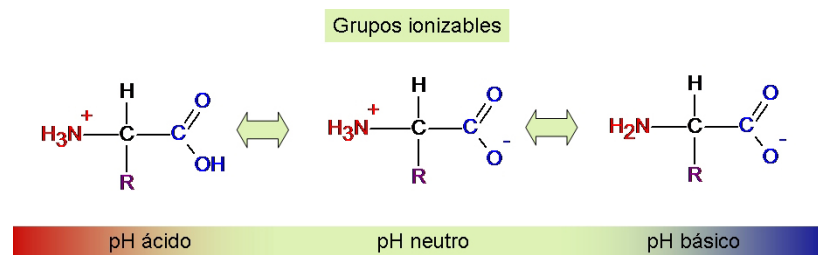


Figura 1.1. Representación del estado de ionización del grupo amino o carboxilo de un aminoácido en función del pH. Figura extraída y modificada de http://b-log-ia20.blogspot.com.es/2009_11_01_archive.html

b) Efecto en el transporte de solutos:

Existen dos tipos de transporte de solutos a través de las membranas celulares, transporte pasivo si se realiza a favor de gradiente de concentración, y transporte activo si se realiza en contra de dicho gradiente. Este último conlleva un aporte de energía, que si proviene de una reacción exergónica se calificará como transporte activo primario (Serrano, 1985).

El transporte activo secundario es un fenómeno que consiste en el transporte de solutos en contra de gradiente de concentración, este se produce gracias a unas bombas de protones que se localizan en las membranas celulares vegetales, las cuales bombean protones en contra de gradiente empleando energía proveniente de la hidrólisis del ATP. Ello crea un potencial electroquímico que servirá de energía para el transporte.

La entrada de nutrientes como el nitrato, fosfato o sulfato en contra de gradiente se realiza gracias al transporte activo secundario. Así pues, es necesaria una correcta regulación de la homeostasis de pH para la formación de los gradientes de protones que posibilitan la nutrición mineral y el transporte de nutrientes entre los órganos vegetales.

c) pH como mensajero celular:

El pH puede ser considerado un mensajero intracelular, ya que sus variaciones, no muy localizadas y lentas, transmiten información y provocan respuestas a nivel celular (Felle, 2001). Como ejemplos de ello: el papel del pH indicando cambios en la intensidad lumínica (Felle y Bertl, 1986), en respuesta a estreses (Mathieu y col., 1996), modificando la conductividad de algunos

canales de potasio (Latz y col, 2007; Becker y col, 2004), como mensajero en el gravitropismo (Scott y Allen, 1999). También se baraja la hipótesis de que los protones actúen como mensajeros secundarios de hormonas como la auxina en el crecimiento celular (Kurkdjian y Guern, 1989) o el ácido salicílico.

d) Efecto en el tráfico vesicular:

Es necesario mantener un pH apropiado en cada compartimento del sistema de endomembranas para el correcto funcionamiento del tráfico de vesículas (Schumacher, 2006). El pH del lumen de estos compartimentos puede dirigir el tráfico vesicular. Así, el pH básico en el endosoma promueve el transporte de éste al Aparato de Golgi, mientras que un pH ácido genera vesículas dirigidas a la vacuola (Van Weert y col., 1997).

1.2.3. Mecanismos de regulación del pH en plantas

Se distinguen dos tipos de mecanismos de regulación del pH en la célula vegetal: mecanismos a corto plazo y mecanismos a largo plazo.

Corto plazo: Capaces de controlar cambios repentinos de pH.

- Tampones citoplasmáticos: Es el sistema más inmediato de regulación de pH para afrontar variaciones en un rango de entre 6 y 8, aunque son insuficientes ante cambios prolongados. En el citosol existen varios compuestos orgánicos no ionizados y sus sales ionizadas cuya formación implica el consumo o producción de protones. Los principales tampones son el bicarbonato, compuestos de fosfato y algunos aminoácidos (especialmente el grupo imidazol de la histidina; Smith y Raven, 1979).
- Biochemical pH-stat: Es un término introducido por Davies (1986) por el cual para regular el pH citoplasmático se realizan una serie de reacciones de carboxilación/descarboxilación. El modelo más aceptado consiste en la síntesis y degradación de malato, mediante la acción coordinada de la fosfoenolpiruvato (PEP, del inglés *Phosphoenolpyruvate*) carboxilasa y la enzima málica (Davies, 1973). El pH óptimo de la PEP carboxilasa es mayor que el pH neutro, de forma que cuando aumenta el pH del citosol, también lo hace su actividad, formándose más oxalacetato (OAA) a partir de la carboxilación del PEP. Para que esto se produzca el CO₂ debe hidratarse y formar ácido carbónico (HCO₃), un ácido débil que se convierte en carboxilato (ácido fuerte) liberando un protón al medio, de esta forma se conseguirá disminuir el pH. El OAA producido se transformará en malato por la acción de la enzima malato deshidrogenasa, empleando el coenzima NADH como poder reductor. Si por el contrario el pH citosólico disminuye, la enzima málica, cuyo pH óptimo es menor que

7, descarboxilará más malato a piruvato requiriendo para ello el consumo de un H^+ , contribuyendo así a subir el pH (Figura 1.2; Smith y Raven, 1979).

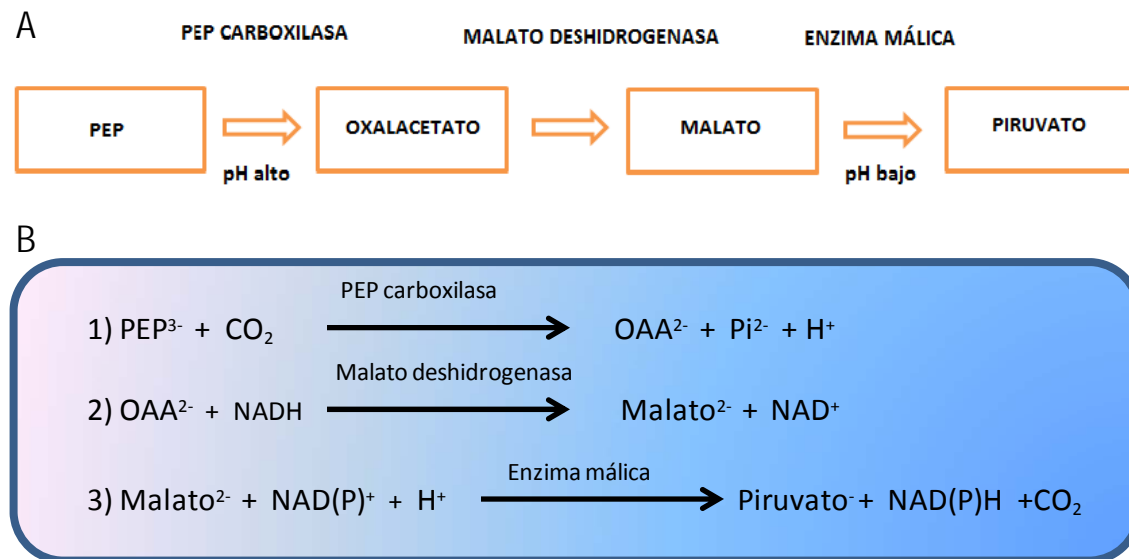


Figura 1.2. Mecanismo del proceso de *Biochemical pH-stat* propuesto por Davis en 1986. Esquema general de síntesis y degradación de malato, mediante la acción coordinada de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la enzima málica en función del pH. B) Reacción de carboxilación del PEP por la acción de la PEP carboxilasa (1). Reacción de obtención de malato a partir del oxalacetato por la acción de la Malato deshidrogenasa (2). Reacción de descarboxilación del malato para dar lugar a piruvato consumiendo un protón (3). El protón que acompaña a la oxidación-reducción del NADH no se incluye porque el estado redox de estas coenzimas se regenera metabólicamente. PEP: Fosfoenolpiruvato; OAA: Oxalacetato; Pi: Fosfato.

Largo plazo: regulan cambios prolongados en el pH.

c) *Biophysical pH-stat*:

Mediante transportadores de protones en las membranas celulares se regula el pH de los compartimentos y del citosol.

c.1. Bombas de protones

- H^+ -ATPasas de membrana plasmática:

Localizadas en la membrana plasmática de hongos y plantas. Transportan protones en contra de gradiente electroquímico utilizando energía de la hidrólisis del ATP, creando un potencial de membrana y un gradiente de concentración.

Este mecanismo de regulación del pH se basa en que el pH óptimo de estas H^+ -ATPasas es de 6,5, mucho menor que el normal en el citosol (7,5), de esta manera, un pH ácido en el citoplasma aumentará la actividad de estos transportadores que expulsarán más protones subiendo así el pH del citosol. Gracias a ello, las H^+ -ATPasas son un mecanismo muy eficiente con el que cuentan las plantas para mantener la homeostasis de pH (Michelet y Boutry, 1995). Sin embargo, si el pH sufre una bajada importante tiene que ser contrarrestado con otro mecanismo

que compense el balance de cargas, ya que se produce una hiperpolarización de la membrana (Serrano, 1989; Thibaud y col., 1986).

Esta bomba también controla procesos de transporte fundamentales para la planta, como la toma de nutrientes por la raíz o la carga del floema con azúcares. Debido a la importancia que tiene en multitud procesos fisiológicos su actividad está regulada por varios mecanismos diferentes, siendo el más común a nivel post-traducciona mediante la fosforilación y desfosforilación de un dominio autoinhibitorio del que dispone (modificaciones controladas a su vez por el pH al modular la actividad de kinasas y fosfatasa; Benito y col., 1992).

- H⁺-ATPasa de tipo V y pirofosfatasa vacuolar:

Se encargan de generar en el tonoplasto un potencial electroquímico y regular el pH en diversos compartimentos (Zhen *et al.*, 1997). Localizadas en la vacuola y en las vesículas del sistema de endomembranas. En este tipo, el transporte de H⁺ se realiza hacia el interior de la vacuola o vesículas, acidificándolas y generando el gradiente electroquímico necesario para el transporte activo secundario a través de sus membranas (Krebs y col., 2010).

c.2. Otros transportadores de protones

En la célula vegetal existen otros sistemas que transportan protones contribuyendo también a la regulación del pH en los distintos compartimentos celulares, aunque ésta no sea su principal función. Los antiportadores catión/H⁺ y anión/H⁺, y los simportadores anión/H⁺ o de azúcares y aminoácidos forman este grupo.

1.2.4. Los ácidos débiles como herramienta para el estudio de la homeostasis de pH

Los ácidos débiles son aquellos que en disolución acuosa mantienen un equilibrio entre su forma protonada o no disociada (HA) y su forma no protonada o disociada (A⁻). Este equilibrio dependerá del pH del medio en el que se encuentre el ácido y del pK_a del ácido (pH en el cual [HA] = [A⁻]). Un pH mayor que el pK_a desplazará el equilibrio hacia la forma desprotonada, mientras que un pH menor a éste lo dirigirá hacia la forma protonada (Figura 1.3).

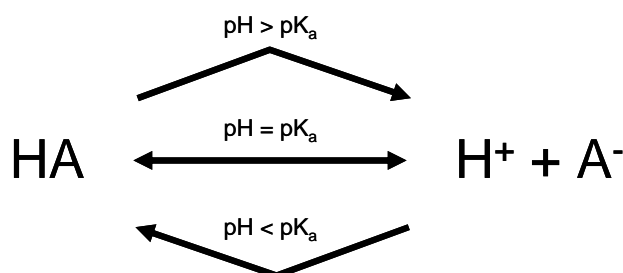


Figura 1.3. Representación del equilibrio de la forma protonada y desprotonada de un ácido débil en función de su pK_a y el pH en el que se encuentre disuelto. Extraído de Oms (2012).

Como anteriormente se mencionó, el pH citosólico en células vegetales es de 7,5

mientras que el extracelular se encuentra entre 5 y 5,5. Así pues, en el medio exterior existe cierta cantidad de ácido débil protonado, esto le confiere permeabilidad para poder difundir y entrar al citosol, probablemente a través de proteínas llamadas porinas. Allí se disociará, generando protones debido al aumento de pH que acidificarán el citosol y alterarán la homeostasis sin modificar el pH externo (Figura 1.4).

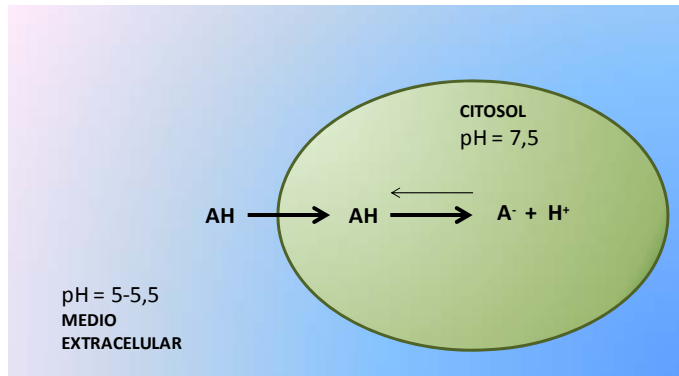


Figura 1.4. Esquema del modo de acción de los ácidos débiles en la célula vegetal.

En este trabajo se ha empleado el ácido acético, del cual entre el 10-15% está en su forma protonada permeable cuando se encuentra en un pH de 5,5 como el que existe en el apoplasto. Un porcentaje mayor de ácido accesible al citosol sería demasiado tóxico, ya que además del descenso del pH intracelular se produce la acumulación del anión del ácido.

El hecho de que estos ácidos débiles causen una acidificación intracelular similar a la que se da frente a diversos estreses, sin que se disminuya el pH del medio extracelular, los hace perfectos para el estudio de la regulación de la homeostasis de pH (Abbott y col., 2007; Mira y col., 2010; Niños, 2011).

1.3 EMPLEO DE *Arabidopsis thaliana* COMO SISTEMA MODELO

Un organismo modelo es aquel en el que las estrategias de genética directa y reversa pueden llevarse a cabo con facilidad y sus resultados se pueden extrapolar a otras especies. La principal característica que debe cumplir un organismo para ser considerado modelo es que se puedan correlacionar los diferentes genes con fenotipos gracias a la existencia de colecciones de mutantes. Debe tener un tamaño reducido para facilitar su manejo, un ciclo de vida corto, descendencia abundante y un mantenimiento simple y económico en el laboratorio. Por otro lado, es importante que posea una variabilidad fenotípica y genotípica, y que los fenotipos de interés se puedan observar y medir de manera sencilla.

Arabidopsis thaliana (Figura 1.5) es una planta autógama, perteneciente a la familia de las brasicáceas o crucíferas. Pese a que carece de importancia agronómica, muestra unas características que hacen que sea el modelo vegetal más empleado en biología celular y

molecular (Meyerowitz, 1989). Es un organismo eucariota y pluricelular, por lo que permite abordar estudios de respuesta frente a estreses. Posee un tamaño reducido (30-40 cm de altura), un ciclo de vida corto (2-3 meses), una elevada producción de semillas (>10000 semillas/planta), y un genoma pequeño (125 Mb) y completamente secuenciado.



Figura 1.5. Diferentes estadios de crecimiento de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Fotografía tomada de <http://tuebingen.mpg.de/en/news-press/press-releases/detail/micro-rnas-in-plants-regulation-of-the-regulator.html>.

1.4. ESTRATEGIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS

Existen diferentes estrategias para identificar los posibles genes involucrados en la tolerancia al estrés.

La genética directa consiste en la selección de un individuo de una población que posee el fenotipo deseado, y en determinar la ruta o gen causante del fenotipo. En este tipo de estrategias se emplean agentes mutagénicos, como el EMS (etil metano sulfonato), los rayos ultravioleta, los transposones o el T-DNA que provocan variaciones en el genoma. Esta estrategia comienza generando una colección de mutantes, sobre los cuales se realiza un rastreo en busca del fenotipo de interés. Una vez seleccionado el mutante se realiza un análisis genético y funcional para identificar el gen que determina ese fenotipo.

Por otro lado, la estrategia de genética reversa radica en que se selecciona un gen que posee una función esencial en un proceso, como por ejemplo la tolerancia a estrés. Partiendo de esta hipótesis, se realiza un análisis funcional del gen, como por ejemplo obteniendo mutantes de sobreexpresión o de pérdida de función, y se estudian los fenotipos de las plantas obtenidas.

La estrategia ómica analiza desde una visión global las condiciones de la célula en una situación de estrés, ya sea la expresión genética, proteínas o metabolitos.

Cada estrategia aporta un tipo de información complementaria, por tanto al estudiar un tema, es importante utilizar varias vías de estudio a la hora analizar un fenómeno.

Los rastreos de mutantes son una alternativa para asignar la función a un gen, estos

estudios han sido cruciales para consolidar a *A. thaliana* como organismo modelo ya que las características de este organismo son idóneas para este tipo de investigación (Koornneef y Meinke, 2010). En las primeras investigaciones se realizaron rastreos de variedades presentes en la naturaleza identificando los cambios fenotípicos. El EMS fue el primer agente mutagénico que se utilizó para el estudio de mutantes, siendo aún uno de los más utilizados (Koornneef y Meinke, 2010). Por ejemplo, se aislaron mutantes con diferente forma de la hoja, tiempo de floración y morfología floral (McKelvie, 1962; Koornneef y col., 1983). Gracias al cultivo en medios definidos se pudieron obtener también mutantes deficientes en la síntesis o percepción de hormonas como el etileno (Guzmán y Ecker, 1990) y otras rutas biosintéticas (Li y Rédei, 1969). Rastreos bajo condiciones bióticas y abióticas concretas permitieron también análisis de fotomorfogénesis (Quail, 1998) y de interacción planta-patógeno (Glazebrook y col., 1997). Una vez los fenotipos de fácil ensayo fueron analizados, los rastreos se volvieron más sofisticados con el diseño de fondos genéticos que llevaron a profundizar más en estas cuestiones (Page y Grossniklaus, 2002).

El éxito de un rastreo de mutantes depende principalmente de dos factores: primero, la elección de un adecuado fondo genético; y segundo, un procedimiento simple y robusto para identificar los mutantes de interés. Para recuperar mutantes con fenotipos llamativos es preferible un fondo silvestre mientras que si se quiere detectar loci redundantes para un gen identificado, no lo es. Un gen redundante es aquel cuya función puede ser realizada por otro gen de la misma ruta, y cuyo papel en un proceso concreto solo se puede identificar por el doble mutante. Los mutantes que no llevan de manera inmediata a fenotipos diferenciables usando fondos silvestres tampoco se pueden identificar. Actualmente, las estrategias de transgénesis que permiten la selección por resistencia a herbicidas o antibióticos, y los genes reporteros que permiten construir fenotipos visibles permiten a los investigadores obtener un fenotipo medible para casi todos los procesos en el ciclo de la vida de una planta (Page y Grossniklaus, 2002).

Por tanto, para realizar un buen rastreo es fundamental disponer de un fenotipo altamente reproducible y específico. Diversos recursos comerciales como Lehle Seeds, el ABRC, y el NASC proporcionan diferentes tipos de semillas mutagenizadas con precios sin ánimo de lucro "listas para rastreo", incluyendo líneas obtenidas mediante EMS, radiaciones ionizantes o inserciones de T-DNA o transposones. La mayoría están generadas en un número limitado de fondos genéticos muy usados (como Columbia, Wassilewskija y Landsberg erecta), y estos genotipos tienen en común una floración temprana que los hace adecuados para los experimentos de mutagénesis (Koornneef y Meinke, 2010). En este trabajo se ha empleado una colección de mutantes de activación transcripcional por inserción de T-DNA (colección de Somerville y Scheible) y una colección de sobreexpresión de cDNAs (Líneas FOX; Ichikawa y col., 2006).

1.4.1. Creación de colecciones de mutantes de T-DNA en *A. thaliana*

Para producir una colección de mutantes en primer lugar se necesita crear un vector que contenga la secuencia de T-DNA deseada. El vector se suele construir en *E. coli* y suele contener un promotor que puede expresarse en *A. thaliana* dirigiendo un gen que proporcione resistencia a un agente de selección.

Posteriormente, *Agrobacterium tumefaciens* se transforma con dicho plásmido y mediante el método de inmersión floral en una suspensión de esta bacteria se transforman las plantas denominadas población T₀, insertándose el T-DNA en el genoma de los óvulos en desarrollo. Tras autofecundarse, se obtienen las semillas de la población T₁ las cuales se siembran en un medio con el antibiótico apropiado para seleccionar aquellos individuos que contienen el T-DNA. Cada uno de estos individuos se recoge por separado, obteniendo de sus semillas la población T₂ que ya puede ser usada en los rastreos.

Para el estudio de un fenotipo normalmente interesa trabajar con líneas homocigotas. Ya que la T₁ es heterocigota para la inserción, se genotipan o fenotipan múltiples individuos de la T₂ para identificar los homocigotos que habrán segregado. Es posible que no solo se haya producido la inserción de un único T-DNA y por tanto la dificultad para obtener homocigotos de una única inserción se complica bastante. Además, es posible que el T-DNA insertado no sea el responsable del fenotipo obtenido, por lo que habrá que comprobar que el fenotipo cosegrega junto al T-DNA.

Este método presenta varias ventajas, en primer lugar es una técnica que permite obtener mutaciones estables, la frecuencia de inserción del T-DNA por planta es baja, facilitándose el análisis genético y la obtención de pocas mutaciones no deseadas, es una técnica de alto rendimiento y permite tanto la pérdida como la ganancia de función dependiendo del plásmido/T-DNA utilizado (Alonso y Ecker, 2006). Aunque la principal ventaja de esta técnica es la fácil localización de la inserción en el genoma, que se puede hacer por diferentes técnicas como el rescate plasmídico, TAIL-PCR, etc., conocer la secuencia del T-DNA permite establecer qué tipo de experimento hay que realizar para poder identificar el gen, y así, estudiar de una forma más directa este fenotipo y la mutación.

No obstante, la baja frecuencia de inserción también hace que se necesite una gran población para conseguir la saturación del genoma.

1.4.2. Mutantes de pérdida de función en *A. thaliana*

Los mutantes de pérdida de función pueden aparecer en la naturaleza espontáneamente por errores durante la división celular. En estos casos la aparición de mutaciones puntuales,

reordenamientos de los cromosomas o deleciones puede causar que ya no se expresen un gen, o que el mensajero no codifique para la proteína en cuestión. Por otro lado estos mutantes se pueden generar en el laboratorio mediante inserción de fragmentos de ADN al azar o utilizando sustancias químicas.

Los mutantes de pérdida de función en rastreos se emplean para diseccionar una ruta genética determinada. Según el lugar de inserción del T-DNA (Figura 1.6), se pueden producir o no alteraciones:

A) El T-DNA se inserta en una región intergénica por lo que no se observa modificación alguna de la expresión de genes, por tanto el fenotipo no difiere.

B) Si el T-DNA se inserta en una región codificante, se produce la interrupción del gen provocando una mutación que suele ser recesiva.

C) Al introducirse en una región codificante se produce un mensajero truncado que tras su traducción genera proteínas que difieren de la original y puede tener su función alterada.

D) La inserción se produce en una zona reguladora o en el promotor impidiendo la transcripción o modificando su expresión.

Dentro de estas cuatro posibilidades el T-DNA se puede haber integrado como un único fragmento o como copias en tándem, con orientaciones iguales o diferentes.

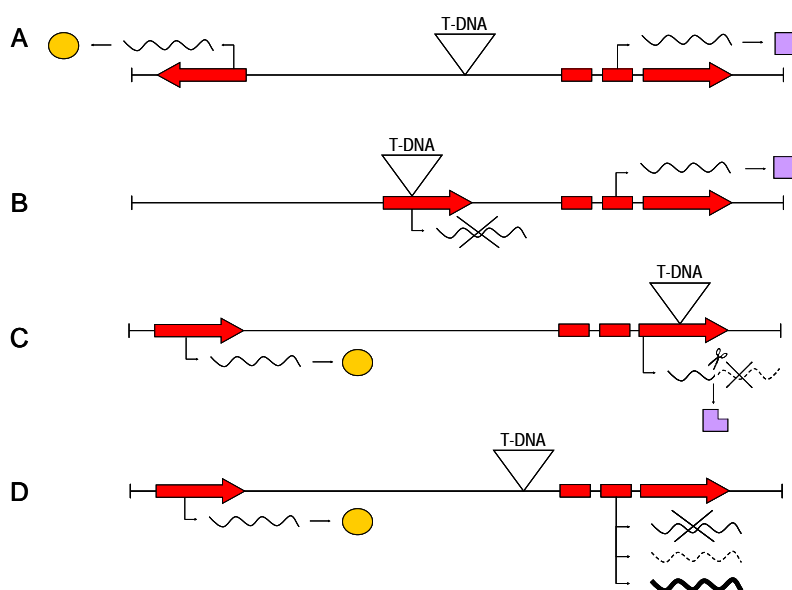


Figura 1.6. Diferentes posibilidades de integración de un T-DNA en el genoma (A-D). Se muestra la expresión de dos genes influenciados o no por el inserto. El nivel de transcritos es proporcional al grosor del mensajero y está indicado por una línea ondulada. En rojo se muestran los exones. Las proteínas se representan con color amarillo o violeta. Figura extraída de Oms (2012).

1.4.3. Activación transcripcional en *Arabidopsis thaliana*

Anteriormente se ha expuesto que el T-DNA se puede utilizar para la realización de mutagénesis insercional. Estas mutaciones suelen ser de pérdida de función, recesivas y para realizar un rastreo tienen una serie de limitaciones. Por ejemplo, si existe redundancia génica

podría ocurrir que una mutación en un gen de interés no sea identificada. Aparte, pueden existir genes cuya pérdida de función resulte letal, por lo que no sería posible estudiar el mutante en dicho gen para determinar su función.

Para erradicar estos problemas, se puede emplear otra técnica como la activación transcripcional que se basa en la inserción de un T-DNA en el genoma de *A. thaliana* el cual presenta un activador transcripcional. Este suele ser el 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). El objetivo es obtener mutantes dominantes de ganancia de función. Por otra parte hay probabilidad de que la inserción tenga lugar interrumpiendo el gen lo que deriva en una pérdida de función.

Dependiendo de la posición de la inserción se pueden dar diferentes situaciones (Figura 1.7). Si se inserta en una región codificante se producirá la disrupción del gen. Si esta mutación es recesiva en la T_1 no se apreciará en el fenotipo pero sí en la T_2 en las líneas homocigotas que adquieren la inserción. Por otra parte si el resultado es una mutación dominante y se produce la disrupción de un gen, en este caso el fenotipo se diferenciará en la T_1 y $\frac{1}{4}$ de T_2 .

Si por otra parte se inserta en una región intergénica, los genes adyacentes verán incrementada su expresión gracias al activador 35S.

Para conseguir una saturación del genoma se necesita un gran número de plantas ya que la frecuencia de inserción de T-DNA por planta es baja. Por otra parte esto supone una ventaja ya que facilita el análisis genético así como la localización de la inserción en el genoma, ya que la región mutada queda "marcada" por el T-DNA.

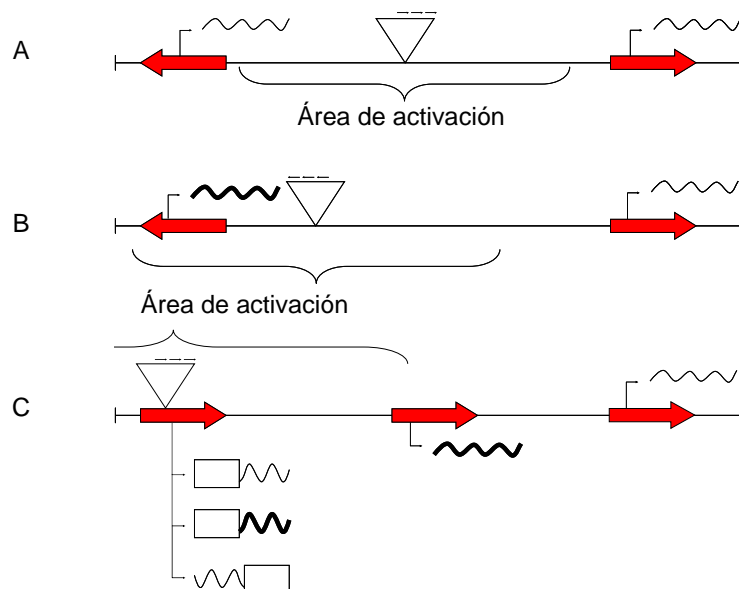


Figura 1.7. Diferentes posibilidades de integración de un T-DNA con activación transcripcional en el genoma (A-C). Se muestra la expresión de dos genes influenciados o no por el inserto. El nivel de transcritos es proporcional al grosor del mensajero y está indicado por una línea ondulada. En rojo se muestran los genes. El rectángulo seguido del transcrito representa una delección. Figura extraída de Oms (2012).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos generales de este Trabajo Final de Grado (TFG) son: obtener nuevos mutantes de *Arabidopsis thaliana* que sean tolerantes en condiciones de crecimiento con ácido acético, así como la identificación de los posibles genes responsables de la tolerancia a estrés ácido intracelular en mutantes obtenidos previamente en el laboratorio del profesor Ramón Serrano.

Para la consecución de estos objetivos, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Aislamiento de líneas transgénicas de *A. thaliana* tolerantes a ácido acético, durante la germinación y establecimiento de plántula, a partir de la colección FOX de plantas transgénicas sobreexpresoras de cDNAs.
2. Identificación de la zona de inserción del T-DNA y de los posibles genes responsables de la tolerancia a estrés ácido intracelular mediante rescate plasmídico en líneas mutantes obtenidas en trabajos previos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. RASTREO DE MUTANTES TOLERANTES A ÁCIDO ACÉTICO POR APARICIÓN DE COTILEDONES VERDES

3.1.1. Material vegetal

3.1.1.1. *Arabidopsis thaliana*

La especie vegetal utilizada en este trabajo de investigación ha sido *Arabidopsis thaliana*.

Las líneas utilizadas para el rastreo de mutantes con ácido acético pertenecen a una colección de semillas del RIKEN. Estas líneas se conocen como líneas FOX (del inglés *Full-length cDNA Over-expressing gene hunting system*) y fueron generadas en el fondo genético Columbia 0 (Col-0) por Ichikawa y colaboradores (2006). Esta colección, se distribuye por lotes compuestos cada uno de unas mil líneas (8 semillas por línea), y cuando esté finalizada estará compuesta aproximadamente por 17000 líneas. En el inicio de este TFG solo estaban generadas unas 11000 que fueron las que se solicitaron (códigos pss10001 al pss10011).

Algunos de los componentes principales del vector utilizado en la generación de esta colección son: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, un cDNA de *Arabidopsis thaliana*, un gen de resistencia a higromicina (el cual permite la selección en cultivo *in vitro*), y el terminador NOS (Figura 3.1).

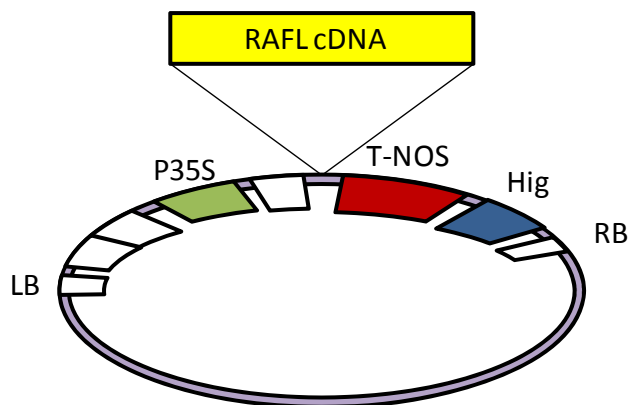


Figura III.1. Esquema del vector utilizado para la generación de las líneas FOX por Ichikawa y col. (2006). LB, borde izquierdo; RB, borde derecho.

El ecotipo silvestre utilizado como control de esta colección fue Columbia 0 (Col-0) que fue suministrado por el NASC (N1092).

3.1.2. Medios y soluciones de crecimiento

Todos los medios de cultivo utilizados en este proyecto se esterilizaron en autoclave (Mediclave P Selecta) durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión. El ácido acético y

las sustancias termolábiles como los antibióticos (ampicilina e higromicina) o el herbicida BASTA, se adicionaron al medio de cultivo ya estéril y enfriado por debajo de los 50°C. Los medios se conservaron a 4 °C.

3.1.2.1. Medio MS

De forma rutinaria para el cultivo *in vitro* de *A. thaliana* se utilizó el medio Murashige-Skoog (MS; Murashige y Skoog, 1962). Está compuesto de 0,4% (p/v) de sales MS (Sigma-Aldrich, M5524), 1% (p/v) de sacarosa, 10 mM de MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico) y 0,8% (p/v) fitoagar (Duchefa Biochemie). En cuanto al pH, este se ajustó a pH 5,7 con Tris [Tris(hidroximetil)aminometano], aunque en los experimentos en los que el medio se suplementó con ácido acético y en sus controles, el pH se ajustó a 5,5.

El ácido acético se preparó pesando 5,48 g de Tris base polvo, se añadió 2,418 mL de ácido acético glacial (17,5 M) y se enrasó a 50 mL con H₂O mQ. De esta manera, se obtuvo un stock de ácido acético 1 M pH 5,5. La mezcla se esterilizó en campana mediante filtración, a través de unos filtros estériles de 45 µm.

3.1.2.2. Solución nutritiva

La solución nutritiva es la solución de minerales usada para regar las plantas de *A. thaliana* cultivadas en invernadero. Está compuesta por los siguientes macro y micronutrientes: 4 mM KNO₃, 4 mM Ca(NO₃)₂, 1,5 mM MgSO₄, 0,75 mM KH₂PO₄, 0,035% (p/v) EDTA-FeSO₄, 70 µM H₃BO₃, 14 µM MnCl₂, 0,5 µM CuSO₄, 1 µM ZnSO₄, 0,2 µM Na₂MoO₄, 10 µM NaCl y 0,01 µM CoCl₂, adquiriendo un pH de 6,5. Esta solución fue preparada por el personal del invernadero de la Universidad Politécnica de Valencia.

3.1.3. Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

3.1.3.1. Esterilización de semillas

Las semillas se alicuotaron en tubos de 1,5 mL y se esterizaron superficialmente tratándolas en primer lugar con 1 mL de una solución de etanol al 70% (v/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v) durante 15 minutos. Posteriormente se eliminó el etanol y se añadió 1 mL de una segunda solución de lejía al 2,5% (v/v) y Tritón X-100 0,05% (v/v). Por último, las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril (lavados de 1 mL). Para una correcta estratificación se guardaron en agua estéril a 4°C durante 3 días.

3.1.3.2. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* se llevó a cabo empleando placas de cultivo de 9 cm de diámetro o en placas cuadradas de 12 cm de lado colocadas en horizontal. En el caso de las placas cuadradas se vertieron 80 mL de medio por placa, mientras que para las placas redondas se utilizaron 30 mL de medio por placa. Cuando fue necesario, el medio se suplementó con la cantidad correspondiente de ácido acético o higromicina.

Las placas, una vez sembradas con las semillas, se sellaron con cinta porosa (Micropore). El cultivo se realizó a 23°C de temperatura, un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz de intensidad $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ y 8 de oscuridad) y humedad relativa del $70 \pm 5\%$.

3.1.3.3. Cultivo en tierra

El cultivo de *A. thaliana* en invernadero se realizó en macetas de plástico cuadradas de 7 x 7 x 6,5 cm. Las macetas se rellenaron con una mezcla de Sustrato Profesional (Pelemix España S.L.), Vermiculita exfoliada (Perlindustria 2002) y Perlita Premiun (Gramoflor), en proporción 2:1:1.

Una vez crecidas las plántulas de cultivo *in vitro* se pasaron a tierra, para ello se transplantaron a la mezcla de turba, vermiculita y perlita y se colocaron en el interior de una cámara especializada para el cultivo de *A. thaliana* con condiciones similares a las de cultivo *in vitro*. Las macetas se regaron con solución nutritiva, de composición citadas en apartado 3.1.2.2, dos veces por semana.

3.1.4. Rastreo de mutantes

3.1.4.1. Ensayo de aparición de cotiledones

Rastreo primario:

Para el rastreo de mutantes tolerantes a ácido acético se emplearon placas de cultivo de 9 cm de diámetro, suplementados con 6 mM de ácido acético donde se sembraron las semillas de las líneas FOX. A esta población inicial, que es el conjunto de semillas empleadas en el rastreo, se le denomina S_0 .

La población S_0 se analizó inicialmente mediante el rastreo primario, realizado con una alta densidad de semillas por placa (≈ 2000 semillas/placa) en medio MS pH 5,5 suplementado con 6 mM de ácido acético. Para lograr una correcta distribución de las semillas en la superficie del medio de cultivo, se extendió previamente en cada placa una solución de agarosa 0,1% (p/v) con la ayuda de perlas de vidrio estériles, creando así una capa fina y uniforme sobre el

medio de cultivo. Las 2000 semillas de cada tubo, esterilizadas (ver apartado 3.1.3.1), se resuspendieron en 0,5 mL de la solución de agarosa, se depositó la solución con las semillas en la placa, y se extendieron con ayuda de un asa de plástico estéril, asegurando así un reparto homogéneo por la placa. Tras la siembra, las placas se colocaron en la cámara de cultivo *in vitro*.

A partir de los 5 días las semillas comenzaron a emerger la radícula y se rescataron los posibles mutantes putativos (población S_1), aquellos que presentaron ambos cotiledones expandidos y verdes, hasta el día 12 como máximo. Estos candidatos se traspasaron a medio MS pH 5,5 para que la raíz creciera y la plántula adquiriera un tamaño adecuado, y posteriormente se pasaron a tierra, junto con su control adecuado (Col-0), para obtener la descendencia (S_2) de cada uno de ellos.

Rastreo secundario:

La generación S_2 se analizó mediante un rastreo secundario con baja densidad de semillas (320 semillas por placa cuadrada de 12 x 12 cm) en medio MS pH 5,5 suplementado con 3,5 mM de ácido acético. Las semillas se sembraron de forma individual en las placas cuadradas divididas en 8 porciones, en las que se sembraron las líneas mutantes (40 semillas/mutante) con sus controles adecuados. También se sembraron semillas de las líneas en medio MS como control de germinación.

El objetivo de este rastreo secundario fue confirmar el fenotipo de resistencia a ácido acético que se observó en el rastreo primario, contando como día 0 de germinación cuando se sacaron de la nevera y se pusieron en la cámara de cultivo *in vitro*. Se tomaron datos de germinación (cotiledones verdes y expandidos) desde el día 0 hasta el día 7. En este experimento se realizaron 3 réplicas.

3.1.4.2. Determinación de la tolerancia a higromicina en los mutantes putativos

Aunque el objetivo de este trabajo era obtener mutantes confirmados de tolerancia a ácido acético, esta investigación no acaba aquí y el siguiente paso sería cruzar los mutantes confirmados con el ecotipo Col-0 para obtener plantas F_1 y F_2 que nos permitirán conocer si el fenotipo es dominante o recesivo, y saber si el fenotipo cosegrega con la inserción de T-DNA. Es necesario pues, estar seguro de que la planta de la S_2 que se pasa a maceta, para realizar los cruces, lleva el T-DNA y para ello se siembra en higromicina (*in vitro*) antes de pasarla a una maceta.

Aunque teóricamente las líneas proporcionadas por el RIKEN se distribuyen como líneas puras, cabe la posibilidad de que algunos de los mutantes seleccionados en el rastreo

secundario presenten cierto grado de heterocigosis o no presenten T-DNA. Con el fin de confirmar si los individuos seleccionados son resistentes y asumir de esta manera que son homocigotos para el T-DNA se sembraron un total de 160 semillas por placa de cultivo y línea en medio sólido MS pH 5,7 suplementado 25 mg/L de higromicina. Tras la germinación, se observó el porcentaje de germinación de cada uno de los mutantes en medio selectivo y así se obtuvo el grado de heterocigosis en cada caso.

3.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DE INSERCIÓN DEL T-DNA MEDIANTE RESCATE PLASMÍDICO EN MUTANTES CONFIRMADOS TOLERANTES A ÁCIDO ACÉTICO

3.2.1. Material biológico

3.2.1.1. *Arabidopsis thaliana*

En este apartado del TFG se utilizaron algunos de los mutantes confirmados anteriormente en el laboratorio, en los que el fenotipo estaba asociado a la presencia del T-DNA (Oms, 2012). Estas líneas seleccionadas proceden de la colección de semillas donadas por los investigadores Wolf Sheible y Chris Somerville (colección de Somerville).

Esta colección (N31100) está formada aproximadamente por 63000 líneas obtenidas por transformación del ecotipo silvestre (Columbia, Col-2) con el vector pSKI015 de Detlef Weigel (Figura 3.2; Weigel y col., 2000).

Los principales componentes de este vector desde el borde izquierdo (LB) hasta el borde derecho (RB) del T-DNA son:

- El gen de resistencia al herbicida glufosinato o BASTA (gen *BAR*), que permite la selección en tierra y en cultivo *in vitro* de las líneas transgénicas.
- El plásmido pBluescriptKS(+) (Stratagene) que contiene el gen bacteriano de resistencia al antibiótico ampicilina. Gracias a este plásmido es posible realizar la técnica de rescate plasmídico para localizar así donde se ha insertado el T-DNA en el genoma.

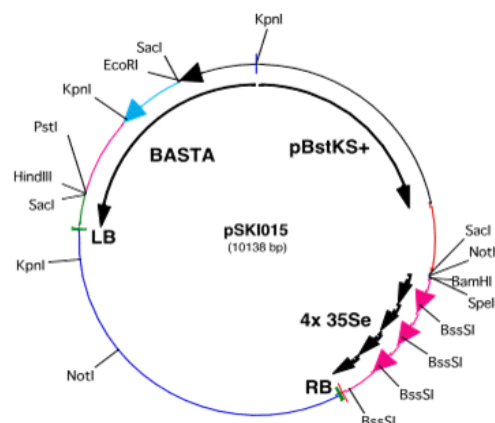


Figura 3.2. Esquema del vector pSKI015 empleado en la generación de las líneas mutantes de activación transcripcional (Weigel y col., 2000).

- Cuatro copias del activador de la transcripción 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), esto proporciona la capacidad de aumentar la expresión de los genes adyacentes a la inserción de T-DNA desde su caja TATA.

3.2.1.2. *Escherichia coli*

En este trabajo final de grado se utilizaron dos cepas de *E. coli* para el rescate plasmídico. Una de ellas corresponde a la cepa XL1-Blue MRF', de genotipo: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^q\Delta\Delta M15 \text{ Tn5 (Kan}^r\text{)]}$, cuyas mutaciones *mcrA*, *mcrB*, y *mrr* impiden que se digiera el ADN metilado de organismos superiores. La segunda cepa fue DH5 α (que en principio si que podría digerir el ADN metilado): $F^- \text{ F80lacZ}\Delta\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 \text{ recA1 endA1 hsdR17}(r_k^-, m_k^+) \text{ phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 l}^-$.

3.2.2. Manipulación y crecimiento de *A. thaliana*

3.2.2.1. Cultivo *in vitro* y en invernadero

Se partió de las semillas de la F₂ de líneas tolerantes a ácido acético con las que se hizo el análisis de cosegregación en trabajos anteriores en el laboratorio (Oms, 2012). Estas semillas se esterilizaron (ver apartado 3.1.3.1) y se sembraron en medio MS suplementado con 50 mg/L de BASTA para pasar posteriormente a maceta solamente las plantas que tuvieran el T-DNA (en homocigosis o heterocigosis). Por cada línea mutante se transplantaron 8 plántulas a macetas (ver apartado 3.1.3.3) y se cultivaron en el invernadero en condiciones de día corto (8 horas de luz, 16 horas de oscuridad) para que produjeran mucho material aéreo. El cultivo en invernadero se realizó como se indica en el apartado 3.1.3.3.

3.2.3. Crecimiento de *E. coli*

3.2.3.1. Manejo de *E. coli*

Durante el desarrollo de este proyecto final de grado se utilizaron técnicas estándar en el manejo de esta bacteria. Para el crecimiento en medio líquido de *E. coli*, se utilizaron tubos de 15 mL o matraces estériles (de diferentes volúmenes), que se colocaron en un incubador orbital a 37°C con una velocidad de agitación de entre 200 y 250 rpm, para mantener una aireación y agitación adecuada. En el caso de crecimiento en medio sólido, las placas se depositaron invertidas en una estufa a 37°C.

3.2.3.2. Medios de cultivo

3.2.3.2.1. Medio LB

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio LB, compuesto por 1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl. Cuando fue necesario solidificarlo para repartirlo en placa de cultivo redonda de 9 cm de diámetro, se añadieron 15 g/L de agar. El antibiotico ampicilina, cuando fue necesario su uso, se adicionó una vez enfriado el medio a 50°C a una concentración de 100 mg/L de medio.

3.2.3.2.2. Medio SOC

Durante el proceso de transformación de *E. coli* (ver apartados 3.2.3.4 y 3.2.3.5) se empleó el medio SOC que está compuesto por 2% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura, 10 mM NaCl y 2,5 mM KCl. El pH se ajustó a 7 con NaOH y, después de autoclavar se añadieron soluciones estériles de MgCl₂ y glucosa a una concentración final de 10 y 20 mM, respectivamente.

3.2.3.3. Preparación de células competentes

Para la fabricación de células electrocompetentes de la cepa XL1-Blue MRF' en primer lugar, se inocularon 2 mL de un cultivo saturado de *E. coli* en 200 mL de medio LB sin antibiótico, incubándose a 37°C hasta alcanzar una A₆₀₀ de 0,8. Las células se centrifugaron en frío a 4000 rpm durante 10 minutos para recogerlas en un precipitado. Se realizaron dos lavados con agua estéril fría y uno con glicerol frío al 10% (v/v). Por último, las células se resuspendieron en 0,8 mL de glicerol frío al 10%, distribuyéndose en alícuotas de 100 µL. Tras congelarlas en nitrógeno líquido se almacenaron a -80°C.

También se utilizaron células quimiocompetentes de la cepa DH5α preparadas por la doctora Lola Planes (Técnico del laboratorio del profesor Serrano) siguiendo el protocolo Inoue y colaboradores (1990).

3.2.3.4. Transformación por electroporación

La solución con los plásmidos a introducir fue añadida a una alícuota de células competentes y la mezcla se depositó en una cubeta de electroporación previamente enfriada de 0,1 cm de separación entre electrodos. La electroporación de las células se consiguió mediante la máquina de descargas Gene Pulser (Bio-Rad) a 200 Ω, 25 µF y 1,7 kV. A continuación se añadieron 0,9 mL de medio SOC y se incubó a 37°C durante 60 minutos en

agitación. Finalmente las células fueron extendidas en una placa de medio LB con el antibiótico ampicilina.

3.2.3.5. Transformación por choque térmico

Se añadió la solución con los plásmidos a transformar a una alícuota (100 μ L) de células quimiocompetentes y se mantuvieron 30 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo se realizó un choque térmico de 90 segundos a 42°C en un bloque térmico, e inmediatamente se colocó en hielo durante otros 5 minutos. A continuación, se agregó 1 ml de medio SOC y se incubó en agitación durante 1 hora a 37°C. Finalmente las células se extendieron en placas LB con ampicilina.

3.2.3.6. Mantenimiento de las cepas de *E. coli*

Las diferentes cepas o líneas bacterianas utilizadas en este proyecto, fueron mantenidas a -80°C. Para ello, se colocó 1 mL de un cultivo bacteriano saturado en un criovial, 230 μ L de glicerol 80%, se mezcló y se guardó a -80°C

3.2.4. Purificación y análisis de los ácidos nucleicos

3.2.4.1. Aislamiento de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

El ADN se aisló partiendo de aproximadamente 2 g de hojas de plantas crecidas en el invernadero (2 meses de edad), que fueron trituradas en mortero con nitrógeno líquido. El homogeneizado se transfirió a tubos de centrifuga que se incubaron a 60°C durante una hora con 10 mL de tampón de extracción [2% de CTAB, 20 mM de EDTA, 1,4 M de NaCl, 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1% de PVP (Mr 40000) y 0,2% β -mercaptoetanol]. A continuación, se añadieron 10 mL de cloroformo isoamílico 24:1 (v/v) y se agitó en vórtex unos 10 segundos, después se centrifugó a 4°C y 5000 rpm durante 10 minutos. Más tarde se recogió el sobrenadante y transfirió a nuevos tubos a los que se añadieron otros 10 mL de cloroformo, se volvió a centrifugar a 4°C y 5000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante de nuevo, añadiéndole 1 mL de CTAB al 10% precalentado a 60°C e incubando la mezcla a la misma temperatura durante 10 minutos. Tras este paso se añadieron a cada tubo 20 mL de agua mQ y se incubaron a 4°C al menos durante 1 hora, luego se centrifugaron a 4°C y 12000 rpm durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado resultante se resuspendió en 2,5 mL de TE 1X 1 M de NaCl. Se añadió 1 mL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), agitándose en vórtex y centrifugando la mezcla a temperatura ambiente y 5000 rpm durante 20 minutos. Finalmente, se recogió la fase superior y los ácidos nucleicos

fueron precipitados a 4°C durante al menos 2 horas mediante la adición de 2 volúmenes de etanol 96% frío. Los tubos se centrifugaron a 4°C y 13000 rpm durante 20 minutos y el precipitado resultante se lavó con etanol 70% y se secó a temperatura ambiente. Una vez seco, se resuspendió en 300 µL de agua mQ con 40 ng/mL de RNasa, se incubó a 37°C durante 30 minutos y se almacenó a 4°C hasta su utilización.

3.2.4.2. Extracción de plásmidos de *E. coli*

El protocolo seguido fue una modificación del descrito por Sambrook (2001), basado en que una disolución de un detergente aniónico fuerte y pH elevado, rompe las células y desnaturaliza tanto las proteínas como el ADN cromosómico, y la subsiguiente centrifugación de la suspensión permite recuperar el ADN plasmídico en el sobrenadante (Birnboim y Doly, 1979).

Las colonias aisladas en las transformaciones de *E. coli* se cultivaron durante 12-16 horas en 5 mL de medio LB con sus respectivos antibióticos. Seguidamente, se procedió a la centrifugación (2500 rpm durante 15 min a 4°C) de 4 mL de ese cultivo y a la resuspensión del precipitado celular en 200 µL de la solución I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 10 mM EDTA, pH 8,0); inmediatamente después, se añadieron 300 µL de la solución alcalina recién preparada (0,2 N NaOH, 1% SDS; Solución II), se agitó manualmente y la mezcla se colocó en hielo durante 5 min.

A continuación se añadieron 300 µL de la solución III (60 mL acetato potásico, 11,5 mL de ácido acético glacial y 28,5 mL de agua). La mezcla se agitó manualmente y se mantuvo en hielo otros 5 minutos. El sobrenadante resultante de la centrifugación (13000 rpm durante 10 min a 4°C) se transfirió a un nuevo tubo (unos 700-750 µL) y se añadió 2 µL de RNasa al 1%. La mezcla se agitó y se incubó a 37°C durante 20 minutos.

Trascurrida la incubación a 37°C se realizó un lavado con cloroformo para eliminar proteínas del extracto. A 700 µL del extracto se añadió 400 µL de cloroformo, se agitó manualmente y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Este paso se repitió una segunda vez. Se recogió la fase superior acuosa que contiene el ADN y se le añadió 1 volumen de isopropanol. La mezcla se agitó y se mantuvo en hielo 10 minutos. A continuación, se centrifugó (13000 rpm, 15 minutos) y se lavó el precipitado, para la eliminación de sales, con 500 µL de etanol al 70%, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones.

Por último se dejó secar el precipitado y cuando estuvo totalmente seco, se resuspendió en 50 µL de agua MiliQ.

Para comprobar que la extracción se había realizado correctamente, se realizó una electroforesis con 2 µL del plásmido (ver apartado siguiente).

3.2.4.3. Electroforesis de ADN

Para comprobar la integridad y concentración del ADN genómico y plasmídico tras las extracciones se realizaron electroforesis del ADN, utilizando geles de agarosa al 0,8% (p/v) fundida en tampón de electroforesis TBE 0,5X (45 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico y 1 mM de EDTA). La electroforesis se realizó a 100 voltios. El gel y el tampón de electroforesis contenían 0,05% (p/v) de bromuro de etidio para la visualización del ADN, que se realizó iluminando el gel con luz ultravioleta UV a 254 nm de longitud de onda.

Con las muestras se empleó el tampón de carga 6X [40% (p/v) de sacarosa, 0,1 M de EDTA y 0,25% (p/v) de azul de bromofenol], y los marcadores de peso molecular utilizados fueron MassRuler DNA Ladder Mix y λ /*HindIII* (Fermentas). Además de cuantificar visualmente por comparación con las bandas del marcador λ /*HindIII*, se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop para su confirmación.

3.2.4.4. Rescate plasmídico

Para determinar la localización de las inserciones del T-DNA en el genoma de *A. thaliana* se empleó la técnica del rescate plasmídico. En primer lugar se digirieron 2 μ g de DNA genómico con *Bam*HI (ver Figura 3.2). Una vez digerido, se limpió la digestión con un volumen de cloroformo isoamílico (24:1) y tras centrifugar 10 minutos, se recogió la fase acuosa, donde se encuentra el ADN, y se precipitó añadiendo dos volúmenes de etanol acetato sódico (EtAcNa = 1 mL AcNa 3 M en 19 mL de etanol absoluto), dejándolo a -20°C durante 24 horas. Finalmente, se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y el precipitado se resuspendió en 93 μ L de agua mQ. Tras la digestión, 5 μ L de ésta se separaron mediante electroforesis en un gel de TBE 0,5X a un voltaje de 60-70 V para confirmar su total digestión.

En este punto, a los 88 μ L restantes se agregaron 2 μ L de la enzima ligasa T4 (5 U/ μ L) y 10 μ L de tampón de ligación y se incubó toda la noche a 16°C, con el fin de recircularizar los fragmentos digeridos. A continuación, se precipitó el ADN circular añadiendo de nuevo dos volúmenes de EtAcNa y dejándolo a -20°C durante 5 horas. Finalmente, después de centrifugar 10 minutos, el precipitado se lavó con etanol 70% (v/v) y se resuspendió en 10 μ L de agua mQ.

Los fragmentos circulares obtenidos, se utilizaron para transformar *E. coli* (mediante la técnica de electroporación o de choque térmico explicadas en los apartados 3.2.3.4 y 3.2.3.5) y conferir la capacidad de crecimiento y formación de colonias en medio suplementado con antibiótico únicamente al ADN circularizado que presente el plásmido pBluescriptKS(+), incluido en el T-DNA. Este ADN circularizado contiene la región genómica flanqueante a la inserción del T-DNA, de modo que al secuenciarla empleando los cebadores cercanos al borde

izquierdo se obtuvo la posición de inserción. Los cebadores fueron el pSKI15-193: GCCTATAAATACGACGGATCG (con el que se obtiene la secuencia del sitio directo de inserción del T-DNA) o pSKI15-1796: TAATACGACTCACTATAGGG (mas alejado del LB) (Figura 3.3). El ADN para secuenciar se obtuvo mediante la extracción del ADN plasmídico de las colonias resistentes según el protocolo descrito en el apartado 3.2.4.2.

Las secuencias obtenidas tras la secuenciación se comprobaron con el programa Chromas Lite 2.01. Con los fragmentos de DNA bien secuenciados se realizaron alineamientos con el genoma de arabidopsis mediante la herramienta BLAST del TAIR (www.arabidopsis.org) para poder encontrar en qué genes o zonas intergénicas se encontraba el T-DNA insertado.

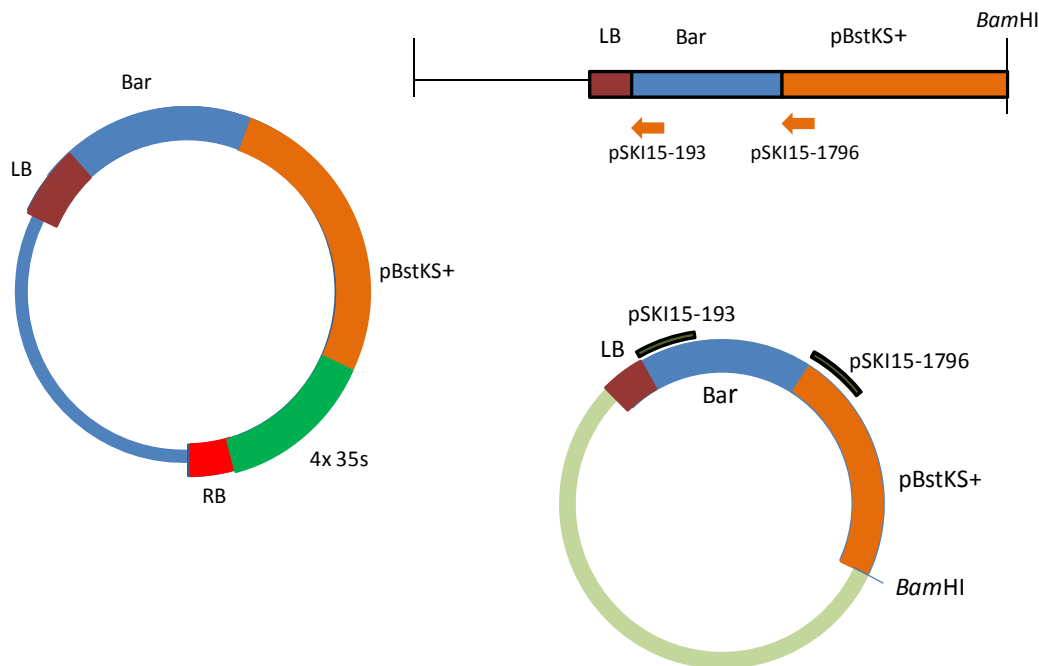


Figura 3.3. Representación esquemática del rescate plasmídico. A) Vector pSKI015. B) Región genómica que contiene el T-DNA. C) Vector obtenido tras el rescate plasmídico. En los dos últimos casos se indican los sitios de corte *Bam*HI así como los sitios de unión de los cebadores cercanos al borde izquierdo (LB). Bar, gen de resistencia a BASTA; RB, borde derecho. (Figura modificada de Vilcara, 2012).

3.2.5. Análisis estadísticos

Con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los diferentes mutantes confirmados de las líneas FOX y el control Col-0, se realizaron pruebas estadísticas t. Esta prueba permite determinar si existen o no diferencias significativas entre las medias de los dos grupos a comparar con un determinado nivel de significación. También se realizó un test χ^2 para conocer el grado de heterocigosidad de las líneas FOX.

Dado que los mutantes en los que se iba a realizar el rescate plasmídico se sembraron en medio con BASTA se volvió a comprobar el número de inserciones mediante el test χ^2 .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RASTREO DE MUTANTES EN ÁCIDO ACÉTICO

Mediante el empleo de la genética directa se pretende crear un campo de estudio de diferentes mecanismos que intervienen en la homeostasis del pH en plantas. De tal forma, con el propósito de identificar mutantes de *A. thaliana* capaces de germinar en condiciones de estrés ácido se realizó un rastreo en 10796 líneas mutantes de la colección FOX que son sobreexpresoras de cDNAs de *A. thaliana* (Ichikawa y col. 2006).

4.1.1. Condiciones del rastreo

Para realizar un buen rastreo de los mutantes capaces de germinar con estrés ácido intracelular se realizó primero un ensayo con Col-0 (ecotipo silvestre de las líneas FOX) en el que se sembraron semillas en diferentes concentraciones de ácido acético con el objetivo de encontrar la concentración idónea. En un primer experimento se utilizaron las mismas concentraciones que en Muñoz (2011), pero los resultados mostraron que las concentraciones eran demasiado altas, seguramente porque estaban definidas para el ecotipo Col-2. En un experimento posterior se bajo la dosis de ácido acético y se eligió como concentración óptima la de 6 mM, ya que fue la concentración más baja en la el ecotipo Col-0 no fue capaz de germinar (Figura 4.1).

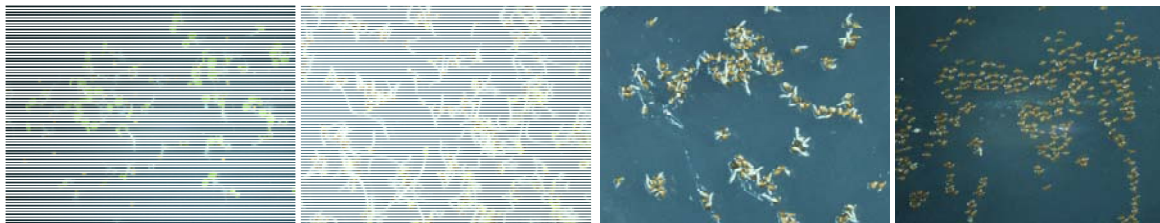


Figura 4.1. Ensayo de germinación del ecotipo Col-2 de *Arabidopsis thaliana* en medio MS con diferentes concentraciones de ácido acético (de izquierda a derecha, las concentraciones fueron 4, 5, 6 y 7 mM).

4.1.2. Rastreo primario

Dado que las semillas fueron enviadas desde el RIKEN en tubos de 1,5 mL como lotes de 50 líneas (400 semillas), lo primero que se comprobó de una forma visual fue que todos los tubos tuvieran más o menos la misma cantidad de semillas. Una vez comprobado esto se mezclaron todas para hacer una mezcla única en la que estuvieran representadas homogéneamente todas las líneas.

Para un correcto rastreo se deberían de utilizar unas 5 semillas por cada línea, pero ya que según RIKEN nos enviaron 8 semillas por cada línea se decidió hacer el rastreo con todas, ya

que si hubiéramos dejado aparte 3 semillas por cada línea con estas no se hubieran podido hacer otro rastreo en condiciones adecuadas.

Esta mezcla de semillas se esterilizó y sembró en aproximadamente 40 placas petri, y tras un periodo comprendido entre los 5 y 12 días desde la siembra se empezaron a ver mutantes putativos con cotiledones expandidos y de una coloración verde (Figura 4.2). En total 132 semillas fueron capaces de germinar y dar plántulas con cotiledones verdes y expandidos, que fueron transplantados a medio MS sin acético para que las raíces elongaran. Tras 10-12 días en este medio las plántulas se trasplantaron a tierra y fueron cultivadas en condiciones de invernadero junto con el ecotipo silvestre para que produjeran semillas.



Figura 4.2. Mutante putativo de la colección FOX con cotiledones verdes y expandidos obtenido en el rastreo primario a los 8 días de cultivo en medio MS suplementado con 6 mM de ácido acético.

El porcentaje de mutantes putativos respecto al total de semillas utilizadas fue de 0,015%. Este resultado fue muy superior a los obtenidos por Muñoz (2011), en el que el mayor porcentaje fue de 0,23 en la colección de Somerville. Si calculamos el porcentaje de mutantes putativos respecto a las líneas ensayadas nuestro resultado es de 1,2%, que ya es más parecido a lo obtenido por Muñoz (2011) para las colecciones de Somerville y Feldmann (1,74 y 1,28, respectivamente), aunque muy superior a los obtenidos por Niños (2011) y Vilanova (2011) con valores del 0,57 y 0,052, respectivamente. Estos diferentes resultados entre los valores obtenidos en este trabajo y los demás se pueden deber al uso de diferentes colecciones obtenidas con fondos genéticos distintos.

4.1.3. Rastreo secundario. Tolerancia a acético

Dado que nuestro interés se centró en la obtención de mutantes que presentaran resistencia a ácidos débiles, la descendencia de los mutantes putativos se cultivó *in vitro* nuevamente en condiciones que produjeran estrés ácido intracelular. Para ello, y dado que en este experimento el número de semillas fue mucho menor se utilizaron concentraciones de 3,5 mM de ácido acético.

En este rastreo secundario solamente se pudieron ensayar 116 líneas, ya que de las 132 plántulas que se trasplantaron a tierra 16 no consiguieron sobrevivir.

Los resultados de germinación permitieron identificar 3 líneas que mantuvieron nuevamente el fenotipo de tolerancia a ácido acético, aunque el porcentaje de germinación en estas condiciones no llegó a superar el 70% (Figura 4.3). Estas tres líneas representan un 0,03% respecto a las líneas ensayadas, que es algo inferior al 0,05%, 0,08 y 0,08 obtenidos para las colecciones de Somerville, Bressan y Weigel, respectivamente (Muñoz, 2011).

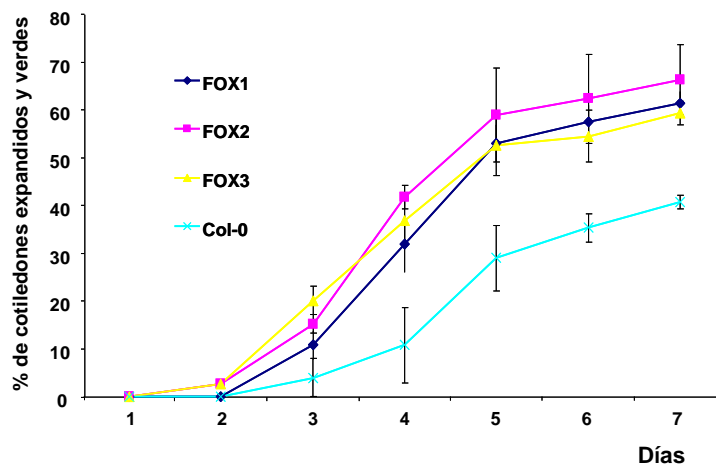


Figura 4.3. Porcentaje de plántulas con cotiledones expandidos en el rastreo secundario durante los 7 primeros días de germinación en medio MS suplementado con 3,5 mM de ácido acético. A partir del día 4 los % de germinación son significativos respecto al control (Col-0) ($n = 3$; $P \leq 0,05$).

4.1.4. Tolerancia a higromicina

Con las mismas semillas estériles, que se utilizaron en el experimento anterior, se realizó una siembra en MS con higromicina para comprobar si las semillas de las líneas enviadas eran como cabría esperar homocigotas. Los resultados mostraron que de un total de 116 líneas ensayadas solo eran resistentes 76, lo que supone que en un 34,5% o no tienen T-DNA o han perdido la tolerancia a higromicina. Para comprobar en qué situación nos encontramos lo que se podría hacer sería sembrar esas líneas sensibles en medio MS y con sus plántulas realizar una extracción de ADN y una PCR para comprobar si presentan T-DNA.

De las 76 líneas resistentes cerca del 66% presentaron una tolerancia total que nos podría indicar que son homocigotas para la inserción del T-DNA, aunque también se podría dar el caso de que tuvieran 3 ó más inserciones, ya que en las 160 semillas empleadas en este experimento no se detectó ninguna sensible.

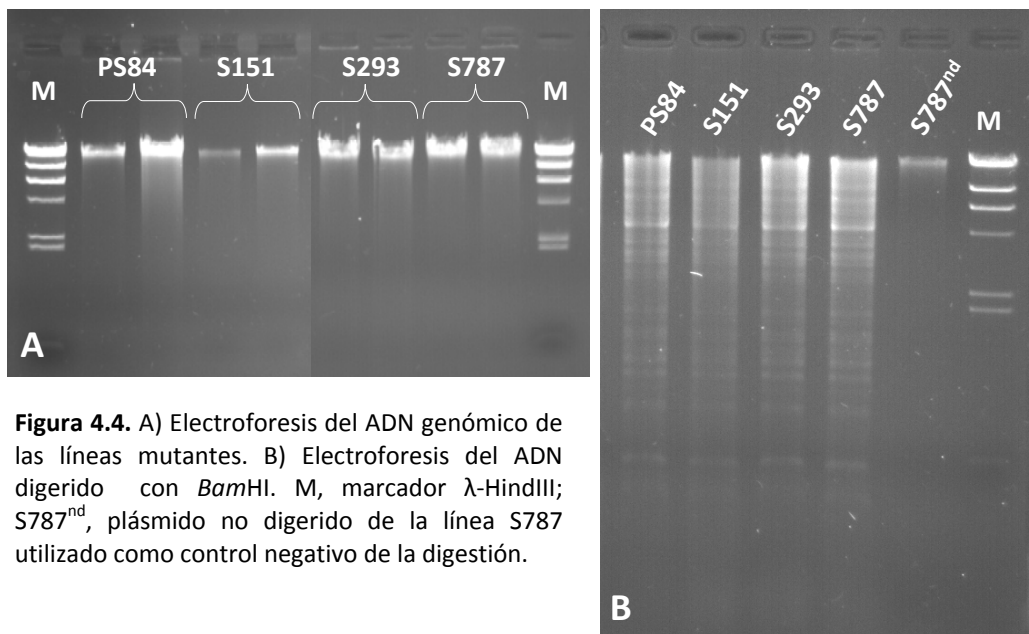
Cabe mencionar que las tres líneas confirmadas en el rastreo secundario presentaron tolerancia a higromicina, aunque no todas fueron 100% resistentes (la línea FOX2 presentaba una segregación 3:1).

4.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DE INSERCIÓN EN MUTANTES PREVIAMENTE IDENTIFICADOS MEDIANTE RESCATE PLASMÍDICO

En este TFG se han utilizado 4 líneas tolerantes durante la germinación a ácido acético obtenidas previamente en el laboratorio (Muñoz, 2011), y que posteriormente fueron analizadas parcialmente en el Trabajo Final de Carrera de Pilar Oms (2012). Estas líneas empleadas pertenecían a la colección de Somerville y estaban nombradas como PS84, S151, S293 y S787.

La técnica del rescate plasmídico consiste en digerir el ADN genómico de los mutantes tolerantes con una enzima de restricción (en nuestro caso *Bam*HI) y circularizar todos los fragmentos generados, de esta manera solo pueden transformar y replicarse en *E. coli* aquellos fragmentos circularizados que presenten el T-DNA (por poseer en él un plásmido). De esta manera, el nuevo plásmido generado contiene una región de ADN genómico de la planta que flanquea al T-DNA siendo así posible su secuenciación empleando unos cebadores específicos del T-DNA.

Tras la extracción del ADN genómico de cada línea mutante se realizó un gel para comprobar la integridad de la preparación del ADN (Figura 4.4A) y se cuantificó mediante Nanodrop. Se digirieron 2 microgramos de ADN por cada línea con *Bam*HI y se realizó otro gel para comprobar que la digestión fuera total (Figura 4.4B). Una vez comprobada la correcta digestión y tras ligar y transformar *E. coli* se obtuvieron colonias en las placas de cultivo.



Dado que el ADN genómico de *Arabidopsis* tiene metilaciones y por tanto una cepa normal de *E. coli* como DH5 α podría detectarlas y degradar los plásmidos del rescate, se debería de utilizar la cepa MRF' que posee las mutaciones *mcrA*, *mcrB*, y *mrr* que impiden que se digiera el ADN metilado de organismos superiores. En algunas de las líneas se emplearon tanto la cepa

MRF' como la DH5 α . Algunas de las colonias transformantes elegidas al azar, que presentaron resistencia al medio selectivo LB con ampicilina, fueron cultivadas en medio líquido y se les extrajo el ADN plasmídico (un mínimo de 10 colonias por línea). Para comprobar si existía más de un tipo de plásmido en una colonia o si existían perfiles diferentes de digestión (por ser diferentes) los plásmidos extraídos se digirieron con *Bam*HI.

En la Figura 4.5 se puede observar los plásmidos extraídos de distintas colonias procedentes del rescate plasmídico de la línea PS84 transformados en bacterias de las cepas MRF' y DH5 α , y como se puede apreciar existen diferencias en cuanto al tipo de plásmido y en cuanto a la cantidad extraída del mismo. Tras digerir con *Bam*HI se pudo observar diferentes patrones de bandas en los plásmidos rescatados para una misma línea mutante y se decidió mandar a secuenciar al menos una de las colonias por cada tipo de plásmido.

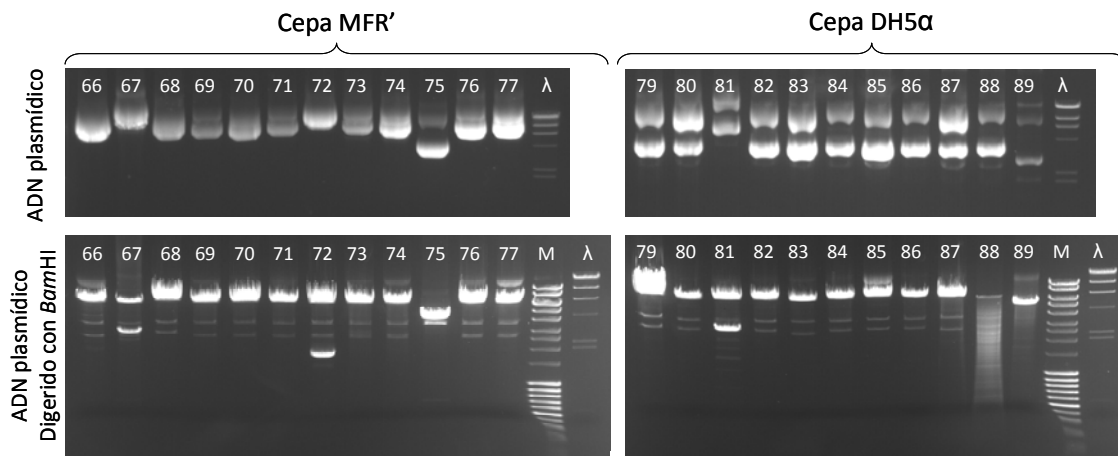


Figura 4.5. Electroforesis del ADN plasmídico de colonias procedentes del rescate plasmídico de la línea PS84, sin digerir (parte superior) o digerido con *Bam*HI (parte inferior). En los experimentos de transformación se utilizaron la cepa MRF' (lado izquierdo) o DH5 α (lado derecho). M, marcador MassRuler DNA Ladder Mix; λ , marcador λ -*Hind*III.

Para la línea PS84 se mandaron a secuenciar los plásmidos del rescate pertenecientes a las colonias 66, 67, 75, 80 y 81 con el cebador pSKI15-193. Todos los plásmidos pudieron dar secuencias (excepto la colonia 75), que fueron comprobadas con el programa CHROMAS para eliminar el inicio y el final donde la secuenciación no es correcta. Tras realizar las comparaciones con el plásmido pSKI015 pudimos observar que una parte de la secuencia no correspondía a dicho plásmido y fue con ella con la que se realizaron comparaciones con la herramienta BLAST de la página del TAIR.

Las colonias 66 y 67 permitieron identificar la inserción del T-DNA en una misma posición y las colonias 80 y 81 permitieron identificar otra zona de inserción pero que fue diferente a la zona de las colonias 66 y 67. La Figura 4.6 se muestra en un esquema los lugares de inserción del T-DNA en estas colonias analizadas, y como se puede observar los dos T-DNAs están

prácticamente juntas por lo que podemos indicar que en la línea mutante PS84 se produjo una inserción con 2 copias del T-DNA formando un concatémero. Ambos T-DNAs se encuentran en la región intergénica presente entre los genes At3g02230 y At3g02240.

Resultados previos en otros rastreos en el laboratorio han permitido conocer que el área de influencia de los cuatro activadores transcripcionales 35S presentes en el T-DNA puede llegar a ser de 10 Kb y por tanto aquellos genes que estén a esa distancia respecto a los activadores transcripcionales 35S podrían estar inducidos respecto a plantas silvestres. En la Figura 4.6 se muestran las distancias génicas entre los genes y los T-DNAs insertados, indicando que los posibles genes sobreexpresados podrían ser At3g02220, At3g02230, At3g02240 y At3g02242.

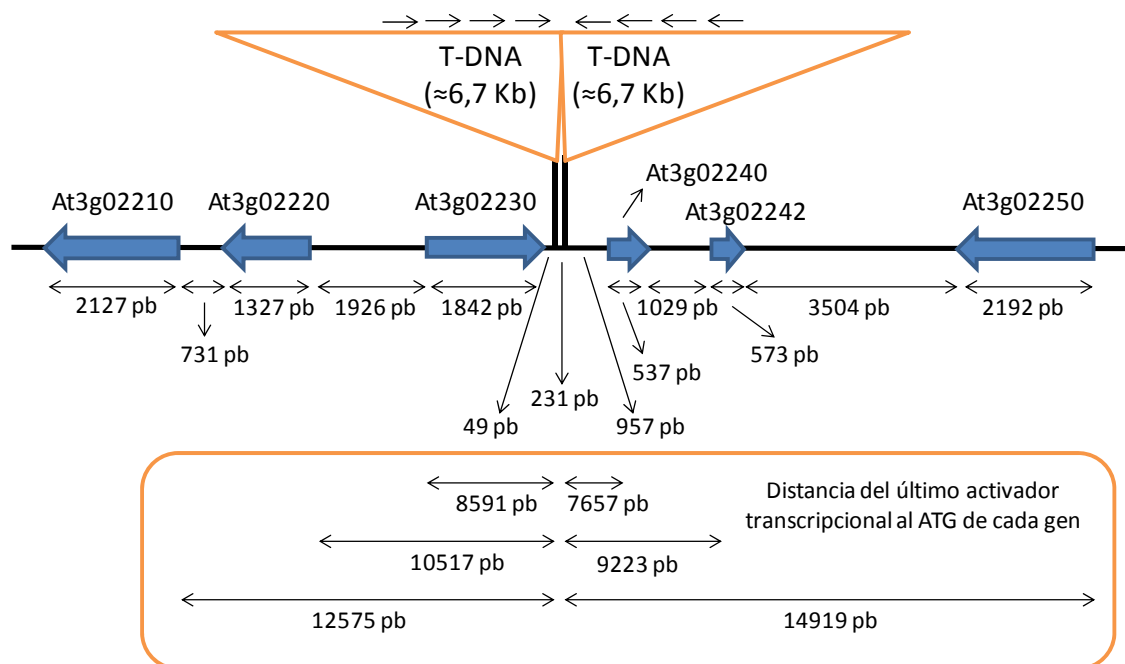


Figura 4.6. Esquema de la zona de inserción de los dos T-DNAs presentes en la línea mutante S84. Se indica la orientación de los T-DNAs, los genes, el tamaño de las regiones génicas e intergénicas, así como la distancia del activador transcripcional (cercano al borde derecho del T-DNA) al ATG de los genes.

En los análisis Southern realizados por Oms (2012) se puede observar que esta línea tenía una única banda lo cual podría hacer pensar que solamente tenía una copia del T-DNA. Por otro lado los análisis χ^2 realizados con las F2 de esta línea mutante también indicaban que la segregación era de una inserción. Nuestros resultados son coherentes con estos dos datos ya que al secuenciar hemos visto que había dos copias muy cercanas y por tanto se heredan como una copia única.

Hay que mencionar que a pesar de que la cepa DH5 α no sería adecuada por tener la maquinaria para degradar el ADN metilado, permitió dar colonias y plásmidos con la zona de inserción, que tras el estudio de tamaños al ser digeridos con *Bam*HI (Figura 4.5) pudimos ver que

eran similares a los obtenidos con la cepa MRF'. Este resultado inesperado podría explicarse por la rapidez de la maquinaria de replicación de los plásmidos, que sería mas eficiente que la maquinaria de degradación del ADN metilado y que por tanto a pesar de ser degradado ya existirían nuevos plásmidos no metilados iguales a los originales.

El gen At3g02220 es una proteína desconocida que según el TAIR sería nuclear y estaría implicada en la metilación del ARN, ensamblaje y desensamblaje de la cromatina, y maduración del ARN mensajero. El gen At3g02230 codifica la enzima RGP1, que es una UDP-arabinosa mutasa que cataliza la interconversión entre las formas piranosa y el furano de UDP-L-arabinosa. Este gen es requerido para la correcta formación de la pared celular. El gen At3g02240 codifica un factor de crecimiento del meristemo de la raíz, y en la literatura solo se encuentra en listados de perfiles de expresión. Por último el gen At3g02242 vuelve a ser una proteína desconocida y no estudiada.

Teniendo en cuenta las características de los genes que están cercanos a la zona de inserción no podemos intuir cuál de ellos podría estar implicado en la tolerancia al estrés ácido intracelular.

En la Figura 4.7 se pueden observar los plásmidos extraídos de las colonias procedentes del rescate plasmídico de la línea S151, y como se puede apreciar también existen diferencias en cuanto al tipo de plásmido y en cuanto a la cantidad extraída del mismo. Tras digerir con *Bam*HI se pudieron observar los diferentes patrones de bandas en los plásmidos rescatados (Figura 4.7).

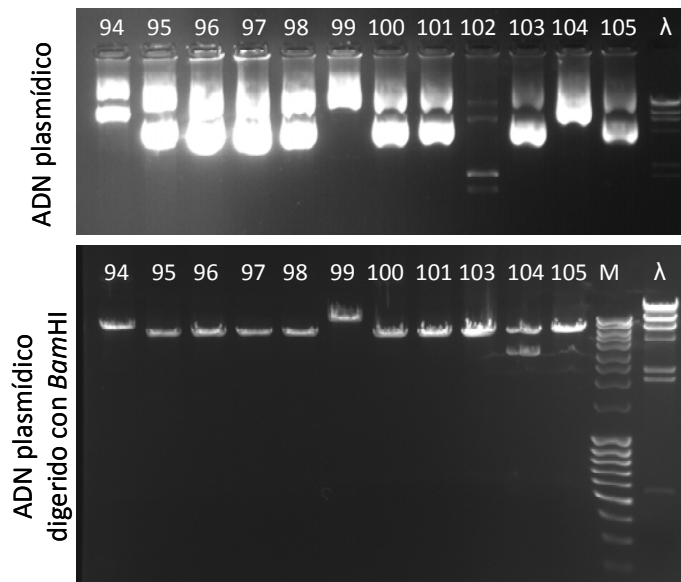


Figura 4.7. Electroforesis del ADN plasmídico de colonias procedentes del rescate plasmídico de la línea S151, sin digerir (parte superior) o digeridos con *Bam*HI (parte inferior). En los experimentos de transformación se utilizó la cepa MRF'. M, marcador MassRuler DNA Ladder Mix; λ, marcador λ-*Hind*III.

En el caso de la línea S151 se mandaron a secuenciar las colonias 94, 95, 99, 102 y 104 con los cebadores pSKI-193 y pSKI-1796 y en ningún caso se obtuvo ninguna secuencia legible por lo que no se pudo determinar la localización del T-DNA de esta línea mutante. El análisis Southern blot en la línea parental S151 nos indica que tiene tres o cuatro bandas, por otro lado cuando se comprobó mediante cruzamientos con el control silvestre las cuatro plantas F2 analizadas mostraron mediante χ^2 que la segregación era típica de una inserción (Oms, 2012). Estos resultados nos estarían indicando que durante el cruzamiento se heredó una única inserción y por tanto al analizar las colonias mediante secuenciación nos debería de haber dado una única zona de inserción o como en el caso anterior dos copias muy cercanas que se heredan como una copia única.

En la Figura 4.8 se puede observar los plásmidos extraídos de las colonias procedentes del rescate plasmídico de la línea S293 y como en los dos casos anteriores se puede apreciar que existen diferencias en cuanto al tipo de plásmido y en cuanto a la cantidad extraída del mismo. Tras digerir con *Bam*HI se pudieron observar los diferentes patrones de bandas en los plásmidos rescatados (Figura 4.8).

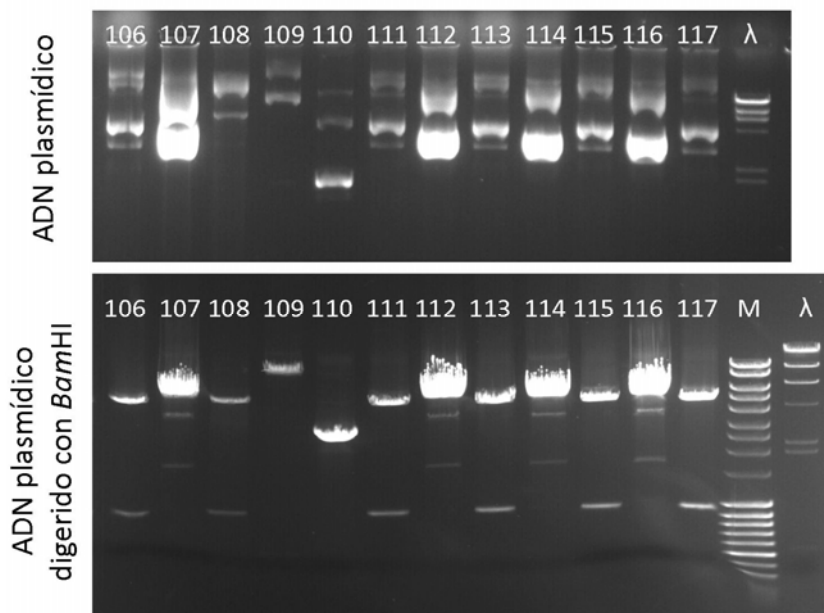


Figura 4.8. Electroforesis del ADN plasmídico de colonias procedentes del rescate plasmídico de la línea S293, sin digerir (parte superior) o digeridos con *Bam*HI (parte inferior). En los experimentos de transformación se utilizó la cepa MRF'. M, marcador MassRuler DNA Ladder Mix; λ , marcador λ -*Hind*III.

Los análisis de restricción de los plásmidos obtenidos en el rescate plasmídico para la línea S293, como pasaba con los otros mutantes, nos mostraban diferentes tipos de plásmidos (Figura 4.8), por ello se mandaron a secuenciar los plásmidos de las colonias 106, 107, 109 y 110.

Únicamente se pudo obtener una secuencia legible en el caso de la colonia 107 que permitió la localización del T-DNA en la región intergénica de los genes At5g64760 y At5g64770 (Figura 4.9).

En el trabajo de Oms (2012) los análisis Southern blot y χ^2 mostraban que esta línea tenía una sola inserción lo cual es coherente con la identificación de una sola zona de inserción.

Teniendo en cuenta la consideración del alcance del activador transcripcional 35S los genes implicados sobreexpresados serían At5g64750, At5g64760 y At5g64770. El primero de los genes codifica a ABR1 (del inglés *AP2-like ABA repressor 1*) que está muy relacionado con la respuesta a diferentes estreses abióticos. Este gen es expresado en respuesta a ABA, estrés osmótico y sequía, y las plantas mutantes son hipersensibles a estos estreses (Pandey y col., 2005). El gen At5g64760 codifica la subunidad RPN5b de la subunidad 26S del proteosoma y no hay evidencias de que este gen tenga como función la tolerancia a estrés (Book y col., 2009). Por último, el gen At5g64770 tiene relación con el gravitropismo de la raíz y la acumulación de auxinas, pero no se conocen fenotipos de tolerancia o sensibilidad a estreses (Whitford y col., 2012). Por tanto, el gen At5g64750 presumiblemente será el responsable de la tolerancia a estrés ácido intracelular.

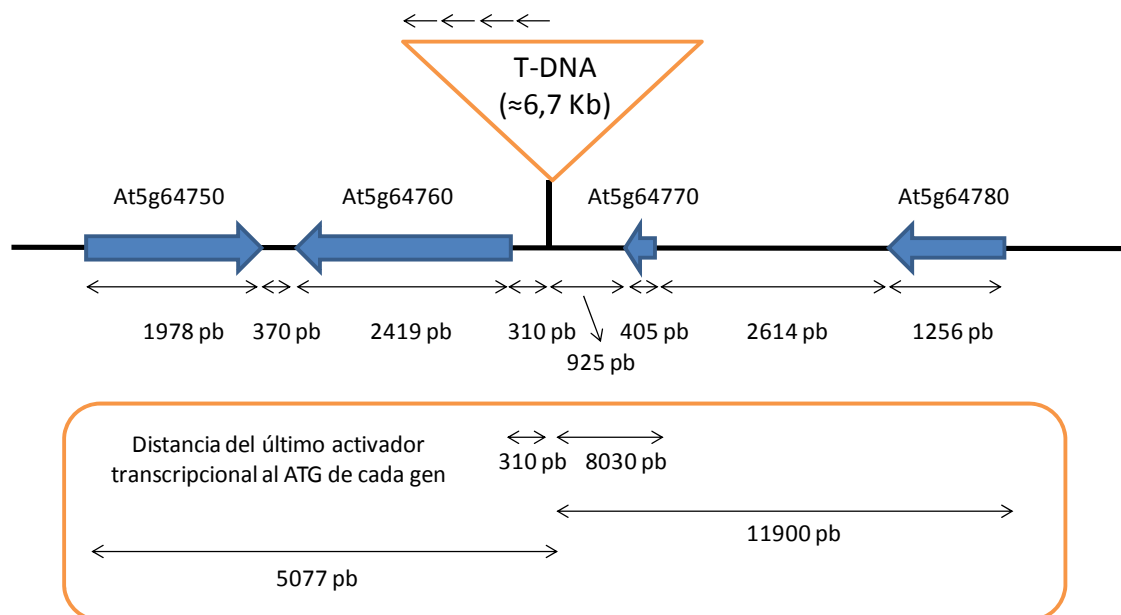


Figura 4.9. Esquema de la zona de inserción del T-DNA presente en la línea mutante S293. Se indica la orientación del T-DNA, los genes, el tamaño de las regiones génicas e intergénicas, así como la distancia del activador transcripcional (cercano al borde derecho del T-DNA) al ATG de los genes.

La última línea mutante tolerante a ácido acético en la cual se quería identificar el lugar de inserción, para conocer los genes que podrían estar implicados en la tolerancia al estrés ácido intracelular, fue la línea S787. En este caso, observando los diferentes patrones de digestión obtenidos con la enzima *Bam*HI (Figura 4.10), los plásmidos que se mandaron a secuenciar correspondían a las colonias 143, 154, 161 y 164.

En todos los casos se pudo obtener una secuencia legible y tras su tratamiento se determinó que la zona de inserción estaba en la región intergénica entre los genes At2g01470 y At2g01480 (para los plásmidos 143, 154 y 161). En el caso del plásmido 164 toda la secuencia obtenida pertenecía al plásmido pSKI015. En la secuenciación de este último plásmido, una vez que se llegaba al borde izquierdo, y que por tanto a partir de aquí debería aparecer la secuencia genómica de la planta, lo que aparecía era la región del borde derecho (activador 35S). Este resultado nos indica que en esta línea se han insertado dos regiones de T-DNA con el mismo sentido y totalmente juntas sin dejar separación entre ellas (Figura 4.11) como ocurre en el caso de los 2 T-DNAs de la línea PS84 (Figura 4.6).

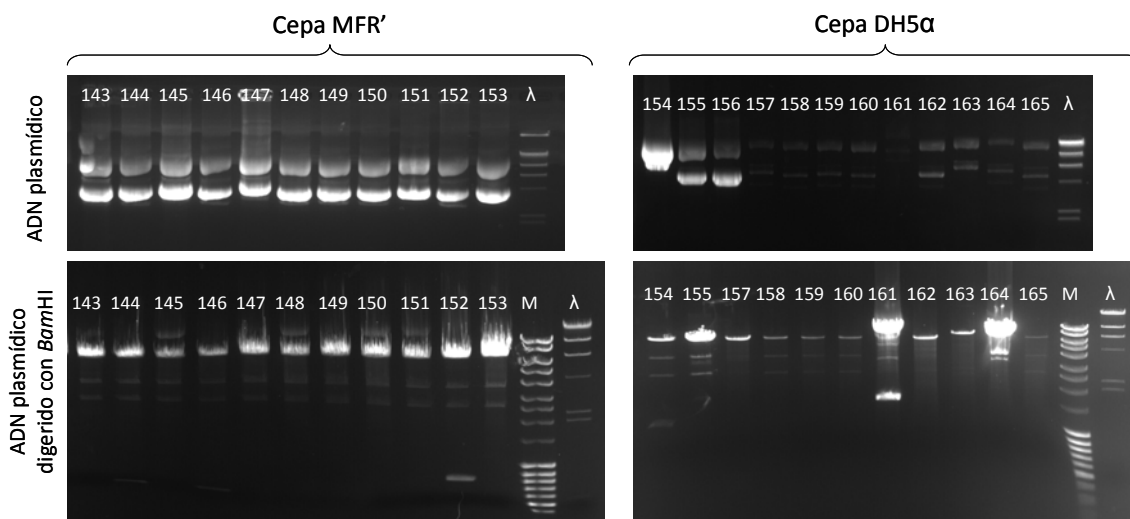


Figura 4.10. Electroforesis del ADN plasmídico de colonias procedentes del rescate plasmídico de la línea S787, sin digerir (parte superior) o digeridos con *Bam*HI (parte inferior). En los experimentos de transformación se utilizaron la cepa MRF' (lado izquierdo) o DH5α (lado derecho). M, marcador MassRuler DNA Ladder Mix; λ, marcador λ-*Hind*III.

Igual que ocurre en el caso anterior los análisis Southern y χ^2 (Oms, 2012) son coherentes con haber identificado únicamente una zona de inserción.

Los genes que podrían estar bajo la influencia de los activadores transcripcionales 35S podrían ser At2g01470, At2g01480, At2g01490 y At2g01500 (Figura 4.11). El primero de los genes codifica una proteína integral de membrana (SEC12) e interviene en la formación de vesículas de transporte (Bar-Peled y Raikhel, 1997), que al estar sobreexpresada podría estar deslocalizando algún transportador de iones que de alguna manera permitiera la tolerancia a ácido acético. Respecto al gen At2g01480 no hay descrito nada sobre su función, aunque el TAIR indica que pertenece a la familia de las O-fucosyltransferasas. Por otro lado, el gen At2g01490 codifica una fitanoil-CoA 2-hidroxilasa, que está implicada en la conversión del Fitol a Fitanoil-CoA pero de la cual no se conoce relación con condiciones de estrés. Y por último, el gen At201500 codifica un factor de transcripción que participa en la tolerancia a estrés por bajas temperaturas (Zhu, 2004).

Así, según la información que se conoce de estos 4 genes, los que podría estar implicados en la tolerancia a estrés ácido intracelular podrían ser el At2g01470 y el At2g01500 por sus funciones conocidas.

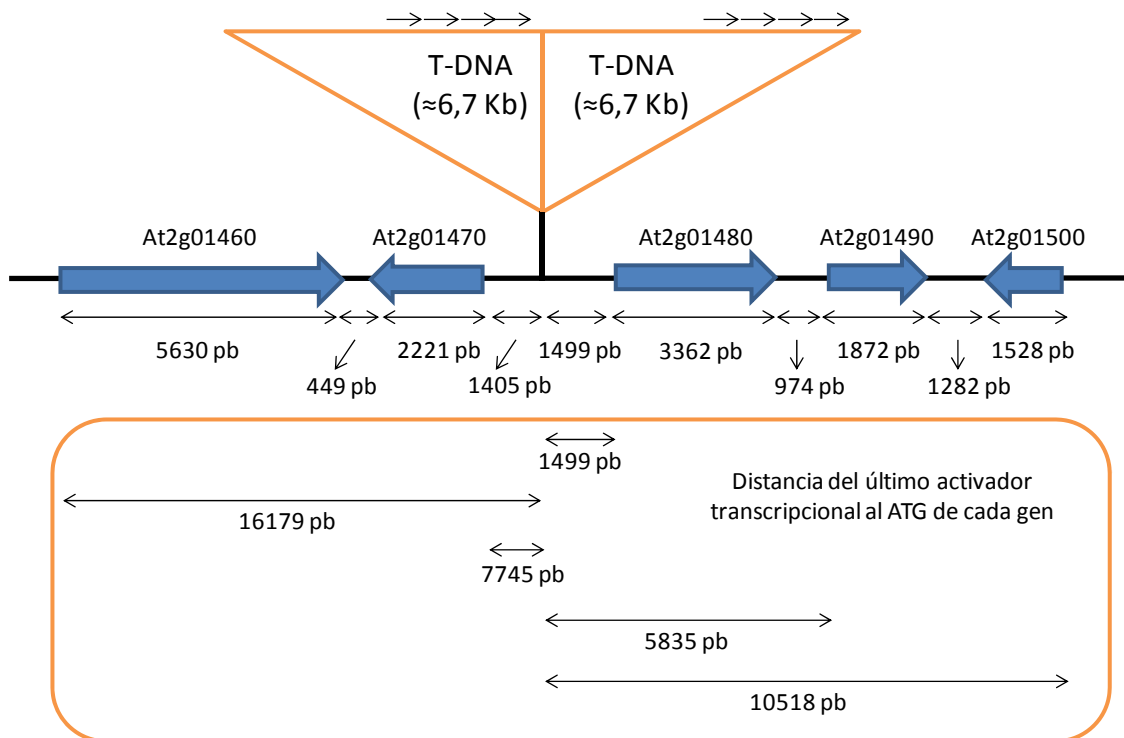


Figura 4.11. Esquema de la zona de inserción de los dos T-DNAs presentes en la línea mutante S293. Se indica la orientación de los T-DNAs, los genes, el tamaño de las regiones génicas e intergénicas, así como la distancia del activador transcripcional (cercano al borde derecho del T-DNA) al ATG de los genes.

Respecto al haber utilizado la cepa de *E. coli* MRF' y DH5 α las consideraciones indicadas en el primer caso son válidas para estos resultados.

4.3 ANÁLISIS FUTUROS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES RESPONSABLES DE LA TOLERANCIA

Respecto a la primera parte del trabajo estamos en un momento muy inicial de la investigación y faltarían análisis de cosegregación para confirmar que el fenotipo que tienen nuestras plantas está relacionado con el T-DNA introducido. Una vez determinado esto se tendría que averiguar el cDNA que lleva el T-DNA y para ello se tendrían que realizar experimentos de PCR, ya que por la técnica del rescate plasmídico no se podría identificar el gen. Dependiendo de los genes implicados, los experimentos para conocer porque proporcionan tolerancia a estrés ácido intracelular podrían ser diferentes en función de la naturaleza proteica de cada proteína codificada.

En cuanto a la segunda parte del trabajo, hemos podido determinar la localización del T-DNA insertado en tres de las cuatro líneas propuestas. En la línea S151 a pesar de que aparecieron colonias en el rescate plasmídico, ninguna de ellas permitió obtener una secuencia con la que poder comparar. Seguramente esto se debió a que el T-DNA insertado podría estar truncado y faltaban como mínimo las 1786 bp cercanas al borde izquierdo. También se podría explicar si las colonias obtenidas fueran fruto de algún tipo de contaminación, y por tanto sus plásmidos, al no ser el pSKI015 no tienen las regiones complementarias a los cebadores utilizados.

Antes de proceder a realizar desde el inicio otro experimento de rescate plasmídico sobre esta línea habría que diseñar algún cebador más alejado del borde izquierdo para intentar secuenciar la zona de inserción. En caso de que esta estrategia no funcionara, se podría emplear un cebador cercano al sitio de corte *Bam*HI que en caso de darnos secuencia legible nos indicaría una zona cercana del sitio de inserción. En caso de que ninguna de estas dos cosas funcionara, se tendría que comenzar el rescate desde el principio.

En aquellas líneas donde sí que hemos podido obtener una zona de inserción, el siguiente paso sería corroborar mediante PCR que el T-DNA se encuentra en los lugares indicados (Figuras 4.6, 4.9 y 4.11).

A modo de ejemplo para una de las líneas, se deberían de diseñar cebadores específicos a cada lado de la zona de inserción para realizar una PCR con ellos y con un interno del T-DNA. Asumiendo que la planta mutante tolerante a ácido acético fuera homocigota, al utilizar los dos cebadores del genómico no se debería de amplificar ningún tipo de banda. En el caso de utilizar un cebador interno del T-DNA (podría ser pSKI15-193) con el cebador apropiado del genómico debería de aparecer una banda (con una zona del pSKI15 y otra zona del genómico de la planta).

Una vez que hemos corroborado que la zona de inserción obtenida mediante secuenciación es correcta y sobre plantas mutantes homocigotas (identificadas mediante PCR según la estrategia anterior) se debería de realizar ensayos de RT-PCR para determinar cuál de los genes cercanos al T-DNA se encuentran inducidos. Debido a que hemos estado utilizando mutantes de la colección de activación transcripcional de Somerville, y dado que las inserciones se encontraban en regiones intergénicas, lo lógico es pensar que las variaciones en la cantidad de los transcritos de los genes cercanos al T-DNA sea una inducción. A pesar de ello se podría dar el caso que a pesar de estar en la región intergénica, si se ha introducido el T-DNA en un promotor, este podría dejar de funcionar y por tanto darnos una represión del gen.

Una vez que conocemos el gen o genes que podrían estar implicados en la tolerancia al estrés ácido intracelular en una línea mutante, el siguiente paso sería obtener mutantes de pérdida de función y transgénicas de ganancia de función para estudiar esos genes.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Rastreo de mutantes tolerantes a estrés ácido intracelular por aparición de cotiledones verdes

1. Se ha realizado un rastreo sobre las aproximadamente 11000 líneas transgénicas disponibles de la colección FOX. De un total de 90000 semillas rastreadas, se obtuvieron 132 mutantes putativos tolerantes a ácido acético, aunque solamente se pudieron confirmar 3 en el rastreo secundario.
2. Los ensayos de resistencia a higromicina sobre las semillas de los mutantes putativos indican que en un gran porcentaje, o bien se ha perdido la resistencia a este antibiótico, o que en las semillas proporcionadas por RIKEN no vienen de líneas homocigotas.

Identificación de la zona de inserción del T-DNA mediante rescate plasmídico en mutantes confirmados tolerantes a ácido acético

3. Mediante la técnica del rescate plasmídico se ha intentado localizar el punto de inserción del T-DNA en 4 líneas mutantes de la colección de Somerville (PS84, S151, S293 y S787), obtenidas previamente. Salvo en una de ellas (S151) esta técnica funcionó correctamente.
4. En la línea PS84, la zona de inserción del T-DNA estaría en el cromosoma 3 en la región intergénica situada entre los genes At3g02230 y At3g02240. Esta línea presenta una zona de inserción con dos copias del T-DNA muy cercanas entre si con orientaciones diferentes.
5. El mutante S293 presentó un solo T-DNA situado entre los genes At5g64760 y At5g64770. Debido al alcance del activador transcripcional 35S el mejor candidato para explicar la tolerancia a ácido acético es el gen At5g64750, que codifica ABR1 (del inglés *AP2-like ABA repressor 1*) que está muy relacionado con la respuesta a diferentes estreses abiótico.
6. El mutante S787 tuvo dos copias pegadas del T-DNA con la misma orientación, situadas entre los genes At2g01470 y At2g01480. Teniendo en cuenta la información de los genes alcanzables por el activador transcripcional 35S, los dos mejores candidatos para explicar el fenotipo serían At2g01470 y el At2g01500.
7. Por último, se han empleado las cepas de *E. coli* MRF' y DH5 α para los ensayos de rescate plasmídico. Los resultados obtenidos utilizando ambas cepas han sido similares, a pesar de que la cepa MRF' sería la más adecuada por tener mutaciones que impiden la degradación del ADN metilado de los organismos superiores, mientras que la cepa DH5 α si que tiene esta maquinaria de degradación.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, D.A.; Knijnenburg, T.A.; de Poorter, L.M.I.; Reinders, M.J.T.; Pronk, J.T.; Van Maris, A.J.A. (2007). Generic and specific transcriptional responses to different weak organic acids in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 7: 819-833.
- Alonso, J.M.; Ecker, J.R. (2006). Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. *Nature Reviews*, 7: 524-536.
- Becker, D.; Geiger, D.; Dunkel, M.; Roller, A.; Bertl, A.; Latz, A.; Carpaneto, A.; Dietrich, P.; Roelfsema, M.; Voelker, C. (2004). AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH-and Ca²⁺-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 15621-15626.
- Benito, B.; Portillo, F.; Lagunas, R. (1992). *In vitro* activation of the yeast plasma membrane ATPase during nitrogen starvation identification of the regulatory domain that controls activation. *FBS letters*, 3: 271-274.
- Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7: 1513-1523.
- Book, A.J.; Smalle, J.; Lee, K.H.; Yang, P.; Walker, J.M.; Casper, S.; Holmes, J.H.; Russo, L.A.; Buzzinotti, Z.W.; Jenik, P.D.; Vierstra, R.D. (2009). The RPN5 subunit of the 26S proteasome is essential for gametogenesis, sporophyte development, and complex assembly in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 460-478.
- Bray, E.A.; Bailey-Serres, J.Y.; Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses, En: *Biochemistry and molecular biology of plants*. Ed. American Society of Plant Physiologists. Rockville, 1158-1203.
- Cannon, W. (1928). Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*, 9: 399-431.
- Chinnusamy, V.; Schumaker, K.; Zhu, J.K. (2004). Molecular and genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55: 225-236.
- Davies, D.D. (1973). Control of and by pH. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 27: 513-52.
- Davies, D.D. (1986). The fine control of cytosolic pH. *Physiologia Plantarum*, 67: 702-706.
- Felle, H.; Bertl, A. (1986). Light-induced cytoplasmic pH changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 848: 176-182.
- Felle, H.H. (2001). pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biology*, 3: 577-591.
- Fernandes, A.R.; Peixoto, F.P.; Sá-Correia, I. (1998). Activation of the H⁺-ATPase in the plasma membrane of cells of *Saccharomyces cerevisiae* grown under mild copper stress. *Archives of Microbiology*, 171: 6-12.
- Forment, J.; Naranjo, M.Á.; Roldán, M.; Serrano, R.; Vicente, O. (2002). Expression of *Arabidopsis* SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *The Plant Journal*, 30: 511-519.
- Glazebrook, J.; Rogers, E.E.; Ausubel, F.M. (1997). Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics*, 31: 547-569.
- Guzmán, P.; Ecker, J.R. (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *The Plant Cell*, 2: 513-523.
- Ichikawa, T.; Nakazawa, M.; Kawashima, M.; Iizumi, H.; Kuroda, H.; Kondou, Y.; Tsuchida, Y.; Suzuki, K.; Ishikawa, A.; Seki, M.; Fujita, M.; Motohashi, R.; Nagata, N.; Takagi, T.; Shinozaki, K.; Matsui, M. (2006). The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant Journal*, 48: 974-985.
- Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96: 23-28.
- Katsuhara M, Kuchitsu K, Takeshige K, Tazawa M. (1989). Salt stress-induced cytoplasmic acidification and vacuolar alkalization in *Nitellopsis obtusa* Cells: *in vivo* ³¹P-nuclear magnetic resonance study. *Plant Physiology*, 90: 1102-1107.

- Kochian, L.V.; Hoekenga, O.A.; Pineros, M.A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Reviews on Plant Biology*, 55: 459-493.
- Koornneef, M.; Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, 61: 909-921.
- Koornneef, M.; van Eden, J.; Hanhart, C.J.; Stam, P.; Braaksma, F.J.; Feenstra, W.J. (1983). Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Heredity*, 74: 265-272.
- Krebs, M.; Beyhl, D.; Görlich, E.; Al-Rasheid, K.A.S.; Marten, I.; Stierhof, Y.; Hedrich, R.; Schumacher, K. (2010). Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 3251-3256.
- Kurkdjian, A.; Guern, J. (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annual Review of Plant Biology*, 40: 271-303.
- Latz, A.; Ivashikina, N.; Fischer, S.; Ache, P.; Sano, T.; Becker, D.; Deeken, R.; Hedrich, R. (2007). In planta *AKT2* subunits constitute a pH- and Ca^{2+} -sensitive inward rectifying K^{+} channel. *Planta*, 225: 1179-1191.
- Li, S.L.; Rédei, G.P. (1969). Direct evidence for models of heterosis provided by mutants of *Arabidopsis* blocked in the thiamine pathway. *Theoretical and Applied Genetics*, 39: 68-72.
- Maor Bar-Peled, M.; Raikhel, N.V. (1997). Characterization of AtSECI2 and AtSAR1. Proteins likely involved in endoplasmic reticulum and golgi transport. *Plant Physiology*, 114: 315-324.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*, 2ª Ed. Ed. Academic Press. London, 889 pp.
- Mathieu, Y.; Lalous, D.; Thomine, S.; Laurière, C.; Guern, J. (1996). Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta*, 199: 416-424.
- McKelvie, A.D. (1962). A list of mutant genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Radiation Botany*, 1: 233-240.
- Meyerowitz, E.M. (1989). Arabidopsis, a useful weed. *Cell*, 56: 263-269.
- Michelet, B.; Boutry, M. (1995). The Plasma Membrane H^{+} -ATPase (A Highly Regulated Enzyme with Multiple Physiological Functions). *Plant Physiology*, 108: 1-6.
- Mira, N.; Palma, M.; Guerreiro, J.F.; Sá-Correia, I. (2010). Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. *Microbial Cell Factories*, 9: 79 (1-13).
- Munns, R.; Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Plant Biology*, 59: 651-681.
- Muñoz, L. (2011). Obtención de mutantes tolerantes a ácido acético y estudio de las kinasas CRK29 y ARSK1 sobreexpresadas en condiciones de estrés ácido intracelular. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politecnica de Valencia. 100 pp.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Niños, R. (2011). Biología molecular de la regulación de la homeostasis de pH en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Politecnica de Valencia. 270 pp.
- Nuccitelli, R.; Deamer, D.W. (1982). Intracellular pH: Its measurement, regulation and utilization in cellular functions. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 55: 594-595.
- Oms, P. (2012). Obtención de mutantes tolerantes a ácido acético e identificación de los genes responsables de su tolerancia en condiciones de estrés ácido. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politecnica de Valencia. 84 pp.
- Page, D.R.; Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews*, 3: 124-136.
- Pandey, G.K.; Grant, J.J.; Cheong, Y.H. Kim, B.G.; Li, L.; Luan, S. (2005). ABR1, an APETALA2-Domain Transcription Factor That Functions as a Repressor of ABA Response in Arabidopsis1. *Plant Physiology*, 139: 1185-1193.
- Piper, P. W.; Ortiz-Calderon, C.; Holyoak, C.; Coote, P.; Cole, M. (1997). Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H^{+} -ATPase. *Cell Stress Chaperones*, 2: 12-24.

- Price, A.H.; Hendry, G.A.F. (1991). Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant, Cell & Environment*, 14: 477-484.
- Quail, P.H. (1998). The phytochrome family: dissection of functional roles and signalling pathways among family members. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 353: 1399-1403.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. (2000). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1.31-1.34.
- Schumacher, K. (2006). Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 595-600.
- Scott, A.C.; Allen, N.S. (1999). Changes in cytosolic pH within *Arabidopsis* root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism. *Plant Physiology*, 121: 1291-1298.
- Serrano, R. (1985). Membrane potentials and active transport in Plants and Fungi, En: *Plasma membrane ATPase of Plants and Fungi*. CRC Press, Inc. Florida, 31-78.
- Serrano, R. (1989). Structure and Function of Plasma Membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 61-94.
- Serrano, R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms. Toxicity targets and defense responses. *International Review of Cytology*, 165: 1-52.
- Smith, F.A.; Raven, J.A. (1979). Intracellular pH and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 30: 289-311.
- Thibaud, J.; Soler, A.; Grignon, C. (1986). H⁺ and K⁺ Electrogenic Exchanges in Corn Roots. *Plant Physiology*, 81: 847-853.
- Trivedi, B.; Danforth, W.H. (1966). Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. *Journal of Biological Chemistry*, 241: 4110-4114.
- Van Weert, A.W.; Geuze, H.J.; Stoorvogel, W. (1997). Heterogeneous behavior of cells with respect to induction of retrograde transport from the trans-Golgi network to the Golgi upon inhibition of the vacuolar proton pump. *European journal of cell biology*, 74: 417-423.
- Vilanova, C. (2011). Caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* resistentes a estrés ácido. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politecnica de Valencia. 81 pp.
- Weigel, D.; Ahn, J.; Blazquez, M.A.; Borevitz, J.O.; Christensen, S.K.; Fankhauser, C.; Ferrandiz, C.; Kardailsky, I.; Malancharuvil, E.J.; Neff, M.M.; Nguyen, J.T.; Sato, S.; Wang, Z.; Xia, Y.; Dixon, R.A.; Harrison, M.J.; Lamb, C.J.; Yanofsky, M.F.; Chory, J.; Ahn, J.H.; Wang, Z.Y.; Xia, Y.J. (2000). Activation tagging in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 122: 1003-1013.
- Whitford, R.; Fernandez, A.; Tejos, R.; Pérez, A.C.; Kleine-Vehn, J.; Vanneste, S.; Drozdzecki, A.; Leitner, J.; Abas, L.; Aerts, M.; Hoogewijs, K.; Baster, P.; Groodt, R.; Lin, Y.C.; Storme, V.; Van de Peer, I.; Beeckman, T.; Madder, A.; Devreese, B.; Luschnig, C.; Friml, J.; Hilson, P. (2012). GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Development Cell*, 22 678-685.
- Wyn, J.R.G.; Pollard, A. (1983). Proteins, enzymes and inorganic ions, En: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, vol 15B*. Springer, New York, 528-562.
- Zhen, R.G.; Kim, E.J.; Rea, P.A. (1997). The molecular and biochemical basis of pyrophosphate-energized proton translocation at the vacuolar membrane. *Advances in Botanical Research*, 27: 297-337.
- Zhu, J.; Shi, H.; Lee, B.H.; Damsz, B.; Cheng, S.; Stirn, V.; Zhu, J.K.; Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A. (2004). An Arabidopsis homeodomain transcription factor gene, *HOS9*, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 9873-9878.
- Zhu, J.-K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6: 66-71.