

ÍNDICE GENERAL

1- INTRODUCCIÓN	1
1.1- Estrés por frío	1
1.1.1- Concepto de estrés en fisiología vegetal	1
1.1.2- Tipos de estrés	2
1.1.3- Relevancia del estudio del estrés en plantas	2
1.1.4- Mecanismos generales de respuesta al estrés	3
1.1.5- Estrés por bajas temperaturas en plantas	4
1.1.5.1- Percepción y transducción de la señal de frío	5
1.1.5.2- Regulación de la expresión génica	8
1.1.5.2.1- Regulación transcripcional	8
1.1.5.2.2- Regulación postranscripcional	11
1.1.5.2.3- Regulación traduccional	12
1.1.5.2.4- Regulación postraduccional	13
1.1.5.2.5- Regulación independiente de la ruta CBF	15
1.1.5.3- Respuestas estructurales y bioquímicas	17
1.2- Remolacha (<i>Beta vulgaris</i>). Importancia agronómica	21
1.3- Sistemas modelo	23
1.3.1- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.3.1.1- SEC14	24
1.3.1.1.1- Descripción dominio y familia	24
1.3.1.1.2- Intercambio lipídico	26
1.3.1.1.3- Función biológica	28
1.3.1.1.4- Sec14p y balsas lipídicas	31
1.3.1.2- TAT2 y transporte de triptófano	32
1.3.2- <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
1.3.2.1- Patelinas, familia multigénica	36
1.3.2.1.1- Patelinas y balsas lipídicas	40
1.3.2.2- PIN2 y auxinas	42
2- OBJETIVOS	49
3- MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1- Material biológico	53
3.1.1- <i>Beta vulgaris</i>	53
3.1.2- <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
3.1.3- <i>Escherichia coli</i>	54
3.1.4- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
3.1.5- <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	54
3.1.6- <i>Nicotiana benthamiana</i>	54
3.1.7- Vectores de clonación y transformación	54
3.2- Medios de cultivo	56

3.2.1- Medios para el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
3.2.2- Medios para el crecimiento de bacterias.....	56
3.2.3- Medios para el crecimiento de levadura	57
3.2.4- Sustancias termolábiles de selección	57
3.3- Manipulación y crecimiento de <i>Beta vulgaris</i>	58
3.4- Manipulación y crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
3.4.1- Esterilización de semillas	58
3.4.2- Condiciones de cultivo in vitro.....	58
3.4.3- Condiciones de cultivo en invernadero	58
3.4.4- Fertilización cruzada para obtención de dobles mutantes.....	59
3.4.5- Transformación de <i>A. thaliana</i> mediante <i>A. tumefaciens</i>	59
3.4.5.1- Selección de líneas transgénicas y obtención de homocigotos	59
3.4.6- Análisis fenotípicos.....	60
3.4.6.1- Ensayo de germinación.....	60
3.4.6.2- Medida de longitud de raíces.....	60
3.4.6.3- Medida de área de cotiledones	60
3.4.6.4- Medida de área de semillas	60
3.4.6.5- Medida de longitud de tallos	61
3.4.6.6- Ensayo de número de ramificaciones	61
3.4.6.7- Ensayo de número de hojas de roseta	61
3.4.6.8- Ensayo de número de silicuas	61
3.4.6.9- Ensayo de estadio de desarrollo.....	61
3.5- Manipulación y crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	62
3.5.1- Preparación de células competentes	62
3.5.2- Transformación de células competentes	62
3.6- Manipulación y crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
3.6.1- Preparación de células competentes para choque térmico	63
3.6.2- Transformación de células competentes por el método de alta eficiencia	63
3.6.3- Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos)	63
3.7- Manipulación y crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
3.7.1- Preparación de células competentes	64
3.7.2- Transformación mediante electroporación.....	64
3.8- Manipulación y crecimiento de <i>Nicotiana benthamiana</i>	64
3.8.1- Cultivo en invernadero	64
3.8.2- Transformación transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	64
3.8.3- Obtención de protoplastos a partir de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	65
3.8.4- Transfección de protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i>	65
3.9- Purificación, manipulación y análisis de ácidos nucleicos	66
3.9.1- Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	66
3.9.2- Aislamiento de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	66

3.9.3- Aislamiento de ADN genómico de <i>A. thaliana</i>	67
3.9.4- Aislamiento de ADN genómico de <i>B. vulgaris</i>	67
3.9.5- Tratamiento de ADN con endonucleasas de restricción.....	67
3.9.6- Reacciones de ligación de ADN.....	67
3.9.7- Electroforesis de ADN.....	68
3.9.8- Purificación de fragmentos de ADN.....	68
3.9.9- Aislamiento de ARN de <i>A. thaliana</i>	68
3.9.10- Aislamiento de ARN de <i>B. vulgaris</i>	69
3.9.11- Electroforesis de ARN.....	69
3.9.12- Marcaje radioactivo de sondas.....	69
3.9.13- Análisis <i>Northern blot</i>	70
3.9.14- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	70
3.9.14.1- Oligonucleótidos cebadores.....	70
3.9.14.2- Condiciones de PCR.....	72
3.9.14.3- PCR diagnóstica.....	73
3.9.14.4- RT-PCR semicuantitativa.....	73
3.10- Diseño y obtención de las construcciones plasmídicas para experimentos de transformación de plantas y levaduras.....	74
3.11- Manipulación de proteínas.....	75
3.11.1- Extracción de proteínas de <i>S. cerevisiae</i>	75
3.11.1.1- Extracción rápida.....	75
3.11.1.2- Purificación de proteína por resina cargada con níquel.....	76
3.11.2- Cuantificación de proteínas por el método Bradford.....	77
3.11.3- Análisis <i>Western Blot</i>	77
3.11.3.1- Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana.....	77
3.11.3.2- Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.....	78
3.12- Ensayo de unión a fosfolípidos.....	78
3.13- Estudio de localización celular de proteínas por microscopía confocal.....	79
3.14- Tratamiento de datos estadísticos.....	79
3.15- Herramientas de análisis bioinformático.....	79
4- RESULTADOS.....	83
4.1- Identificación del gen <i>BvCRIO4</i>	83
4.1.1- Aislamiento del gen <i>BvCRIO4</i>	83
4.1.2- Características generales del gen <i>BvCRIO4</i>	85
4.2- Estudio filogenético de <i>CRIO4</i>	91
4.3- Caracterización Bioquímica de <i>CRIO4</i>	93
4.3.1- Ensayo de complementación a <i>SEC14</i> de levadura.....	93
4.3.2- Fenotipo de la sobreexpresión de <i>CRIO4</i> en levadura.....	94
4.3.3- Ensayo de unión a fosfolípidos.....	95
4.4- Localización subcelular de <i>CRIO4</i>	97

4.4.1- Expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	97
4.4.2- Transfección protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i>	98
4.4.3- <i>Arabidopsis thaliana</i> , líneas de sobreexpresión de <i>CRIO4</i>	98
4.5- Coexpresión con <i>TAT2</i> en levadura	100
4.6- Estudio Genético de <i>CRIO4</i>	102
4.6.1- Patrón de expresión en <i>Beta vulgaris</i>	102
4.6.2- Fenotipo de pérdida de función de <i>Arabidopsis thaliana</i>	103
4.6.3- Fenotipo de sobreexpresión de <i>CRIO4</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	107
4.7- Coexpresión con <i>PIN2</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	112
5- DISCUSIÓN	117
6- CONCLUSIONES	129
7- BIBLIOGRAFÍA	133

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Algunos agentes estresantes para las plantas	2
Tabla 2: ADNc identificados en el rastreo de genes que confieran tolerancia a frío	84
Tabla 3: Composición aminoacídica de CRIO4	86
Tabla 4: Tipos de motivos ricos en prolina. Encuadrados en rojo, los motivos que se encuentran en la proteína CRIO4	89
Tabla 5: Ortólogos de <i>CRIO4</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
Tabla 6: Ortólogos de <i>CRIO4</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	92
Figura 1: Transición de fases en la membrana plasmática debida al estrés por frío	6
Figura 2: Modelo de la ruta de MKK.....	27
Figura 3: Regulación de la ruta de señalización CBF durante el estrés por frío	11
Figura 4: Estructura de dominios de proteínas tipo Sec14 en eucariotas	24
Figura 5: Detalle de la estructura de Sec14p, con el bolsillo hidrofóbico abierto, y Sfh1p, con el bolsillo hidrofóbico cerrado.....	25
Figura 6: Sitios de unión de la cabeza polar de PI y de PC, al dominio Sec14.....	26
Figura 7: Esquema de la regulación de la PI4K por Sec14	26
Figura 8: Representación del intercambio heterotípico entre PC y PI en Sec14.....	27
Figura 9: Esquema de la función de Sec14p en la ruta de secreción desde Golgi, en levadura.....	29
Figura 10: Diversidad de resultados biológicos de las PITPs tipo Sec14 de levadura.....	30
Figura 11: Localización subcelular de Tat2p bajo condiciones de alto y bajo contenido de triptófano en el medio.....	33
Figura 12: Localización subcelular de Tat2p en células del mutante termosensible <i>sec14^{ts}</i> , bajo condiciones de bajo contenido de triptófano en el medio	33
Figura 13: Modelo de localización de Tat2p	34
Figura 14: Diagrama de la estructura de dominio de las PATLs en Arabidopsis	36
Figura 15: Análisis filogenético de las PATLs de plantas	36
Figura 16: Proteínas tipo Sec14 en eucariotas	37
Figura 17: Patrón de expresión de <i>PATL1</i> en Arabidopsis.....	38
Figura 18: Unión a fosfoinosítidos de <i>PATL1</i>	38
Figura 19: Representación esquemática del flujo de auxinas en el ápice radicular	42
Figura 20: Tráfico de membranas durante el comienzo la formación de la placa celular y su maduración.....	44
Figura 21: Tráfico intracelular de PIN2 afectado por el estrés por frío	45
Figura 22: Esquema de la producción de la biblioteca de ADNc de remolacha y diagrama del rastreo de dicha biblioteca de ADNc en busca de genes que confirieran tolerancia a frío por sobre expresión en levadura, donde se identificó el gen <i>BvCRIO4</i>	83
Figura 23: Tolerancia a frío conferida por la sobreexpresión del ADNc CRIO4	84
Figura 24: Secuencia de nucleótidos del gen <i>BvCRIO4</i>	85

Figura 25: Estructura de dominios de la proteína CRIO4	86
Figura 26: Predicción de sitios de fosforilación en CRIO4 con NetPhos 2.0	87
Figura 27: Predicción de sitios de fosforilación en CRIO4 con PhosPhAt 4.0	87
Figura 28: Diagrama de la estructura de dominios de CRIO4 comparada con la de las PATLs en <i>A. thaliana</i>	88
Figura 29: Alineamiento de CRIO4 y PATL1 de <i>A. thaliana</i> que muestra la R266 de PATL1....	88
Figura 30: Localización del gen <i>CRIO4</i> , denominado LOC104898006, en el cromosoma 1 de remolacha y estructura de exones e intrones del mismo gen.....	90
Figura 31: Cladograma de <i>CRIO4</i> y la familia <i>PATLs</i> , a partir de secuencias aminoacídicas ...	92
Figura 32: Ensayo de complementación a Sec14p de levadura con CRIO4.....	93
Figura 33: Gráfica del ensayo de complementación a Sec14p de levadura con el dominio Sec14 de CRIO4, en medio líquido	94
Figura 34: Medios de cultivo empleados en la búsqueda de fenotipo de la sobreexpresión de <i>CRIO4</i> en levadura.....	94
Figura 35: <i>Western Blot</i> de la proteína CRIO4 purificada mediante resina cargada con níquel.....	95
Figura 36: Esquema del ensayo de unión a fosfolípidos	96
Figura 37: Unión a fosfolípidos de CRIO4, comparada con PATL1	96
Figura 38: Expresión transitoria de <i>CRIO4</i> en células de la epidermis de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	96
Figura 39: Protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i> transfectados con el plásmido pJM729-CRIO4::GFP	98
Figura 40: Expresión de la fusión CRIO4::GFP en líneas transgénicas estables de <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
Figura 41: Expresión de <i>CRIO4</i> en tejido vascular de raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> , y acúmulos puntuales de CRIO4	100
Figura 42. Coexpresión de TAT2::GFP y CRIO4, a 10°C y 28°C, y en medios de cultivo que contienen triptófano o en condiciones de ayuno de éste.....	101
Figura 43: Expresión de <i>CRIO4</i> en diferentes tejidos de plántulas de remolacha	102
Figura 44: Expresión de <i>CRIO4</i> en hojas de remolacha, bajo condiciones de estrés por frío (4°C), estrés por calor (37°C) y estrés por sequía	103
Figura 45: Expresión de <i>CRIO4</i> en hojas de remolacha, bajo condiciones de luz, oscuridad y luz azul	103
Figura 46: Líneas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> empleadas	104
Figura 47: RT-PCR de líneas mutantes por inserción de T-DNA para los genes <i>PATL3</i> y <i>PATL5</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	104
Figura 48: Germinación de las líneas mutantes <i>patl3</i> , <i>patl5</i> y <i>patl3patl5</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> a 24°C y 10°C.....	105
Figura 49: Medida de la longitud de raíces de las líneas mutantes <i>patl3</i> , <i>patl5</i> y <i>patl3patl5</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> a 24°C y 10°C	105

Figura 50: Medida del área de los cotiledones y las semillas de las líneas mutantes <i>pat13</i> , <i>pat15</i> y <i>pat13pat15</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	106
Figura 51: Análisis <i>Northern blot</i> de líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que sobreexpresan el gen <i>CRIO4</i>	107
Figura 52: Medida del área de los cotiledones de las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	108
Figura 53: Cuantificación del número de hojas de la roseta y del número de silicuas del tallo principal, en plantas de las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	108
Figura 54: Medida del crecimiento en longitud en plantas de la línea silvestre Col-0 y las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	109
Figura 55: Medida del número de ramificaciones principales en plantas de la línea silvestre Col-0 y las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	109
Figura 56: Determinación del estadio de desarrollo en plantas de la línea silvestre Col-0 y las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	110
Figura 57: Expresión de la fusión CRIO4::GFP en células radiculares de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a varios estreses	111
Figura 58: Localización subcelular de PIN2, en raíz de plántulas transgénicas PIN2:GFP-CRIO4, a 24°C y 10°C.....	112