



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



FERTINAGRO

**Estudio de efectos protectores y  
mecanismos de acción frente a estrés  
abiótico de bioestimulantes de  
fertilizantes en *Saccharomyces cerevisiae***

Tesis Doctoral realizada por

**Marcos Caballero Molada**

Director

**Prof. Dr. Ramón Serrano Salom**

Valencia, mayo de 2016



## Índice de contenidos

RESUMEN .....	i
RESUM.....	iii
ABSTRACT .....	v
Siglas y abreviaturas.....	vii
Índice de Tablas.....	xi
Índice de Figuras .....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Los fertilizantes y la necesidad de una agricultura cada vez más eficiente y productiva.....	3
1.1. Perspectivas de la agricultura a nivel global .....	3
1.2. Los fertilizantes y su beneficio para la agricultura .....	5
1.3. Bioestimulantes de fertilizantes.....	6
2. El estrés abiótico .....	11
2.1. El problema del estrés abiótico y el cambio climático .....	11
2.2. Estrategias biotecnológicas para mejorar la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés abiótico .....	14
2.3. Efecto de los estreses abióticos en las células vegetales.....	15
3. La levadura como sistema modelo para la investigación en plantas.....	18
4. Homeostasis de aminoácidos en <i>S. cerevisiae</i> .....	18
4.1. La ruta TOR.....	19
4.2. La ruta GAAC (General Amino Acid Control).....	24
5. Homeostasis de hierro en <i>S. cerevisiae</i> .....	30
5.1. Transporte de hierro de alta afinidad y respuestas transcriptómicas y metabólicas a los niveles de hierro .....	31
5.2. Percepción de los niveles de hierro intracelulares: complejos Fe/S.....	36
5.3. Relación entre el hierro y el estrés oxidativo.....	38
OBJETIVOS.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , plásmidos y medios de cultivo .....	47
2. Bioestimulantes.....	49
3. Análisis del crecimiento y de la tolerancia a estrés .....	49
3.1. Ensayo de crecimiento en medio líquido .....	49
3.2. Ensayo de crecimiento en medio sólido .....	50
3.3. Ensayos de supervivencia a estrés oxidativo y a choque térmico .....	50

3.3.1.	Estrés oxidativo .....	50
3.3.2.	Choque térmico.....	50
4.	Ensayo de degradación de peróxido de hidrógeno.....	50
5.	Purificación y manipulación de ácidos nucleicos .....	51
5.1.	Aislamiento de DNA plasmídico en <i>E. coli</i> .....	51
5.2.	Aislamiento de DNA genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	51
5.3.	Electroforesis de DNA .....	52
5.4.	Aislamiento de RNA de <i>S. cerevisiae</i> .....	52
5.5.	Electroforesis de RNA bajo condiciones no desnaturalizantes .....	52
5.6.	Síntesis de cDNA.....	53
5.7.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). .....	53
5.8.	Digestión de DNA con endonucleasas de restricción.....	53
5.9.	Ligación de moléculas de DNA .....	54
6.	Técnicas de transferencia génica .....	54
6.1.	Transformación de <i>E. coli</i> .....	54
6.1.1.	Obtención de células competentes para transformación por choque térmico.....	54
6.1.2.	Transformación por choque térmico .....	54
6.2.	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .....	54
6.2.1.	Obtención de células competentes para transformación por choque térmico.....	54
6.2.2.	Transformación de células competentes de levadura por el método de alta eficiencia	55
7.	Análisis de la expresión génica con micromatrices de DNA.....	55
7.1.	Características de las micromatrices empleadas .....	55
7.2.	Preparación de la sonda de RNA para la hibridación .....	55
7.2.1.	Amplificación del RNA y síntesis del aa-RNA.....	55
7.2.2.	Acoplamiento con los fluoróforos.....	56
7.3.	Preparación de las micromatrices para la hibridación.....	56
7.4.	Prehibridación e hibridación de las micromatrices.....	56
7.5.	Lavado y escaneado de las micromatrices .....	57
7.6.	Preprocesamiento de los datos con Genepix.....	57
7.7.	Procesamiento de los datos con Accuity y análisis estadístico .....	57
8.	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	58
9.	Determinación del contenido total en hierro .....	58
10.	Localización subcelular de Aft1-GFP .....	59

11. Análisis estadísticos.....	59
RESULTADOS .....	61
1. Evaluación preliminar del crecimiento de la levadura en presencia de los bioestimulantes y establecimiento de las condiciones ideales de estudio .....	63
1.1. Estudio preliminar de los efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento de la levadura en medio YPD .....	63
1.2. Estudio preliminar de los efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento de la levadura en medio SD .....	66
2. Efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés abiótico de la levadura.....	70
3. Estudio del mecanismo de acción del bioestimulante Amino22 .....	74
3.1. Imitación del efecto del Amino22 con peptona de caseína ácida .....	74
3.2. Análisis del efecto individual de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura .....	76
3.3. Comparación del efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento de las cepas BY4741 y S288C.....	78
3.4. La presencia de aminoácidos reprime la expresión del regulón de Aft1.....	79
3.5. El efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés es independiente del factor de transcripción <i>AFT1</i> .....	81
3.6. El efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés se reduce con la activación constitutiva de la ruta GAAC y depende parcialmente de la ruta TORC1 ...	83
3.7. La ruta GAAC controla la expresión del regulón de hierro .....	86
4. Estudio del mecanismo de acción del bioestimulante Fulvato potásico .....	91
4.1. El Fulvato potásico provoca un aumento en el contenido intracelular de hierro y la represión de los genes del regulón de Aft1 .....	91
4.2. El uso del Fulvato potásico como fuente de hierro depende de <i>FET3</i> .....	93
4.3. El incremento de la tolerancia a estrés abiótico en presencia de Fulvato potásico depende de <i>FET3</i> .....	94
DISCUSIÓN.....	97
CONCLUSIONES .....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	123
ANEXOS .....	147
Anexo I.....	149
Anexo II.....	151



## RESUMEN

Este trabajo se basa en una colaboración entre el laboratorio del profesor doctor Ramón Serrano y la empresa de fertilizantes Fertinagro Nutrientes y está motivado por la necesidad creciente de incrementar la productividad de los cultivos agrícolas al mismo tiempo que se minimiza el impacto que la agricultura tiene sobre el medio ambiente. Fertinagro Nutrientes facilitó los siguientes seis bioestimulantes para el análisis de sus efectos sobre la tolerancia a estrés abiótico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aportando escasa (o nula en algunos casos) información acerca de su composición: Extracto de algas, Vinacillas, Fosfito, Ácido húmico, Amino22 y Fulvato potásico. La amplia conservación de rutas metabólicas y de los mecanismos moleculares de defensa frente a estrés abiótico entre levadura y plantas justifican el uso de *S. cerevisiae* como sistema modelo para este estudio.

Todos los bioestimulantes tienen, en mayor o menor medida, efectos positivos sobre la tolerancia de la levadura frente a al menos uno de los tipos de estrés abiótico estudiados. El Extracto de algas mejora el crecimiento en condiciones de estrés salino. El Vinacillas y el Fosfito protegen frente a estrés salino y choque térmico. El Ácido húmico incrementa la tolerancia a estrés oxidativo y choque térmico. Los dos bioestimulantes más polivalentes, el Amino22 y el Fulvato potásico, fueron estudiados en mayor profundidad con el objetivo de identificar sus mecanismos de acción.

El Amino22, que es el bioestimulante más efectivo de los estudiados, mejora considerablemente el crecimiento en ausencia de estrés y bajo estrés osmótico y, en menor medida, también resulta beneficioso para el crecimiento en condiciones de estrés salino. Asimismo, el Amino22 proporciona tolerancia frente a estrés oxidativo y choque térmico. Mediante la comparación con una peptona de caseína ácida se comprobó que el principio activo responsable del efecto del Amino22 son los aminoácidos que contiene. El análisis del efecto del Amino22 sobre la expresión global de genes empleando micromatrices de DNA muestra que el bioestimulante reprime tanto genes regulados por Gcn4 e involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y vitaminas como genes regulados por Aft1, implicados en la homeostasis de hierro. El efecto positivo de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés está relacionado, en parte al menos, con la activación de la ruta TORC1 y, además, requiere la inhibición parcial de la ruta GAAC. En cambio, dicho efecto positivo es independiente de la represión del regulón de Aft1. A raíz de la observación de que los aminoácidos reprimen el regulón de hierro, se profundizó en el estudio de la relación entre la homeostasis de aminoácidos y la de hierro en *S. cerevisiae* llegando a un modelo de regulación según el cual la activación de la ruta GAAC induciría la localización nuclear de Aft1 y la consiguiente expresión de sus genes diana, mientras que la inhibición de dicha ruta por la presencia de aminoácidos tendría el efecto contrario. La actividad de Aft1 sería controlada a través del estado de fosforilación de eIF2 $\alpha$  e, hipotéticamente, implicaría la regulación de la formación de complejos Fe/S.

El Fulvato potásico mejora la tolerancia a estrés osmótico, oxidativo y térmico. Los análisis de expresión mediante micromatrices y qRT-PCR indican que el tratamiento con Fulvato potásico reprime el regulón de Aft1. Esta represión se puede explicar por un aumento en el contenido

intracelular de hierro, cuya entrada depende de la oxidorreductasa codificada por el gen *FET3*. La tolerancia a estrés abiótico que proporciona el Fulvato potásico también depende de *FET3*, por lo que se concluye que el mecanismo de acción de este bioestimulante se basa en un incremento de la disponibilidad de hierro, el cual se acumula en las células sin producir daño oxidativo extra.

## RESUM

Aquest treball es basa en una col·laboració entre el laboratori del professor doctor Ramón Serrano i l'empresa de fertilitzants Fertinagro Nutrientes i està motivat per la necessitat creixent d'incrementar la productivitat dels cultius agrícoles al mateix temps que es minimitza l'impacte de l'agricultura sobre el medi ambient. Fertinagro Nutrientes va facilitar els següents sis bioestimulants per a l'anàlisi dels seus efectes sobre la tolerància a estrès abiòtic en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, aportant escassa (o nul·la en alguns casos) informació sobre la seua composició: Extracte d'algues, Vinacillas, Fosfit, Àcid húmic, Amino22 i Fulvat potàssic. L'àmplia conservació de les rutes metabòliques i dels mecanismes moleculars de defensa front a l'estrès abiòtic entre llevat i plantes justifiquen l'ús de *S. cerevisiae* com a sistema model per a este estudi. Tots els bioestimulants tenen, en major o menor mesura, efectes positius sobre la tolerància del llevat front a almenys un dels tipus d'estrès abiòtic estudiats. L'Extracte d'algues millora el creixement en condicions d'estrès salí. El Vinacillas i el Fosfit protegeixen front a l'estrès salí i xoc tèrmic. L'Àcid húmic incrementa la tolerància a estrès oxidatiu i xoc tèrmic. Els dos bioestimulants més polivalents, l'Amino22 i el Fulvat potàssic, van ser estudiats en major profunditat amb l'objectiu d'identificar els seus mecanismes d'acció.

L'Amino22, que és el bioestimulant més efectiu dels estudiats, millora considerablement el creixement en absència d'estrès i baix estrès osmòtic i, en menor mesura, també resulta beneficiós per al creixement en condicions d'estrès salí. Així mateix, l'Amino22 proporciona tolerància front a l'estrès oxidatiu i xoc tèrmic. Mitjançant la comparació amb una peptona de caseïna àcida es va comprovar que el principi actiu responsable de l'efecte de l'Amino22 són els aminoàcids que conté. L'anàlisi de l'efecte de l'Amino22 sobre l'expressió global de gens emprant micromatrius de DNA mostra que el bioestimulant reprimeix tant gens regulats per Gcn4 i involucrats en la biosíntesi d'aminoàcids i vitamines com gens regulats per Aft1, implicats en l'homeòstasi del ferro. L'efecte positiu dels aminoàcids sobre el creixement i tolerància a estrès està relacionat, en part almenys, amb l'activació de la ruta TORC1 i, a més, requereix la inhibició parcial de la ruta GAAC. En canvi, aquest efecte positiu és independent de la repressió del reguló de Aft1. Arran de l'observació que els aminoàcids reprimeixen el reguló de ferro, es va aprofundir en l'estudi de la relació entre l'homeòstasi d'aminoàcids i la de ferro en *S. cerevisiae* arribant a un model de regulació segons el qual l'activació de la ruta GAAC induiria la localització nuclear de Aft1 i la consegüent expressió dels seus gens diana, mentre que la inhibició d'aquesta ruta per la presència d'aminoàcids tindria l'efecte contrari. L'activitat de Aft1 seria controlada a través de l'estat de fosforilació d' eIF2 $\alpha$  i, hipotèticament, implicaria la regulació de la formació de complexos Fe/S.

El Fulvat potàssic millora la tolerància a estrès osmòtic, oxidatiu i tèrmic. Les anàlisis d'expressió mitjançant micromatrius i qRT-PCR indiquen que el tractament amb Fulvat potàssic reprimeix el reguló de Aft1. Aquesta repressió es pot explicar per un augment en el contingut intracel·lular de ferro, l'entrada del qual depén de la oxidorreductasa codificada pel gen *FET3*. La tolerància a estrès abiòtic que proporciona el Fulvat potàssic també depén de *FET3*, per la qual cosa es conclou que el mecanisme d'acció d'aquest bioestimulant es basa en un increment de la disponibilitat de ferro, el qual s'acumula en les cèl·lules sense produir dany oxidatiu extra.



## ABSTRACT

This PhD thesis is based on a collaboration between Professor Dr. Ramon Serrano's laboratory and the fertilizer company Fertinagro Nutrientes and it's motivated by the increasing need in agriculture to increase crop productivity while minimizing its impact on the environment. Fertinagro Nutrientes supplied the following six bioestimulants for analyzing its effects on tolerance to abiotic stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, providing no (or very limited in some cases) information about its composition: Seaweed extract, Vinacillas, Phosphite, Humic Acid, Amino22 and Potassium fulvate. The broad conservation of metabolic pathways and the molecular mechanisms involved in abiotic stress response between yeast and plants allows the use of *S. cerevisiae* as a suitable model system for this study.

All bioestimulants showed, to a greater or lesser extent, positive effects on yeast tolerance against at least one of the abiotic stresses in study. Seaweed extract improves growth under salt stress. Phosphite and Vinacillas protect against salt stress and heat shock. Humic acid increases tolerance to oxidative stress and heat shock. The two most versatile bioestimulants, Amino22 and Potassium fulvate, were further investigated in order to identify their mechanisms of action.

Amino22, which is the most effective biostimulant, considerably improves growth in the absence of stress and under osmotic stress and, to a lesser extent, it also enhances growth under salt stress conditions. Amino22 also provides tolerance against oxidative stress and heat shock. By comparison with an acid casein peptone it was confirmed that the active substance in Amino22 are amino acids. Analysis of global gene expression using DNA microarrays showed that Amino22 treatment represses both Gcn4 regulated genes (which are involved in amino acid and vitamin biosynthesis) and Aft1 regulated genes (which are involved in iron homeostasis). The positive effect of amino acids on growth and stress tolerance is related, at least in part, to the activation of TORC1 pathway and it also requires a partial inhibition of GAAC pathway. By contrast, this positive effect is independent of the Aft1 regulon repression. Following the observation that amino acid treatment represses iron regulon expression, we studied more in depth the relationship between amino acid and iron homeostasis in *S. cerevisiae*. We suggest a regulation model according to which the activation of GAAC pathway induces nuclear localization of Aft1 and subsequent expression of its target genes, whereas inhibition of this pathway by amino acids may have the opposite effect. Aft1 activity may be controlled through eIF2 $\alpha$  phosphorylation and, hypothetically, it would involve regulation Fe/S biosynthesis.

Potassium fulvate improves tolerance to osmotic, oxidative and heat stress. Microarray and qRT-PCR expression analysis indicate that Potassium fulvate represses Aft1 regulon. This repression can be explained by an increase in intracellular iron content, whose absorption depends on an oxidoreductase encoded by the *FET3* gene. Tolerance to abiotic stress by Potassium fulvate also depends on *FET3*, therefore it is concluded that the mechanism of action of this biostimulant is based on an increased iron availability, which is accumulated in yeast cells without causing oxidative damage.



## Siglas y abreviaturas.

**4E-BP:** *4E Binding Proteins*  
**aa-RNA:** *aminoallyl-RNA*  
**ABF:** *ABRE Binding Factor*  
**ABS<sub>660</sub>:** Absorbancia a 660 nm  
**ANOVA:** Analysis of Variance  
**AtHK1:** *Arabidopsis thaliana Histidine Kinase-1*  
**BPS:** Batofenantrolina disulfonato  
**bZIP:** *basic leucine Zipper transcription factor*  
**CBF/DREB:** *C-repeat-Binding Factor/Dehydration-Responsive Binding protein*  
**CDPK:** *Calcium-Dependent Protein Kinase*  
**CIA:** *Cytosolic Iron-Sulphur protein Assembly machinery*  
**COR:** *Cold-Responsive protein*  
**C-Terminal:** Carboxi-terminal  
**CTD:** *C-Terminal Domain*  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**dNTPs:** Deoxyribonucleotide Triphosphate  
**DO:** Densidad Óptica  
**DSI:** *Drought Severity Index*  
**DTT:** Ditioneitol  
**EDDHA:** ácido etilendiamino-N,N'-bis(2-hidroxifenilacético)  
**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético  
**EGO:** *Exit from Growth Arrest*  
**EGOC:** *EGO Complex*  
**eIF2:** *eukaryotic Initiation Factor 2*  
**eIF4F:** complejo heterotrimérico formado por eIF4E-eIF4G-eIF4A  
**FAO:** *Food and Agriculture Organization of the United Nations*  
**FAT:** FRAP, ATM y TTRAP  
**FATC:** Dominio FAT en el extremo C-terminal  
**FeRE:** *Fe deficiency-Responsive Element*  
**FKBP12:** *FK506 Binding Protein 12*  
**FRB:** *FKBP12-Rapamycin Binding domain*  
**GAAC:** *General Amino Acid Control*  
**GAP:** *GTPase-Activating Protein*  
**GARP:** *Golgi-Associated Retrograde Protein*  
**GCN:** *General Control Noninducible or Nonderepressible*  
**GCN2:** *General Control Nonderepressible-2*  
**GEF:** *Guanine nucleotide Exchange Factor*  
**GFP:** *Green Fluorescent Protein*  
**GSH:** Glutación reducido  
**GSSG:** Glutación oxidado  
**GDP:** *Guanosine Diphosphate*  
**GTP:** *Guanosine Triphosphate*

**HEAT:** dominios encontrados originalmente en la Huntingtina, en el *factor de Elongación 3 (EF3)*, en la proteína fosfatasa 2A y en TOR1

**HisRS:** *Histidyl-tRNA Synthetase*

**HRI:** *Haem-Regulated Inhibitor*

**HSF:** *Heat Shock Factor*

**HSP:** *Heat Shock Protein*

**IPCC:** *Intergovernmental Panel on Climate Change*

**ISC:** *mitochondrial Iron-Sulphur Cluster*

**ISR:** *Integrated Stress Response*

**LEA:** *Late Embryogenesis Abundant*

**LOWESS:** *Locally Weighted Scatter plot Smoother*

**MAP** (quinasa): *Mitogen-Activated Protein* (kinase)

**MES:** ácido 2-morfolinoetanosulfónico

**MMA:** Ministerio de Medio Ambiente

**MMS:** Metilmetanosulfonato

**MODIS:** *Moderate resolution Imaging Spectroradiometer*

**MRS:** Metionil-tRNA Sintetasa

**NADP<sup>+</sup>:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada

**NADPH+H<sup>+</sup>:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida

**NASA:** *National Aeronautics and Space Administration*

**ORF:** *Open Reading Frame*

**PABP:** *Poly A Binding Protein*

**PCI:** fenol neutralizado:cloroformo:alcohol isoamílico

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**PEG:** Polietilenglicol

**PERK:** *Pancreatic eIF2 $\alpha$ /PKR-Endoplasmic Reticulum-related Kinase*

**Pi:** fosfato inorgánico

**PI3K:** *Phosphatidylinositol 3 Kinase*

**PI4K:** *Phosphatidylinositol 4 Kinase*

**PIKK:** *Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase*

**Pipes:** *Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulphonic acid]*

**PK:** Dominio quinasa de Gcn2

**PKR:** *double-stranded RNA-activated Protein Kinase*

**PLD:** *Phospholipase D*

**PP2A:** *Protein Phosphatase 2A*

**PtdOH:** *Phosphatidic acid*

**PX:** *Peroxidase*

**qRT-PCR:** PCR cuantitativa en tiempo real

**ROS:** *Reactive Oxygen Species*

**SAM:** *Significant Analysis of Microarrays*

**SD:** *Synthetic Dextrose*

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**SEACAT:** *Seh1-Associated subComplex Activating TORC1 signalling*

**SEACIT:** *Seh1-Associated subComplex Inhibiting TORC1 signalling*

**SGal:** Medio mínimo con galactosa

**SGD:** *Saccharomyces Genome Database*  
**SRP:** *Signal Recognition Particle*  
**SOD:** *Superoxide Dismutase*  
**SP1:** *Stable Protein 1*  
**TB:** *Transformation Buffer*  
**TC:** *Ternary Complex*  
**TCA:** *Tricarboxylic Acid cycle*  
**TOR:** *Target Of Rapamycin*  
**TORC1:** *TOR Complex 1*  
**TORC2:** *TOR Complex 2*  
**UAS<sub>GCRE</sub>:** *Upstream Activating Sequence GCN4 Responsive*  
**uORF:** *upstream ORF*  
**YNB:** *Yeast Nitrogen Base*  
**YPD:** *Yeast extract Peptone Dextrose*



## Índice de Tablas

Tabla I.1. Principales genes del regulón de Aft1 y Aft2 con la localización subcelular y las funciones de sus respectivos productos.....	33
Tabla M.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizados en este trabajo.....	47
Tabla M.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	48
Tabla R.1. Resumen de los efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura.....	73
Tabla R.2. Incrementos estadísticamente significativos de al menos un 5 % en la tasa de crecimiento y un 10 % en el rendimiento de cultivos crecidos en presencia de aminoácidos bajo condiciones de ausencia de estrés (SD) y de estrés osmótico (sorbitol).....	76
Tabla R.3. Genes inducidos en células tratadas con Amino22 (AM) respecto a células sin tratar (control).....	79
Tabla R.4. Genes reprimidos en células tratadas con Amino22 (AM) respecto a células sin tratar (control).....	80
Tabla R.5. Genes reprimidos en células tratadas con Fulvato potásico (FU) respecto a células sin tratar (control).....	92
Tabla A.1. Cebadores utilizados para las reacciones de qRT-PCR.....	149
Tabla A.2. Composición aminoacídica de la peptona de caseína ácida (Laboratorios Conda)..	151

## Índice de Figuras

Figura I.1. Perspectiva de la evolución de la población mundial en el periodo comprendido entre los años 1950 y 2050.....	3
Figura I.2. Perspectiva de la evolución de las tierras cultivables en el periodo comprendido entre los años 1961 y 2050.....	4
Figura I.3. Índice de Severidad de Sequía (DSI, Drought Severity Index) anual global entre los años 2000-2011 según el registro MODIS (MODerate resolution Imaging Spectroradiometer).....	12
Figura I.4. Regiones afectadas por salinidad a nivel mundial.....	13
Figura I.5. La complejidad de la respuesta de las plantas al estrés abiótico.....	17
Figura I.6. Estructura y complejos de la quinasa TOR.....	20
Figura I.7. El complejo EGO es un regulador principal de TORC1.....	22

Figura I.8. Las quinasas de eIF2 $\alpha$ en mamíferos.....	25
Figura I.9. Representación simplificada de la ruta de iniciación de la traducción en eucariotas.....	26
Figura I.10. Dominios funcionales de Gcn2.....	27
Figura I.11. Modelo para el control traduccional de GCN4.....	29
Figura I.12. Respuesta a ayuno de hierro en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
Figura I.13. El papel de los complejos Fe/S en la regulación de los factores de transcripción de respuesta a hierro en <i>S. cerevisiae</i> .....	38
Figura I.14. Especies reactivas de oxígeno y mecanismos de defensa en levadura.....	39
Figura R.1. Efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio YPD.....	64
Figura R.2. La inhibición del crecimiento causada por el Fosfito se contrarresta añadiendo fosfato al medio de cultivo.....	65
Figura R.3. Efecto del Fosfito sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.....	67
Figura R.4. Efecto del Fulvato potásico sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.....	67
Figura R.5. Efecto del Amino22 sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.....	68
Figura R.6. Efecto del Vinacillas sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.....	69
Figura R.7. Efecto del Extracto de algas sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.....	69
Figura R.8. Efecto del Ácido húmico sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.....	70
Figura R.9. Efecto de los bioestimulantes sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura.....	71
Figura R.10. Efecto de los bioestimulantes sobre el crecimiento en presencia de NaCl 1 M.....	72
Figura R.11. La adición de 1 g/l de casaminoácidos reproduce el efecto del Amino22 sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura.....	75
Figura R.12. Efecto individual de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés....	77
Figura R.13. Comparativa del efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento de las cepas BY4741 y S288C.....	79
Figura R.14. Los aminoácidos provocan la represión del regulón de Aft1 en ausencia de estrés y en condiciones de estrés osmótico.....	81

Figura R.15. El efecto positivo de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés es independiente de <i>AFT1</i> .....	82
Figura R.16. El efecto positivo de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés en levadura no requiere <i>Gcn2</i> pero se reduce cuando <i>Gcn2</i> está constitutivamente activada.....	84
Figura R.17. El efecto positivo de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés en levadura depende parcialmente de la ruta TORC1.....	85
Figura R.18. La presencia de aminoácidos provoca una disminución en el contenido total de hierro dependiente de <i>AFT1</i> .....	86
Figura R.19. La ruta GAAC regula la expresión de los genes involucrados en la homeostasis de hierro.....	88
Figura R.20. Los mutantes de <i>GCN2</i> no presentan alteraciones en el contenido intracelular de hierro.....	88
Figura R.21. La activación de <i>Gcn2</i> provoca la localización de <i>Aft1</i> en el núcleo.....	89
Figura R.22. La pérdida de función de <i>GCN2</i> proporciona tolerancia a medio pobre en hierro mientras que su activación constitutiva da mayor sensibilidad.....	90
Figura R.23. El mutante <i>GCN2<sup>c</sup></i> es incapaz de crecer en medio con galactosa como fuente de carbono.....	91
Figura R.24. El Fulvato potásico provoca la represión del regulón de <i>Aft1</i> en ausencia de estrés y en condiciones de estrés osmótico.....	92
Figura R.25. El Fulvato potásico provoca un aumento dependiente de <i>AFT1</i> en el contenido total de hierro.....	93
Figura R.26. Requerimiento de <i>FET3</i> para el crecimiento en medio pobre en hierro con fulvato potásico.....	94
Figura R.27. El efecto positivo del Fulvato potásico sobre la tolerancia a estrés depende de <i>FET3</i> .....	95
Figura D.1. Modelo para el mecanismo de acción de los aminoácidos en levadura.....	110



# INTRODUCCIÓN

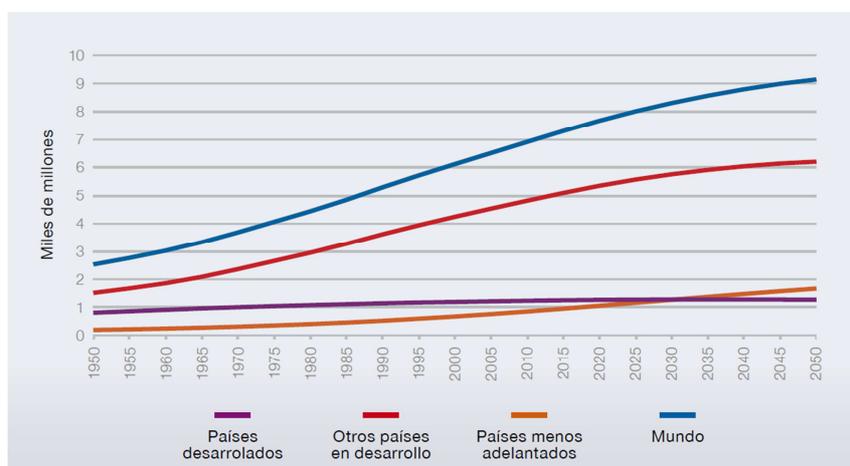


## 1. Los fertilizantes y la necesidad de una agricultura cada vez más eficiente y productiva

### 1.1. Perspectivas de la agricultura a nivel global

En el siglo actual, la seguridad alimentaria y el bienestar de miles de millones de personas van a depender en gran medida del éxito que tenga la agricultura a la hora de afrontar los múltiples desafíos que se le presentan. Será necesario aumentar la producción de alimentos para dar de comer a una población en crecimiento con una mano de obra menor y obtener materias primas para el mercado de la bioenergía, sin que esto suponga perjuicio para la alimentación humana. El progreso agrícola será imprescindible para la prosperidad de los países en desarrollo. Paralelamente, la agricultura tendrá que adaptarse al cambio climático y se deberán desarrollar métodos de producción más eficientes y sostenibles.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO, del inglés *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2009) se prevé que la población mundial sea de 9100 millones de personas en el año 2050, unos 2000 millones más que en la actualidad, y se establezca alrededor de los 10000 millones a finales de siglo, teniendo lugar la mayor parte de este crecimiento en los países en desarrollo (Figura I.1).



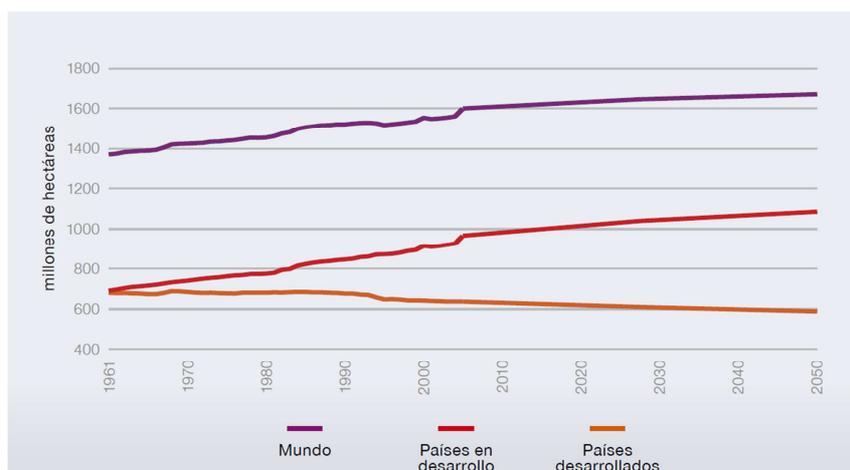
**Figura I.1. Perspectiva de la evolución de la población mundial en el periodo comprendido entre los años 1950 y 2050.** Adaptado de FAO (2009).

Hacia mediados de siglo, la población rural disminuirá y el 70 % de la población mundial vivirá en áreas urbanas (frente al 49 % de la actualidad). Asimismo, el crecimiento económico mundial previsto podría conllevar una reducción importante del hambre y de la pobreza en los países en desarrollo, donde el progreso agrícola será clave. Por tanto, la demanda de alimentos seguirá creciendo de forma significativa en las próximas décadas y en paralelo tendrá que hacerlo la producción y el comercio de productos agrícolas. De hecho, las estimaciones indican que para alimentar a una población mundial de 9100 millones de personas en 2050 haría falta incrementar la producción de alimentos en un 70 % en el periodo entre 2005/07 y 2050, un 100 % en el caso de los países en desarrollo. El aumento del poder adquisitivo y la progresiva urbanización de las sociedades en desarrollo también tendrán como consecuencia probable cambios en los hábitos de consumo, que requerirán dedicar una mayor

## Introducción

extensión de terreno cultivable a la producción de piensos para el ganado. Se calcula que la producción anual de cereales deberá aumentar en casi mil millones de toneladas para abastecer la demanda prevista tanto para el consumo humano como animal (actualmente la cifra está en torno a los 2 mil millones). Además, las tendencias pueden verse alteradas por el desarrollo de los biocombustibles, el cual podría provocar un aumento mayor de la demanda.

El desarrollo de la tecnología agrícola (fertilizantes, plaguicidas, herbicidas, maquinaria, sistemas de irrigación, mejora genética de las especies cultivadas) en las últimas décadas ha permitido un aumento espectacular de la producción de alimentos en todo el mundo y ha sido clave en la prosperidad de los países desarrollados. Si bien este incremento no ha servido para acabar con la desnutrición en todas las regiones del planeta, sí que ha decrecido su incidencia a pesar del crecimiento de la población. Existen los recursos de tierras suficientes para seguir alimentando a la población mundial en el futuro, erradicar el hambre y reducir la pobreza. No obstante, esto solo se conseguirá si se realizan los esfuerzos necesarios en la investigación y en el desarrollo de la tecnología agrícola con el objetivo de aprovechar mejor dichos recursos. Se ha estimado que un 90 % del crecimiento de la producción agrícola a nivel mundial se deberá a rendimientos más altos y a la intensificación de los cultivos, mientras que una pequeña parte a la ampliación de la superficie de las tierras cultivables, que tendrá lugar únicamente en los países en desarrollo, principalmente en el África subsahariana y América Latina, mientras que en los países desarrollados dicha superficie disminuirá (Figura I.2).



**Figura I.2. Perspectiva de la evolución de las tierras cultivables en el periodo comprendido entre los años 1961 y 2050.** Adaptado de FAO (2009)

De hecho, en muchas regiones existe la dificultad de mantener los cultivos o extenderlos a zonas aún no utilizadas, bien por la baja fertilidad del suelo, por su alto valor ecológico, por la limitación en la disponibilidad de agua para regadíos o por la industrialización y desarrollo urbanístico. Sin duda, el próximo reto de la agricultura está en seguir aumentando el rendimiento de los cultivos en la misma o en menor superficie de tierra y en minimizar los efectos negativos sobre el medio ambiente.

## 1.2. Los fertilizantes y su beneficio para la agricultura

Tal y como propone Park (2001), los fertilizantes se pueden definir como materiales orgánicos o inorgánicos que se aplican a la tierra, en forma sólida o líquida, y proporcionan nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, normalmente a través de su absorción por las raíces. Se emplean para compensar la pérdida de nutrientes debida a las cosechas, a la lixiviación o al intercambio gaseoso, y para complementar los nutrientes del suelo, manteniendo o mejorando la fertilidad de la tierra. Según su naturaleza química se puede hablar de fertilizantes naturales o fertilizantes químicos. Los primeros hacen referencia al estiércol u otros materiales orgánicos mientras que los segundos a materiales inorgánicos procedentes de la industria química, como por ejemplo el sulfato amónico, la urea, el nitrato amónico, los superfosfatos (simple, enriquecido o triple) y la potasa. Como norma general, el término “fertilizante” hará alusión en esta tesis únicamente a los fertilizantes químicos.

Tanto en los países más avanzados como los países en desarrollo, los fertilizantes son esenciales para mantener o incrementar la producción agrícola, es más, una buena parte de la alimentación humana a nivel mundial depende directa o indirectamente de ellos (Park, 2001). Las estimaciones indican que, como mínimo, el porcentaje del rendimiento de los cultivos atribuible al efecto de los fertilizantes comerciales está entre el 30 y el 50 % (Stewart *et al.*, 2005), no obstante, la respuesta de las plantas a la aplicación del fertilizante varía en función de la especie cultivada, las condiciones del suelo, el clima y la localización geográfica, entre otros factores. Aunque se requiere un uso eficiente y equilibrado, los fertilizantes se han demostrado imprescindibles para las mejoras de los rendimientos agrícolas y, para ilustrar su importancia, parece oportuno hacer mención a las palabras de Borlaug y Dowsell en 1994 haciendo énfasis en la contribución de la nutrición vegetal al espectacular aumento de la productividad agrícola conseguido el siglo pasado y a la importancia de ésta en el futuro: *“Hasta el 50 % del incremento en el rendimiento de los cultivos en todo el mundo a lo largo de este siglo se debe a la adopción de los fertilizantes químicos. Creemos sin duda que el factor limitante más importante del rendimiento de los cultivos en los países en desarrollo, y especialmente entre los agricultores con pocos recursos, es la infertilidad del suelo”*.

Los nutrientes que contienen los fertilizantes se suelen clasificar en macronutrientes (primarios y secundarios) y micronutrientes (Loneragan, 1997). Los macronutrientes primarios son el nitrógeno (N), el fósforo (P) y el potasio (K) y las plantas los requieren relativamente en grandes cantidades. Según tengan uno o varios de los nutrientes primarios se distingue entre fertilizantes simples o compuestos. Los secundarios son el calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). Los macronutrientes están asociados biológicamente a procesos fotosintéticos, al equilibrio osmótico y a diversos procesos celulares y rutas metabólicas formando parte de compuestos de bajo peso molecular (aminoácidos, nucleótidos, metabolitos secundarios, etc.) o de macromoléculas (enzimas y otras proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Hay otros tres macronutrientes, el carbono (C), el oxígeno (O) y el hidrógeno (H), que son obtenidos por la planta a partir del aire y del agua y son necesarios para la producción y almacenamiento de energía y para el crecimiento celular. El grupo de los micronutrientes es más numeroso, pero los principales son el cloro (Cl), el hierro (Fe), el zinc (Zn), el cobre (Cu), el manganeso (Mn), el níquel (Ni), el boro (B) y el molibdeno (Mo). Estos también están relacionados con procesos como la fotosíntesis, con el equilibrio iónico o la síntesis de ácidos nucleicos y actúan como

## Introducción

cofactores enzimáticos en numerosas reacciones metabólicas. Cabe destacar que la distinción entre macronutrientes primarios y secundarios y micronutrientes hace referencia a las cantidades que consumen los cultivos y no a que unos sean más importantes que otros, ya que la falta de cualquier nutriente penaliza el rendimiento (Park, 2001). Todos los nutrientes son importantes y la planta debe tomarlos en un adecuado equilibrio.

Finalmente hay que considerar los aditivos de los fertilizantes, también llamados bioestimulantes, que son sustancias con funciones reguladoras y nutricionales que se utilizan como complemento para la fertilización. Los aditivos más comunes consisten en mezclas de aminoácidos (con importante valor nutricional) y derivados del humus, como los ácidos húmicos y fúlvicos (con funciones hormonales tipo auxina en el primer caso y de quelación de hierro en el segundo).

### 1.3. Bioestimulantes de fertilizantes

Las empresas comercializadoras de fertilizantes modifican continuamente las formulaciones de los mismos con el objetivo de, además de aportar los requerimientos nutricionales básicos de las plantas, incluir distintos bioestimulantes que parecen mejorar el crecimiento y la tolerancia a estrés abiótico de los cultivos. Los bioestimulantes son sustancias que, suministradas a concentraciones relativamente bajas, intervienen en el metabolismo vegetal estimulando diferentes procesos fisiológicos y del desarrollo de las plantas, pudiendo actuar en sinergia con macro y micronutrientes. Dependiendo del tipo de bioestimulante y del objetivo de su uso, pueden aplicarse al suelo (de forma directa o a través del riego), combinarse con el fertilizante (se pueden añadir tanto a fertilizantes orgánicos como inorgánicos) o aplicarse directamente sobre la planta a nivel foliar. Algunos de sus efectos consisten en promover la absorción de agua y nutrientes, la tolerancia a estrés y la eficacia de distintos procesos metabólicos, de forma que se ve mejorada la germinación de semillas, el crecimiento vegetativo, el desarrollo reproductivo o la maduración de los frutos, obteniendo en definitiva un mayor rendimiento y calidad de las cosechas. Los bioestimulantes podrían interaccionar con los sistemas de señalización de las plantas o estimular determinados microorganismos beneficiosos, optimizando así el uso de los recursos desviados a los procesos de respuesta a estrés que no resultan productivos para la planta (Brown y Saa, 2015). Estos productos están adquiriendo una importancia creciente en la agricultura, de hecho, se ha estimado que el mercado global de bioestimulantes superará los 2000 millones de dólares en el año 2018 con un crecimiento anual del 12,5 % entre los años 2013 y 2018 (Calvo *et al.*, 2014). No obstante, su utilización se ha establecido de forma empírica en muchos casos, ya que en general se tienen pocos conocimientos sobre los mecanismos de acción concretos de dichos productos, por lo que existe una evidente necesidad de entender mejor cómo funcionan y así poder mejorar su eficacia y los procesos para su obtención. Ésta es, sin embargo, una tarea verdaderamente difícil, ya que los distintos bioestimulantes empleados en la agricultura derivan de fuentes diversas y contienen complejas mezclas de compuestos orgánicos e inorgánicos, muchos de los cuales están poco caracterizados.

Entre los bioestimulantes empleados habitualmente destacan los productos que contienen mezclas de aminoácidos obtenidas mediante la hidrólisis de proteínas tanto de origen animal como vegetal. En ocasiones, las mezclas de aminoácidos también contienen algunos macro- y

micronutrientes (Ca, Mg, B, Fe, Cu, Mn, Zn) u otros componentes de origen no proteico. Los metales como el Fe, Cu, Mg, Mn o Zn pueden ser añadidos en forma de complejos con agentes quelantes como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o el EDDHA (ácido etilendiamino-N,N'-bis(2-hidroxifenilacetico)) para solventar posibles carencias de los cultivos. Otra categoría de productos bioestimulantes de origen proteico son los aminoácidos y derivados añadidos de forma individual, como por ejemplo el glutamato, la glutamina, la prolina o la glicina betaína. El aporte de aminoácidos (ya sea en mezclas de hidrolizados o de manera individual), aparte de mejorar el estado nutricional de las plantas y estimular su crecimiento, puede aumentar su tolerancia a estrés (Calvo *et al.*, 2014). Por ejemplo, las plantas sintetizan y acumulan compuestos osmoprotectores como la prolina o la glicina betaína en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico (Szabados y Savouré, 2010; Giri, 2011). Pese a que existe cierta controversia sobre sus auténticas funciones en las plantas, se ha postulado que la aplicación exógena de estos osmolitos podría aumentar el crecimiento y rendimiento final de los cultivos bajo diferentes tipos de estrés ambiental en muchas especies, aunque existen excepciones (Ashraf y Foolad, 2007). Otro compuesto asociado a la tolerancia a estrés abiótico es el glutatión, un tripéptido formado por cisteína, ácido glutámico y glicina, que posee un importante papel en la protección de las células frente a especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y cuya formación depende, entre otros factores, de la disponibilidad de glicina y sobre todo de la de cisteína (Noctor *et al.*, 1997, 2002). Asimismo, se ha descrito en numerosas ocasiones la capacidad antioxidante de diferentes péptidos procedentes de hidrolizados de proteínas de origen animal y vegetal (Bishov y Henick, 1972; Amarowicz y Shahidi, 1997; Jao y Ko, 2002; Peña-Ramos y Xiong, 2002) y de determinados aminoácidos libres. Se atribuye generalmente propiedades antioxidantes a algunos aminoácidos como Tyr, Met, Cys, His, Lys, Pro, Trp y Phe, a pesar de sus efectos prooxidantes en determinados casos (Marcuse, 1960, 1962; Karel *et al.*, 1966; Yamaguchi, 1971; Smirnoff y Cumbes, 1989). La actividad antioxidante de los péptidos procedentes de los hidrolizados parece depender de su capacidad para donar átomos de hidrógeno (reduciendo al aceptor), estabilizar o eliminar radicales libres y/o quelar iones metálicos prooxidantes como los del hierro o el cobre (Chen *et al.*, 1998; Carrasco-Castilla *et al.*, 2012). Tanto el grupo imidazol de los residuos de histidina como determinados aminoácidos ácidos y básicos podrían jugar un papel importante en la quelación de hierro y cobre (Sarkar, 1987; Saiga *et al.*, 2003). En microorganismos hay ejemplos de mejora en la tolerancia a estreses mediada por aminoácidos. Uno de ellos consiste en que la metionina incrementa la tolerancia a altas temperaturas en bacterias debido a que dicho estrés inhibe preferentemente la enzima homoserina succinil-transferasa, en el primer paso de la ruta biosintética de metionina (Neidhardt *et al.*, 1990). Por otra parte, en levadura se ha demostrado que la metionina aumenta la tolerancia a la salinidad a través de un complejo mecanismo basado en que este aminoácido inhibe los primeros pasos de la ruta de asimilación del sulfato, que a su vez está inhibida más adelante por sodio provocando la acumulación de un intermediario tóxico (Murguía *et al.*, 1995). También en este organismo se ha probado que distintos nutrientes, sobre todo fuentes de carbono y nitrógeno, tienen efecto sobre la tolerancia a estrés (Dawes, 2004). Por todo lo comentado sería interesante indagar si la presencia de mezclas de aminoácidos de procedencia exógena mejora la respuesta a estrés y, en caso afirmativo, en si ello tiene que ver directamente con la acumulación de determinados aminoácidos o con una mayor síntesis de compuestos derivados. Además de aminoácidos, algunos hidrolizados de

## Introducción

proteínas también pueden contener, dependiendo de su origen, vitaminas, enzimas o reguladores (activadores o inhibidores) de actividades enzimáticas, grasas, carbohidratos, fitohormonas y/o, como se ha comentado más arriba, macro- y micronutrientes.

Asimismo, distintos fertilizantes comerciales incluyen como bioestimulantes fracciones de las sustancias húmicas, que son los principales componentes de la materia orgánica del suelo (Nardi *et al.*, 2002). Numerosos estudios han mostrado que las sustancias húmicas tienen efectos positivos sobre el crecimiento y el rendimiento, a nivel cuantitativo y cualitativo, de distintos cultivos de importancia agronómica debido, entre otras cosas, a que mejoran la estructura del suelo y su fertilidad y promueven la absorción de nutrientes y el desarrollo de la arquitectura radicular (Trevisan *et al.*, 2010; Calvo *et al.*, 2014). Estas sustancias no solo tienen efectos positivos sobre el crecimiento de raíces y parte aérea de las plantas sino que también parecen estimular la germinación de varias especies de cultivos (Piccolo *et al.*, 1993) y mejorar la tolerancia a estrés abiótico (Calvo *et al.*, 2014). No obstante, los mecanismos bioquímicos y moleculares subyacentes a dichos fenómenos se desconocen en su mayor parte ya que la gran variedad de reacciones químicas y biológicas que dan lugar a las sustancias húmicas a partir de la descomposición de materia vegetal y microbiana (Knicker *et al.*, 1995; Morales *et al.*, 2012; Ziechmann, 1994) hacen de ellas una mezcla de moléculas complejas y con diferentes propiedades. Por lo tanto, es muy difícil definir su composición (Hayes, 1997). Desde un punto de vista químico, las sustancias húmicas de los suelos son agregados moleculares compuestos por azúcares, ácidos grasos, polipéptidos, cadenas alifáticas y anillos aromáticos (Simpson *et al.*, 2002). Éstas se pueden clasificar en tres fracciones principales (humina, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos), dependiendo de su diferente solubilidad en función del pH (Stevenson, 1994). Mientras que la humina no se puede solubilizar, los principales componentes de las sustancias húmicas, los ácidos húmicos y fúlvicos, se extraen del suelo y de otras fases sólidas usando una base fuerte (NaOH o KOH). Los ácidos fúlvicos también son solubles a pH bajo, mientras que los húmicos no lo son. Las propiedades y estructura concretas de una sustancia húmica determinada dependen de la procedencia de la muestra y de las condiciones específicas de extracción, sin embargo, suelen ser en promedio considerablemente similares. Los ácidos húmicos acumulan mayoritariamente compuestos de elevado peso molecular y baja polaridad (parafinas, olefinas, terpenos), estructuras alifáticas, compuestos con azufre, hidrocarburos aromáticos policíclicos, furanos y derivados de estructuras aromáticas, siendo probablemente más ricos en polisacáridos y anillos aromáticos condensados que los ácidos fúlvicos (Schnitzer y Schulten, 1998; Baigorri *et al.*, 2009). Estos últimos se caracterizan por contener en general moléculas polares de menor peso molecular pero con mayor número de grupos funcionales (con grupos carboxílicos, anillos aromáticos más simples como furfurales y fenoles y estructuras derivadas de azúcares y aminoácidos), siendo más ricos en oxígeno y pobres en carbono que los ácidos húmicos (Baigorri *et al.*, 2009; Weng *et al.*, 2006). Esta composición, en particular los grupos hidroxilo fenólico y carboxílico, otorga a los ácidos fúlvicos propiedades complejantes que les permiten unir metales como el hierro o el cobre (Schnitzer y Ghosh, 1982; Esteves da Silva *et al.*, 1998). De hecho, se atribuye a las sustancias húmicas la capacidad de mejorar la disponibilidad de micronutrientes a partir de hidróxidos poco solubles (Stevenson, 1991) y, en concreto, de mejorar la adquisición de Fe (Pinton *et al.*, 1999b; Chen *et al.*, 2004a). La formación y acumulación de complejos con metales también puede contribuir a reducir la toxicidad de, por ejemplo, el aluminio y el cromo (Tan *et al.*, 1986; Elkins *et al.*, 2002;

Ali *et al.*, 2015), y a su uso para la remediación de la contaminación con arsénico y metales pesados (Wang y Mulligan, 2009). Además de mejorar la disponibilidad de micronutrientes, se ha observado que los ácidos húmicos y fúlvicos potencian la absorción de macronutrientes como N, P, K, S, Ca y Mg, lo que parece ser un factor principal en su efecto positivo sobre el metabolismo de las plantas (Clapp *et al.*, 2001; Nardi *et al.*, 2002; Pinton *et al.*, 2007; Calvo *et al.*, 2014). Otra propiedad importante de las sustancias húmicas consiste en que tienen actividad hormonal, especialmente de tipo auxina (Trevisan *et al.*, 2010). En maíz, por ejemplo, se ha observado que tanto los ácidos húmicos como la auxina ácido indolacético pueden estimular el crecimiento radicular induciendo la proliferación de raíces laterales a la vez que activan las H<sup>+</sup>-ATPasas de las membranas plasmática y vacuolar y la H<sup>+</sup>-pirofosfatasa vacuolar (Zandonadi *et al.*, 2007). De hecho, a lo largo de los últimos años se ha demostrado que uno de los efectos principales a través de los cuales los ácidos húmicos favorecen el crecimiento de las plantas consiste en la estimulación de la formación de pelos radiculares (Schmidt *et al.*, 2005) y el desarrollo de raíces laterales (Canellas *et al.*, 2002, 2008; Zandonadi *et al.*, 2007). Asimismo, se ha probado que el incremento en la absorción de nitrato en maíz en presencia de sustancias húmicas depende, al menos parcialmente, de la activación transcripcional del gen *Mha2*, que codifica una de las principales H<sup>+</sup>-ATPasas de esta especie y que tendría como consecuencia la generación de un gradiente electroquímico más favorable para la toma de nitrato (Pinton *et al.*, 1999a; Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004). *Mha2* también ve inducida su transcripción en respuesta a auxinas (Frias *et al.*, 1996). Todo ello, unido a la demostrada relación de la actividad H<sup>+</sup>-ATPasa con la toma de nutrientes y la velocidad de crecimiento celular (Serrano *et al.*, 1986; Portillo y Serrano, 1989), sugiere una probable conexión entre la actividad tipo auxina de las sustancias húmicas, especialmente los ácidos húmicos, el crecimiento radicular y la toma de nutrientes. Por lo tanto, dadas las capacidades de las sustancias húmicas para quelar iones y estimular el crecimiento radicular, no es sorprendente que uno de los beneficios más citados de estas sustancias sea un incremento en la toma de nutrientes por parte de las plantas (Calvo *et al.*, 2014). No obstante, aunque posiblemente la actividad tipo auxina de las sustancias húmicas sea el principal factor biológico desencadenante de sus efectos positivos, todavía no están completamente claros los mecanismos a través de los cuales éstas interactúan con las raíces y ejercen su influencia sobre la fisiología y crecimiento de las plantas. Según la literatura disponible, las sustancias húmicas de bajo peso molecular, presentes principalmente en los ácidos fúlvicos, son capaces de atravesar la membrana plasmática de las células de las plantas superiores y una parte ellas puede ser transferida a la parte aérea (Nardi *et al.*, 2002; 2009; Calvo *et al.*, 2014). Al ser capaces de alcanzar el simplasto, se ha sugerido que los ácidos fúlvicos podrían influir directamente sobre el metabolismo vegetal (Nardi *et al.*, 2002). Por otro lado, las sustancias húmicas de alto peso molecular (sobre todo ácidos húmicos) forman agregados supramoleculares en solución e interactúan mayoritariamente con la pared celular de las raíces (Nardi *et al.*, 2002). Se ha propuesto que ácidos orgánicos secretados por las raíces favorecen la liberación de moléculas con capacidad regulatoria presentes en los ácidos húmicos de la rizosfera (Piccolo *et al.*, 1996; Quaggiotti *et al.*, 2004; Zandonadi *et al.*, 2007; Canellas *et al.*, 2008). En cualquier caso, hasta ahora el estudio de los mecanismos de acción de las sustancias húmicas se ha visto ralentizado debido su composición heterogénea y compleja y a la dificultad de una caracterización precisa de las mismas, por lo que se requiere una mayor investigación para dilucidar completamente la manera en que estas sustancias

## Introducción

interaccionan con las células de las raíces y tienen influencia sobre la fisiología y crecimiento de las plantas.

Por otro lado, cabe mencionar que la utilización de extractos de distintas especies de algas como bioestimulantes para cultivos vegetales se ha visto aumentada considerablemente en los últimos años debido a su demostrado efecto positivo sobre el crecimiento y tolerancia a estrés biótico y abiótico de las plantas. Estos extractos contienen una variada mezcla de componentes – macro- y micronutrientes minerales, polisacáridos y esteroides específicos, aminoácidos y derivados como las betaínas, vitaminas, polifenoles, hormonas vegetales (con actividad de auxinas, citoquininas o ácido abscísico), junto con otros compuestos químicos todavía no caracterizados – que posiblemente actúen de forma sinérgica estimulando distintas fases del desarrollo de los cultivos, aumentando su resistencia a estrés y mejorando su rendimiento y calidad (Khan *et al.*, 2009; Calvo *et al.*, 2014). Además, los extractos de algas estimulan la producción endógena de osmolitos, enzimas y compuestos antioxidantes y fitohormonas (Khan *et al.*, 2009; Calvo *et al.*, 2014), sin embargo, de nuevo en este caso, faltan datos científicos sobre el modo de acción de los extractos de algas y los diversos elementos que los componen.

Otro compuesto, el fosfito, ha sido comercializado como fungicida, como bioestimulante e incluso como fertilizante (Leymonie, 2007), pese a que estos dos últimos usos son controvertidos. Los productos basados en fosfito se han reconocido como excelentes para controlar enfermedades de plantas causadas por las especies de los pseudohongos Oomycetes, especialmente *Phytophthora* sp (Thao y Yamakawa, 2009), al parecer actuando directamente sobre el patógeno e indirectamente estimulando las defensas de la planta (Smillie *et al.*, 1989; Jackson *et al.*, 2000). Además, algunos autores han sugerido que el fosfito podría reemplazar al fosfato (Pi) como fuente de P en cítricos y aguacate (Lovatt, 1900a,b) y han destacado el uso potencial del fosfito como fertilizante demostrando sus efectos positivos sobre el rendimiento y calidad de numerosas cosechas (Lovatt, 1900a,b; 1999; Albrigo, 1999; Rickard, 2000). No obstante no existen evidencias de que el fosfito pueda ser utilizado directamente por las plantas como fuente nutricional de P. Las bacterias presentes en los suelos pueden oxidar el fosfito y dar Pi (White y Metcalf, 2007), por lo que los efectos nutricionales del fosfito son probablemente consecuencia de esta oxidación, aunque el proceso es lento y tiene poca relevancia en la práctica (McDonald *et al.*, 2001a). En este mismo sentido, otras publicaciones afirman que, pese a que el fosfito puede ser absorbido fácilmente por raíces y hojas, no tiene utilidad alguna como fertilizante de P ya que las plantas carecen de la capacidad de asimilarlo (Föster *et al.*, 1998; Schroetter *et al.*, 2006). Es más, tratamientos con fosfito han resultado tener efectos negativos sobre el crecimiento y el metabolismo de plantas deficientes en Pi, pero no en fertilizadas con éste, al provocar la inhibición de la respuesta a deficiencia de Pi (Carswell *et al.*, 1996; Ticconi *et al.*, 2001). El fosfito agrava los efectos deletéreos de la deficiencia de Pi al hacer percibir a las plantas que tal deficiencia no existe, cuando realmente el contenido en Pi es extremadamente bajo (McDonald *et al.*, 2001a). De hecho, Puga y colaboradores (2014) demostraron recientemente que el fosfito reprime la respuesta a deficiencia de Pi al actuar como análogo no metabolizable de éste e inducir la interacción entre SPX1, una proteína nuclear, y PHR1, un factor de transcripción involucrado en la respuesta a deficiencia de Pi (Rubio *et al.*, 2001). En definitiva, en plantas crecidas en ambientes donde el fosfito no pueda ser convertido a Pi mediante actividad

microbiana y éstas no puedan ser infectadas por Oomycetes, el tratamiento con fosfito no ha mostrado tener efectos estimulantes ni nutricionales sobre el crecimiento de los cultivos, tampoco en combinación con Pi (Thao y Yamakawa, 2009). De manera que los efectos beneficiosos de los tratamientos con fosfito a nivel de campo son, probablemente, resultado de sus efectos antifúngicos (McDonald *et al.*, 2001a).

Lógicamente, si los conocimientos actuales sobre los mecanismos de acción de los bioestimulantes a nivel bioquímico y fisiológico son muy limitados, también son escasos los datos referidos a sus efectos protectores frente a condiciones de estrés abiótico y a las posibles sinergias con macro- y micronutrientes, por lo que resulta evidente la importancia de investigar el funcionamiento de los bioestimulantes empleados por la industria de fertilizantes, en particular, sobre la tolerancia a estrés ambiental. Estas investigaciones pueden dar lugar a una aplicación práctica, impulsando el desarrollo de nuevos productos y de formulaciones optimizadas de fertilizantes comerciales que, además de aportar los nutrientes apropiados a los cultivos, aumenten su tolerancia a condiciones de estrés abiótico y, en definitiva, proporcionen un incremento adicional en la productividad agrícola.

## **2. El estrés abiótico**

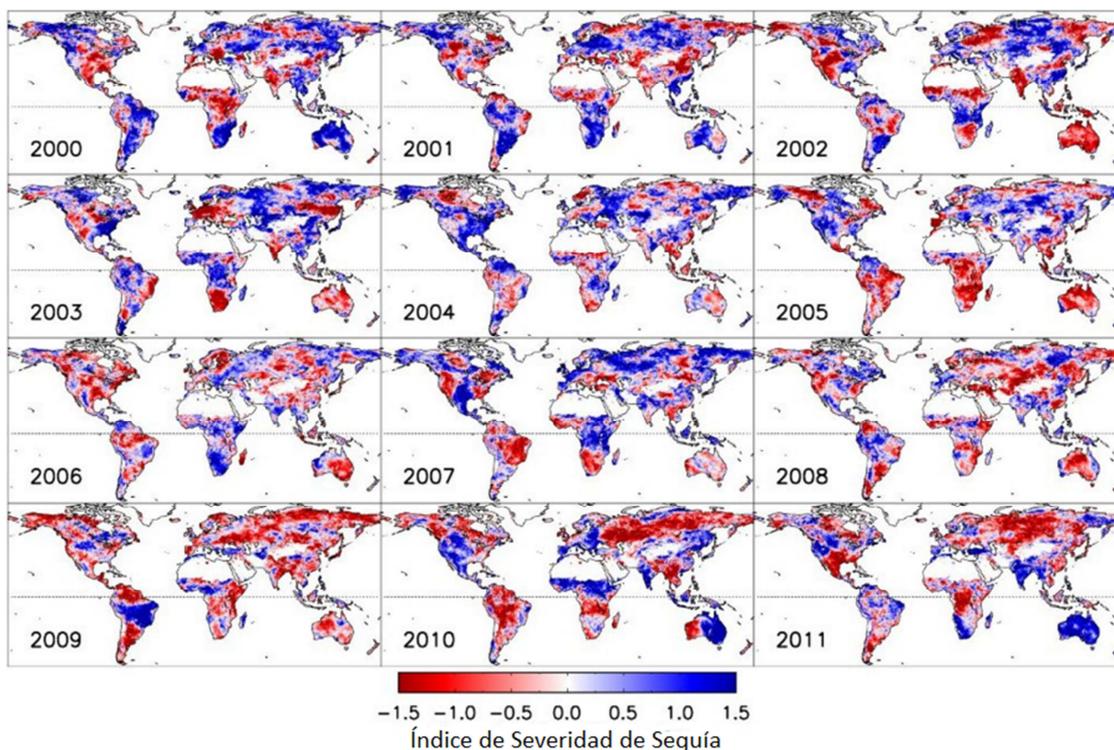
### **2.1. El problema del estrés abiótico y el cambio climático**

En el rendimiento de las cosechas influyen factores genéticos, como el cultivar escogido, y factores ambientales, tales como la calidad del suelo, la fecha y densidad de la siembra, el fotoperiodo, la temperatura, la disponibilidad de agua, la fertilización, la presencia de malas hierbas o el ataque de plagas y enfermedades. En relación con los factores ambientales, el principal problema que merma el rendimiento de los cultivos a nivel mundial se debe a distintas condiciones de estrés abiótico, especialmente a la sequía, a la elevada salinidad del suelo y a las temperaturas extremas, aunque también a los suelos excesivamente ácidos o alcalinos y a la toxicidad química (Boyer, 1982; Owens, 2001; Munns, 2002; Wang *et al.*, 2003; Vinocur y Altman, 2005; Cuartero *et al.*, 2006; Munns y Tester, 2008). El estrés oxidativo es un estrés celular secundario a otros estreses ambientales y no suele darse en el ambiente de los cultivos salvo en grandes ciudades con mucho ozono ambiental. Es posible que la disminución de la productividad agrícola causada por estrés abiótico se agrave en las próximas décadas, sobre todo si se tienen en cuenta las previsiones de un cambio climático en la dirección de temperaturas más altas y menor pluviometría. Por tanto, poner solución a los problemas relacionados con el estrés abiótico es prioritario para la agricultura.

Históricamente, la sequía y la salinidad han causado grandes estragos en la agricultura y por ende en las sociedades a las que ésta alimenta. Por ejemplo, se ha postulado que la sequía hizo caer al Imperio acadio en la zona septentrional de Mesopotamia 2200 años antes de Cristo (Kerr, 1998) y que la progresiva salinización de las tierras de cultivo contribuyó a la quiebra de la civilización sumeria en el sur de Mesopotamia unos 1700 años a.C. (Jacobsen y Adams, 1958). Hoy en día, ambos fenómenos siguen siendo factores críticos en la producción de las cosechas. La sequía afecta con frecuencia a extensas regiones del mundo en periodos que pueden durar varios años (Figura I.3). Durante las épocas de sequía se producen mermas

## Introducción

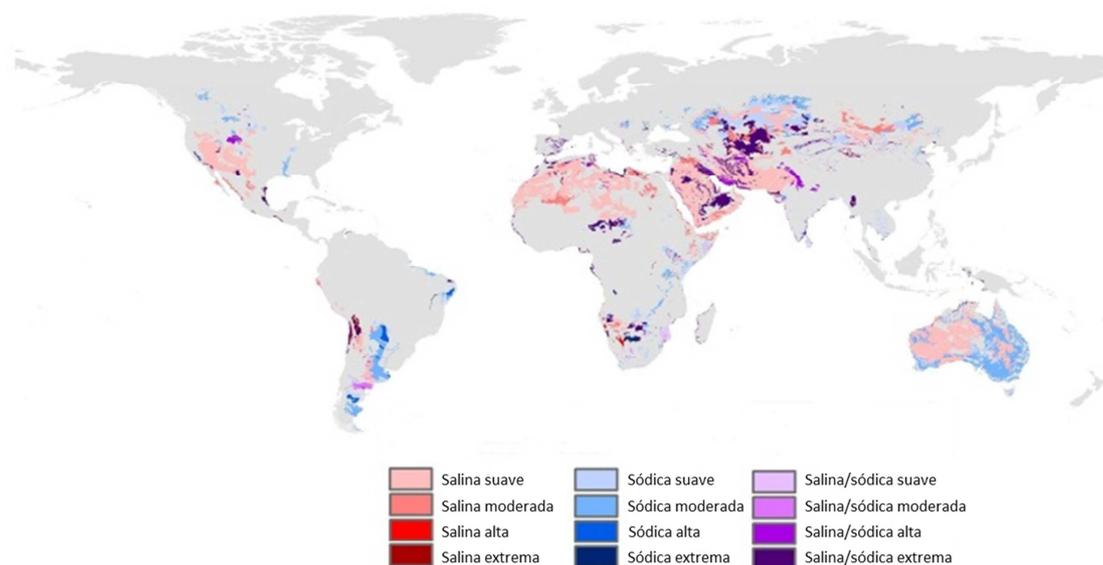
drásticas o incluso la completa pérdida de la producción agrícola, lo que puede conllevar, si el periodo de sequía es prolongado, el abandono de las tierras de cultivo. Éste es, además, uno de los motivos que impiden la extensión de los cultivos a superficies no utilizadas.



**Figura I.3. Índice de Severidad de Sequía (DSI, Drought Severity Index) anual global entre los años 2000-2011 según el registro MODIS (Moderate resolution Imaging Spectroradiometer).** El DSI está basado en datos de observaciones vía satélite de la agencia espacial estadounidense NASA (National Aeronautics and Space Administration) y se emplea para detectar y monitorizar la sequía en la superficie terrestre. El índice varía teóricamente entre valores negativos ilimitados hasta valores positivos ilimitados para desviaciones climáticas de seco a húmedo, respectivamente, en relación a las condiciones predominantes. Fuente: <http://www.ntsg.umd.edu/project/dsi>, consultada el 20-11-2015.

Otro grave inconveniente es el de la salinidad (Figura I.4). Se distingue según su origen entre salinidad primaria y secundaria. La primera se debe a causas naturales como la meteorización de las rocas o la deposición de sales oceánicas arrastradas por el viento y el agua y la segunda se debe al efecto de la actividad humana (Owens, 2001). Las tierras cultivadas bajo irrigación en zonas áridas y semi-áridas son las más fértiles y productivas del planeta y, aunque suponen tan solo el 15 % del total del área cultivada, en ellas se produce al menos un tercio de los alimentos mundiales (Munns y Tester, 2008). Estos territorios sufren una progresiva salinización (secundaria) debido a la acumulación de las sales disueltas en el agua de riego, lo que disminuye sensiblemente su productividad. A escala mundial las estimaciones indican que, aproximadamente, un 20 % de las tierras bajo riego ya se encuentran afectadas por salinidad secundaria y el área damnificada aumenta constantemente, lo que tiene como consecuencia el que cada año se pierdan unos 10 millones de hectáreas cultivables y se obtengan peores rendimientos agrícolas (Owens, 2001; Munns y Tester, 2008). Entre las regiones más productivas se encuentran California, gran parte del sudeste asiático y Australia y toda la cuenca mediterránea. En las tierras de cultivo cercanas a la costa del Levante español, el problema de la salinización se ve agravado por la infiltración de agua de mar, ocasionada por la

sobreexplotación de los acuíferos litorales. Valorando conjuntamente los fenómenos de la sequía y la salinización de los suelos, se estima que si continúa la tendencia actual, se podría perder hasta un 50 % de la tierra cultivable hacia el año 2050 (Ashraf, 1994), poniendo en riesgo el incremento en la producción agrícola que será necesario para alimentar a la población humana.



**Figura I.4. Regiones afectadas por salinidad a nivel mundial.** Leyenda: Tipo y nivel de contaminación salina. Fuente: <http://www.clubgreen.nl>, consultada el 20-11-15.

Por otro lado, las temperaturas extremas también producen graves daños sobre los cultivos y acrecientan los de otros estreses como la sequía y la salinidad. Por poner un ejemplo, hace ya más de 20 años se estimó que el estrés por altas temperaturas empeoraba la calidad del grano y disminuía el rendimiento final en un 40 % del trigo cultivado bajo riego en todo el mundo (Fischer y Byerlee, 1991).

El problema de la disminución de la productividad agrícola debida a estreses relacionados con la sequía, la salinidad o las altas temperaturas se verá considerablemente agravado en las próximas décadas si se confirman las predicciones de cambio climático. Desde hace años, están siendo publicados diversos informes que alertan de las consecuencias globales que tendrá el aumento de la temperatura media de la Tierra causado, en parte al menos, por la generación de gases de efecto invernadero asociada a las actividades humanas (IPCC, 2014). Se esperan incrementos en las temperaturas máximas y mínimas en la mayoría de regiones terrestres, así como cambios en los patrones meteorológicos estacionales y una mayor frecuencia, intensidad y duración de fenómenos climatológicos extremos, tales como huracanes, lluvias torrenciales, periodos de sequía, “olas de calor”, etc. Las acciones de mitigación del cambio climático, que consisten en reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y promover su secuestro, deberán combinarse con la adaptación de la agricultura a las nuevas condiciones ambientales, por lo que, a largo plazo, será necesario un cambio en las especies cultivadas en muchas zonas del planeta. Posiblemente, en las zonas ahora más frías, como amplias regiones de Canadá o Rusia, puedan cultivarse tierras no utilizadas en la actualidad. En otros lugares, los efectos negativos de las elevadas temperaturas o la escasez de

precipitaciones podrían compensarse parcialmente por las mayores tasas fotosintéticas como consecuencia de niveles más elevados de CO<sub>2</sub>. Además, temperaturas moderadas en invierno permitirían una mayor productividad agrícola en esta estación. No obstante, es probable que en latitudes medias (regiones templadas y subtropicales) se produzca un incremento en la desecación continental durante el verano y que los periodos de sequía sean más largos e intensos, lo que llevaría a disponer de menos agua para los terrenos de regadío y una salinización acelerada de estos. Por consiguiente, extensas zonas del planeta experimentarían un progreso rápido de la desertificación y la pérdida de terrenos de cultivo. Desde una perspectiva local, la situación geográfica y las características socioeconómicas de España hacen que sea un país especialmente vulnerable al cambio climático, aunque sus efectos sobre la producción agrícola variarán dependiendo de la región. Las zonas más afectadas serán las del sur y sureste, donde el estrés térmico y la necesidad de riego serán más elevados (MMA, 2005).

### 2.2. Estrategias biotecnológicas para mejorar la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés abiótico

Los inconvenientes de la sequía y la salinización de los terrenos agrícolas pueden solventarse temporalmente mediante obras de ingeniería, como trasvases de agua a gran escala, plantas desalinizadoras o el drenaje del suelo, sin embargo ésta no es una solución sostenible en el tiempo debido a los costes económicos y medioambientales, además de otros problemas políticos y sociales que acarrearían proyectos de este tipo. Por el contrario, potenciar la tolerancia de los cultivos frente a los principales estreses abióticos que les afectan, fundamentalmente la sequía, la salinidad del suelo y las altas temperaturas, puede dar una solución satisfactoria y mantener su efectividad a largo plazo. Plantas más tolerantes a estrés aprovecharían los recursos hídricos con una mayor eficiencia, algo especialmente importante en regiones áridas y semiáridas, permitiendo a los agricultores disminuir el volumen de agua empleada en el riego, continuar utilizando las tierras de cultivo actuales, incluso estando afectadas por la salinización, y recuperar terrenos perdidos a causa de la desertificación. Hasta ahora, la mejora de la tolerancia a estrés abiótico se ha basado principalmente en la mejora genética de las variedades cultivadas, dejando en un segundo plano la mejora del estado nutricional de las plantas. En cualquier caso, es razonable considerar que el mayor beneficio para la agricultura se conseguirá combinando con eficiencia y de una forma sostenible ambas estrategias.

#### *Mejora genética tradicional y mejora mediante ingeniería genética*

La mejora genética tradicional se sirve de los cruzamientos y la selección para introducir o modificar selectivamente en una misma variedad uno o varios caracteres de interés y ha tenido como uno de sus principales propósitos la obtención de variedades tolerantes a estrés. Sin embargo, los caracteres de tolerancia a estrés abiótico son difíciles de controlar ya que poseen una gran complejidad genética y fisiológica y suelen depender de un elevado número de genes, los cuales tienen en su mayoría una influencia pequeña en comparación con la del entorno (Flowers, 2004; Cuartero *et al.*, 2006). Otra limitación consiste en que para gran parte de los cultivos con interés agronómico no existen variedades silvestres relacionadas que muestren una tolerancia relevante frente a los estreses más importantes, y que, por tanto,

puedan servir como fuente de variabilidad genética para la transferencia de caracteres de interés a la correspondiente variedad cultivada. La biotecnología ha creado técnicas de mutagénesis y de hibridación artificiales con el objetivo de generar variabilidad de forma más rápida que la natural.

Las limitaciones a la hora de generar variedades más tolerantes a estrés abiótico han estimulado el interés en la obtención de plantas modificadas genéticamente mediante el uso de la ingeniería genética. Esta tecnología proporciona la posibilidad de eliminar la barrera de la especie y transferir genes exógenos a las variedades cultivadas de una forma rápida y controlada. Es probable que el desarrollo de plantas transgénicas tolerantes a estrés abiótico sea una parte importante de la solución a las pérdidas en la productividad agrícola que éste causa. La investigación básica en los campos de la biotecnología, la biología molecular y la bioquímica de plantas resulta esencial para la ampliar los conocimientos científicos sobre los mecanismos de defensa a estrés y la caracterización de los genes involucrados. No obstante, a pesar del potencial que la ingeniería genética ofrece, su aprovechamiento a corto plazo es muy limitado en algunos lugares del mundo, como la Unión Europea, donde existe un importante rechazo social al cultivo de plantas transgénicas por motivos que carecen de fundamentos científicos y que tienen un origen político e ideológico.

#### *Mejora de las condiciones nutricionales*

Lo comentado anteriormente pone de manifiesto la importancia de abordar de forma sistemática el estudio de las condiciones fisiológicas generales de las plantas, y en concreto su disponibilidad de nutrientes, sobre la eficiencia de sus respuestas a estrés. Por ejemplo, bajo condiciones ambientales adversas, las plantas detienen o ralentizan rápidamente el crecimiento vegetativo y reprimen el desarrollo reproductivo, desviando todos sus recursos a la activación de mecanismos de defensa que les permitan sobrevivir (Serrano y Gaxiola, 1994; Zhu, 2001). Parece lógico suponer que esto se evitará si las plantas, además de encontrarse en buenas condiciones nutricionales, disponen de bioestimulantes que les permitan soportar mejor las situaciones de estrés. No obstante, la información es escasa acerca de la influencia de los macronutrientes y los bioestimulantes de los fertilizantes comerciales utilizados en la agricultura sobre los mecanismos de tolerancia a estrés. Este abordaje se ha tenido poco en cuenta debido en gran medida a la concentración de esfuerzos y recursos en torno a la mejora genética. Sin embargo, el estudio del efecto de diferentes bioestimulantes, de sus mecanismos de acción y de la posible sinergia con macro- y micronutrientes puede proporcionar soluciones efectivas a corto y largo plazo que mejoren la productividad de las cosechas.

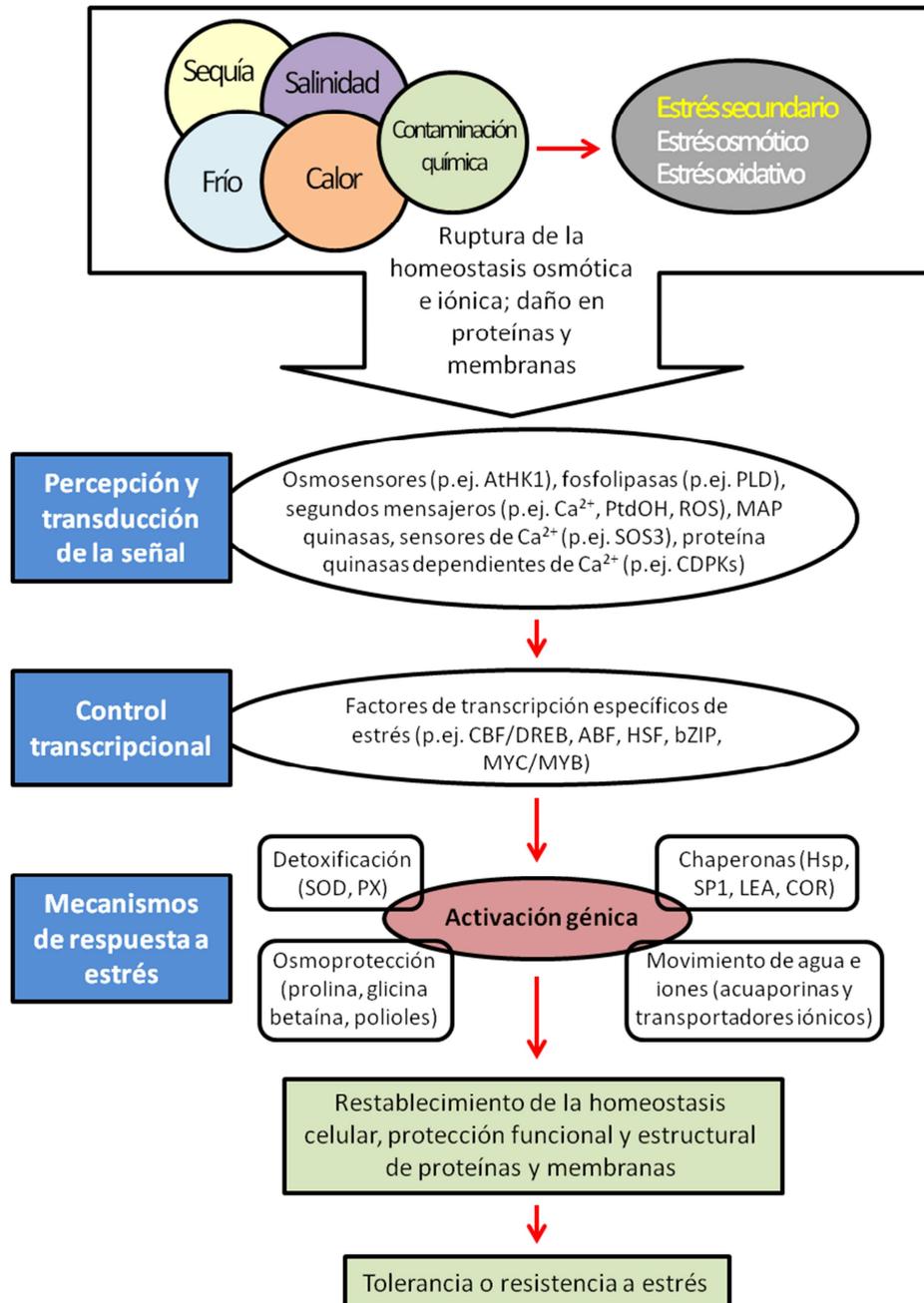
#### 2.3. Efecto de los estreses abióticos en las células vegetales

El estrés abiótico desencadena una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que merman el crecimiento de las plantas y su productividad (Wang *et al.*, 2001). Los efectos de la sequía, la salinidad o las temperaturas extremas sobre la planta están interconectados y, por tanto, los daños provocados en las células suelen ser similares bajo los distintos estreses. Por ejemplo, la sequía y la salinidad producen estrés osmótico a través de la disminución de la actividad química del agua y la pérdida de turgencia de las células inducidas por altas concentraciones de solutos externos. Como consecuencia de la deshidratación de las células, a menudo se ven afectadas negativamente las conformaciones biológicamente activas

## Introducción

de proteínas y membranas (Koyro *et al.*, 2012) y el incremento en la concentración en iones intracelulares normales resulta en la pérdida de la homeostasis iónica (Serrano y Gaxiola, 1994). La presión de turgencia es, además, un factor fundamental para el crecimiento de las células vegetales, el cual se basa en el “aflojamiento” de la pared celular y en el aumento del volumen de la célula como consecuencia de incrementar dicha presión (Taiz y Zeiger, 1998). En el caso de la salinidad, ésta acarrea un problema añadido de toxicidad iónica puesto que los iones del cloro y del sodio tienen efectos deletéreos en el funcionamiento de numerosas enzimas (Serrano *et al.*, 1999). Por otro lado, temperaturas superiores a las óptimas pueden producir la agregación y desnaturalización de proteínas y una mayor fluidez y deterioro en las membranas, lo que conlleva cambios en su permeabilidad (Dawes, 2004). Asimismo, la sequía, la salinidad, las altas temperaturas y la presencia de metales pesados ejercen al menos parte de su efecto generando estrés oxidativo, que tiene como consecuencia la desnaturalización de proteínas y daño en membranas y DNA (Smirnoff, 1998; Mittler, 2002). En consecuencia, diferentes estreses activan a menudo rutas de señalización y respuestas celulares en común (Figura 1.5; Wang *et al.*, 2003).

Las rutas de respuesta a estrés abiótico, que parecen estar conservadas en todas las plantas y que, como se ha comentado, son en buena parte comunes a distintas condiciones de estrés, se basan en la activación de redes moleculares que operan en cascada y que están involucradas en la percepción de la situación estresante, en la transducción de la señal y en el control de la expresión de genes específicos que confieren protección frente a estrés. El conjunto de genes implicados en las mencionadas rutas generales de respuesta a estrés se pueden agrupar en tres categorías principales (Wang *et al.*, 2003): 1) genes involucrados en la percepción del estrés y las cascadas de señalización (osmosensores, fosfolipasas, segundos mensajeros, MAP quinasas, sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  etc.), así como con factores de transcripción (p.ej. factores de choque térmico (HSFs) o las familias CBF/DREB y ABF); 2) genes relacionados directamente con la protección de proteínas y membranas (p.ej. las chaperonas o proteínas de choque térmico y las proteínas LEA) y con la activación de sistemas antioxidantes, tanto químicos (glutatión reducido, vitamina E, carotenoides, compuestos fenólicos como los flavonoides etc.) como enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa etc.); 3) genes responsables de la homeostasis iónica y el balance osmótico celular, que implica la regulación del transporte de agua e iones a la célula, la compartimentación de los iones tóxicos en la vacuola y la síntesis de compuestos osmoprotectores (azúcares solubles, polialcoholes, aminoácidos y derivados, entre otros, que, además de estar asociados a la regulación de la homeostasis iónica y el balance osmótico celular, participan en la protección de la estructura de las macromoléculas y en la inactivación de ROS; Smirnoff, 1998; Szabados y Saviouré, 2010).



**Figura I.5. La complejidad de la respuesta de las plantas al estrés abiótico.** Los estreses primarios, tales como la sequía, salinidad, frío, calor y contaminación química, están a menudo interconectados y causan estreses secundarios, como el estrés osmótico y el oxidativo, y daños en la célula. Las señales iniciales de estrés (p.ej. efectos osmóticos e iónicos o cambios en la temperatura o en la fluidez de las membranas) desencadenan el proceso de señalización y el control transcripcional aguas abajo, los cuales activan los mecanismos de respuesta a estrés para restablecer la homeostasis y proteger y reparar las proteínas y membranas dañadas. El fallo de alguno de los pasos en los procesos de señalización y de regulación génica podría resultar en cambios irreversibles de la homeostasis celular y en la destrucción de membranas y de proteínas funcionales y estructurales, teniendo como consecuencia la muerte celular. Abreviaturas en inglés: ABF, *ABRE binding factor*; AtHK1, *Arabidopsis thaliana histidine kinase-1*; bZIP, *basic leucine zipper transcription factor*; CBF/DREB, *C-repeat-binding factor/dehydration-responsive binding protein*; CDPK, *calcium-dependent protein kinase*; COR, *cold-responsive protein*; Hsp, *heat shock protein*; LEA, *late embryogenesis abundant*; MAP, *mitogen-activated protein*; PLD, *phospholipase D*; PtdOH, *phosphatidic acid*; PX, *peroxidase*; ROS, *reactive oxygen species*; SOD, *superoxide dismutase*; SP1, *stable protein 1*. Adaptado de Wang et al. (2003).

### 3. La levadura como sistema modelo para la investigación en plantas

La comprensión de los fenómenos biológicos que tienen lugar en organismos complejos como las plantas se ve facilitada por su comparación con organismos más simples como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Forsburg, 2001). Este hongo unicelular no patogénico proporciona un sistema modelo ideal para estudiar la biología molecular y celular de los eucariotas ya que, entre otras ventajas, posee un rápido crecimiento (su tasa de replicación durante la fase exponencial es de 1,5 a 2 horas a 30 °C en medio YPD – ver el apartado de Materiales y métodos – y de aproximadamente 2,5 h en medio mínimo sintético; Sherman, 2002), su manipulación es sencilla en el laboratorio y su genoma, relativamente pequeño (12 Mb), está secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996) y ampliamente caracterizado (Peña-Castillo y Hughes, 2007; Botstein y Fink, 2011). Las técnicas de clonaje e ingeniería genética se pueden aplicar fácilmente en *S. cerevisiae*, lo que permite introducir plásmidos que se repliquen en las células o que se integren en su genoma mediante recombinación homóloga. Además, el hecho de que existan cepas tanto haploides como diploides permite estudiar mutaciones de pérdida de función en el primer caso y hacer ensayos de complementación en el segundo (Forsburg, 2001; Sherman, 2002).

La amplia conservación de las rutas metabólicas y mecanismos moleculares ha conllevado la extensión del uso de la levadura como sistema modelo para organismos eucariotas en general y para plantas en particular. Muchos procesos de transporte activo de cationes y nutrientes son comunes en células vegetales y de levadura, cuya bioenergética de la membrana plasmática está basada en la bomba de protones H<sup>+</sup>-ATPasa, que energiza el transporte activo de moléculas (Serrano, 1985). Los mecanismos de defensa frente a los distintos tipos de estrés abiótico están considerablemente conservados entre ambos tipos de célula (Dawes, 2004; Smalwood *et al.*, 1999), de hecho la levadura se ha propuesto como organismo modelo para el estudio de la tolerancia a estrés en plantas (Serrano y Gaxiola, 1994). Como se verá a lo largo de esta tesis, tanto la homeostasis de aminoácidos como la de hierro juegan un papel muy relevante en el mecanismo de acción de determinados bioestimulantes. La respuesta a la presencia de aminoácidos es un proceso controlado fundamentalmente por las rutas TOR (*Target Of Rapamycin*) y GAAC (*General Amino Acid Control*) y ha sido estudiada de forma intensiva en levadura, lo que ha servido para extrapolar y comprender su funcionamiento en otros organismos eucariotas como las plantas y los mamíferos (Wilson y Roach, 2002; Hinnebusch, 2005; Sormani *et al.*, 2007; Lageix *et al.*, 2008; Dalton *et al.*, 2012; Eltschinger y Loewith, 2015). Asimismo, *S. cerevisiae* se considera un modelo apropiado para estudiar el metabolismo del hierro en plantas, dada la conservación de los mecanismos que regulan la homeostasis de este metal (Fox y Guerinot, 1998; De Freitas *et al.*, 2003; Jeong y Guerinot, 2009).

### 4. Homeostasis de aminoácidos en *S. cerevisiae*

El crecimiento (acumulación de masa) y la proliferación (aumento de número) de las células de organismos eucariotas dependen de señales externas como la disponibilidad de nutrientes y la existencia de condiciones de estrés. Los microorganismos como *S. cerevisiae* interactúan directamente con los componentes del medio extracelular, los cuales pueden hacer de señal y

nutriente simultáneamente. Para las plantas y otros organismos multicelulares, la relación con el medio es más compleja, ya que está condicionada por la respuesta celular a su entorno más próximo así como a señales sistémicas, por ejemplo hormonas o factores de crecimiento. En ambos casos, diferentes reguladores intracelulares, muchos de los cuales son quinasas y fosfatasa que participan en rutas conservadas en los organismos eucariotas, intervienen en la transducción de estas señales para activar la respuesta celular a los cambios en el ambiente. De modo que cuando existen condiciones favorables, como la presencia de nutrientes o la ausencia de estrés, las células inducen la síntesis de proteínas y otras macromoléculas estimulando el crecimiento y la proliferación. De forma inversa, uno de los mecanismos más importantes para la adaptación de las células a la falta de nutrientes o a situaciones de estrés consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas. La síntesis proteica es uno de los procesos que mayor cantidad de energía y recursos consume, por lo que las células priorizan su supervivencia frente al crecimiento. Así, éstas tratan de regenerar el conjunto de aminoácidos intracelulares, reorganizar los mRNAs disponibles y evitar la acumulación de proteínas mal plegadas, al mismo tiempo que adaptan la síntesis de proteínas a los requerimientos celulares en condiciones adversas.

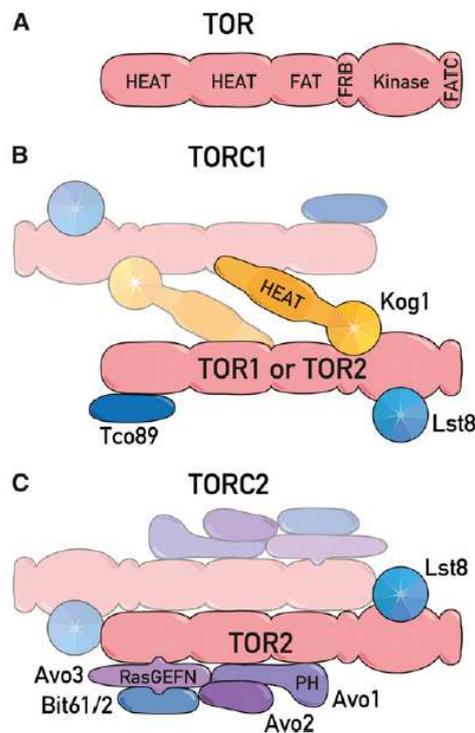
Los aminoácidos son moléculas orgánicas de gran importancia biológica puesto que, entre otras muchas cosas, constituyen las unidades estructurales de las proteínas. Los aminoácidos se caracterizan por contener un grupo amino (-NH<sub>2</sub>), un grupo carboxílico (-COOH) y una cadena lateral específica. A pesar de que se conoce la existencia de alrededor de 500 tipos (Wagner y Musso, 1983), tan solo 20 aminoácidos son unidos en los ribosomas para formar las cadenas polipeptídicas de las proteínas. La adquisición y la conservación de estas moléculas resultan esenciales para un adecuado funcionamiento de las células y, en consecuencia, los eucariotas han desarrollado complejos mecanismos para regular su homeostasis, siendo los más importantes la ruta TOR y la ruta GAAC.

#### 4.1. La ruta TOR

Tor es una serina/treonina (Ser/Thr) quinasa funcional y estructuralmente conservada en los organismos eucariotas (Shertz *et al.*, 2010) y que regula diferentes aspectos relacionados con el crecimiento celular en respuesta a multitud de señales intra- y extracelulares (Loewith y Hall, 2011; Eltschinger y Loewith, 2015). Esta proteína se identificó por primera vez mediante un rastreo genético para seleccionar mutantes de *S. cerevisiae* resistentes a rapamicina (Heitman *et al.*, 1991), un macrólido empleado como agente inmunosupresor para evitar el rechazo en trasplantes de órganos. A diferencia de los eucariotas superiores, que solo tienen un gen *TOR* esencial, *S. cerevisiae* posee dos genes semiredundantes, *TOR1* y *TOR2* (Crespo y Hall, 2002). Las quinasas TOR tienen un tamaño relativamente grande (282 kDa) y pertenecen a la familia de quinasas PIKK (*Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase*). Los miembros de esta familia se caracterizan por contener en el extremo C-terminal un dominio serina/treonina quinasa similar al dominio catalítico de las PI3Ks y de las PI4Ks (*Phosphatidylinositol 3/4 Kinases*; Loewith y Hall, 2011; Figura 1.6A). Flanqueando el dominio quinasa se sitúan el dominio FRB (*FKBP12-Rapamycin Binding site*), de unión al complejo que forman la proteína FKBP12 (*FK506 Binding Protein 12*) y la rapamicina, y el dominio FATC (dominio FAT –FRAP, ATM y TTRAP– en el extremo C-terminal). En el extremo N-terminal se encuentran los dominios HEAT (encontrados originalmente en la Hungtintina, en el factor de Elongation 3, en

## Introducción

la subunidad A de la proteína fosfatasa 2A y en TOR1) y FAT, ambos implicados en interacciones proteína-proteína.



**Figura I.6. Estructura y complejos de la quinasa TOR.** A) Dominios conservados en la estructura de TOR. La mitad N-terminal de TOR se compone de dos bloques de aproximadamente 20 dominios HEAT, de unos 40 aminoácidos cada uno, repetidos en forma de hélices  $\alpha$  antiparalelas. El dominio FAT, de 500 aminoácidos, contiene repeticiones HEAT modificadas, y el dominio FRB, de 100 aminoácidos, es el que une rapamicina. El dominio quinasa (Kinase) fosforila proteínas en residuos Ser/Thr y su secuencia se asemeja al dominio catalítico de la familia de quinazas PIKK. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio FATC, de 35 aminoácidos, el cual resulta esencial para la actividad quinasa. B) Estructura del complejo TOR1. El tamaño de TORC1 es de torno a 2 MDa y contiene Kog1, Tco89, Lst8 y Tor1 o Tor2. La unión de Kog1 a Tor es compleja e intervienen varios dominios de cada proteína. Lst8 se une al dominio quinasa de Tor. Probablemente, cada componente está presente por duplicado. C) Estructura del complejo TOR2. El tamaño de TORC2 es de aproximadamente 2 MDa y contiene Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 y/o su parálogo Bit2, Lst8 y Tor2 pero no Tor1. Probablemente, cada componente está presente por duplicado. Adaptado de Loewith y Hall (2011).

Las proteínas TOR conforman dos complejos multiproteicos esenciales llamados TORC1 y TORC2 (*TOR Complex 1/2*; Loewith *et al.*, 2002; Figura I.6 B y C), los cuales también se encuentran ampliamente conservados en eucariotas (Eltschinger y Loewith, 2015). En levadura, TORC1 está formado por las proteínas Kog1, Tco89, Lst8 y bien Tor1 o Tor2, mientras que TORC2 se compone de Avo1, Avo2, Avo3, Bit61, Lst8 y Tor2 pero no Tor1 (Wullschleger *et al.*, 2006). En hongos y animales TORC1 se inhibe en presencia de rapamicina al formar ésta un complejo con la prolil isomerasa FKBP12, el cual es capaz de unirse directamente a la quinasa TOR (Loewith *et al.*, 2002). En plantas el estudio de la ruta TOR se ha visto ralentizado por el hecho de que TORC1 es insensible a rapamicina debido a que ésta no puede ser unida por la proteína homóloga de FKBP12 (Deprost *et al.*, 2007). No obstante, se ha demostrado la conservación del control sobre el crecimiento celular por parte de la ruta TOR al inhibir TORC1 en plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan la proteína FKBP12 de levadura (Sormani *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2012). Por otro lado, el complejo TORC2 de levadura también resulta

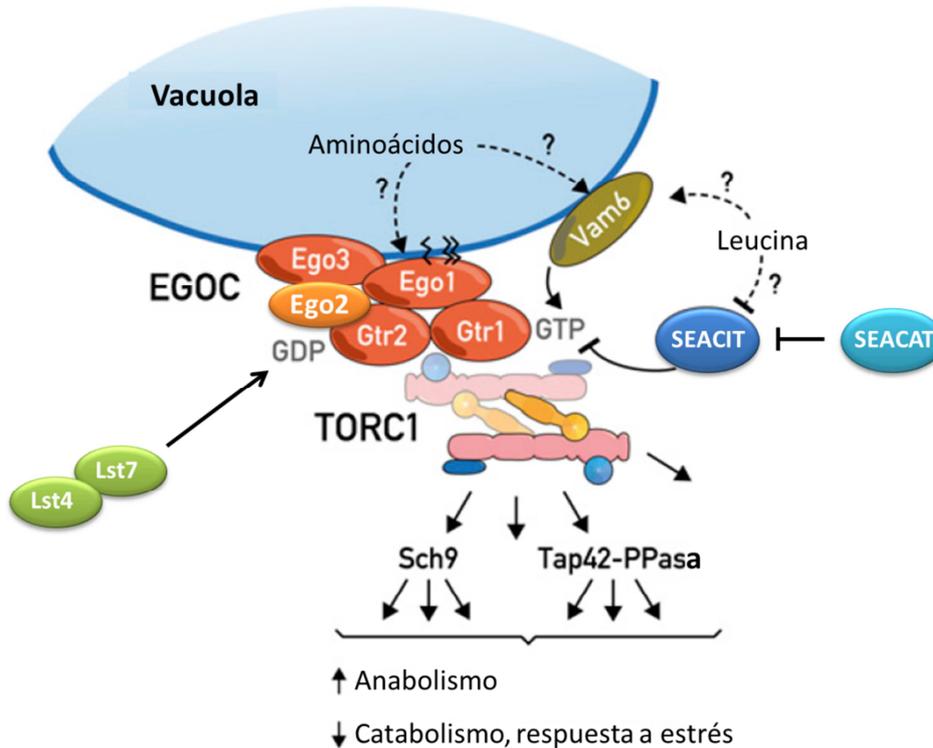
insensible a la rapamicina, lo que ha dificultado la caracterización de las funciones de dicho complejo. La insensibilidad a rapamicina de TORC2 parece ser debida a que la subunidad Avo3 enmascara el dominio FRB de Tor2 (Gaubitz *et al.*, 2015).

De manera general, se asocia funcionalmente al complejo TORC1 con los aspectos *temporales* del crecimiento celular, es decir, cuándo y bajo qué condiciones crece la célula, en tanto que al complejo TORC2 se le relaciona con los aspectos *espaciales*, dónde o hacia dónde crece. Más concretamente, señales derivadas de la presencia de nutrientes (carbono, nitrógeno, fosfato y aminoácidos) y la ausencia de estrés activan TORC1, el cual coordina la producción y acumulación de masa celular estimulando diversos procesos como la toma de nutrientes, la glicólisis, la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas y la síntesis de nucleótidos y mRNA (Loewith y Hall, 2011). La activación de TORC1 también provoca la supresión de las respuestas a estrés, causa un envejecimiento acelerado e influye sobre el ciclo celular. Pese a que son procesos distintos, el crecimiento celular y la división celular se encuentran a menudo interconectados. Por ejemplo, las células de levadura comienzan una nueva ronda de división únicamente tras haber alcanzado un tamaño crítico que está dictaminado por las condiciones ambientales de crecimiento (Cook y Tyers, 2007). Pues bien, aunque no se va a entrar en detalle, TORC1 también es un mediador entre las señales de crecimiento y el ciclo celular (Loewith y Hall, 2011). En condiciones adversas (ayuno de nutrientes, condiciones de estrés salino, oxidativo, por una subida de temperatura o la presencia de rapamicina) TORC1 se inhibe provocando una disminución de la síntesis general de proteínas, la inducción de la autofagia y, como consecuencia de la inhibición del crecimiento, la célula sale del ciclo celular para entrar en fase G<sub>0</sub>. Por otro lado, las funciones de TORC2 parecen estar asociadas a la organización polarizada del citoesqueleto de actina, en la progresión del ciclo celular a través de G<sub>2</sub>/M, a la endocitosis, a la represión de la actividad calcineurina y a la síntesis de esfingolípidos (Eltschinger y Loewith, 2015). La regulación de homeostasis de lípidos y del turgor intracelular parece otorgarle a TORC2 un papel importante en la regulación de la superficie celular.

#### *Aguas arriba de TORC1: el complejo EGO*

Pese a que existen evidencias de que TORC1 está regulado por multitud de señales fisiológicas, los mecanismos concretos de percepción y transducción de dichas señales todavía permanecen poco clarificados en su mayor parte. En lo que respecta a los niveles de aminoácidos intracelulares, se sabe que TORC1 es capaz de responder a estos a través del complejo EGO (*Exit from Growth Arrest*; Binda *et al.*, 2009). Este complejo se localiza junto a TORC1 en la membrana vacuolar y está compuesto por cuatro proteínas: Ego1, Ego3, Gtr1 y Gtr2 (Figura I.7). Gtr1 y Gtr2 son dos GTPasas pertenecientes a la familia Ras ortólogas de las Rag GTPasas de los metazoos (Kim *et al.*, 2008), mientras que Ego1 y Ego3 son, probablemente, los homólogos funcionales de las proteínas p18 (LAMTOR1) y p14 + MP1 (LAMTOR2 + LAMTOR3), respectivamente, presentes en vertebrados y que constituyen el complejo *Ragulator* (Kogan *et al.*, 2010). Dicho complejo, junto a las proteínas Rag, media en la señalización de aminoácidos a TORC1 en mamíferos (Kim y Guan, 2011). En levadura, Ego1 participa en el anclaje del complejo a la membrana vacuolar gracias a modificaciones lipídicas en su extremo N-terminal y Ego3 funciona como un homodímero que acopla las GTPasas a Ego1 (Dubouloz *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012). Recientemente, Powis y colaboradores (2015)

han identificado un componente adicional del complejo EGO, Ego2, que sería requerido para la integridad y localización de las GTPasas Gtr1 y Gtr2. Ego2, junto a Ego1 y Ego3, formaría parte de un complejo ternario que actuaría de andamiaje sobre la membrana vacuolar para fijar las GTPasas en la activación de TORC1 mediada por aminoácidos.



**Figura 1.7. El complejo EGO es un regulador principal de TORC1.** El complejo EGO (EGOC) está compuesto por cuatro proteínas: la proteína palmitoilada y miristolada Ego1, la proteína Ego3 y dos GTPasas de la familia Ras, Gtr1 y Gtr2. No obstante, recientemente también ha sido descrito Ego2 como probable componente del complejo. Al igual que TORC1, el complejo EGO se localiza en la membrana vacuolar donde parece percibir y responder a los niveles de leucina libre y, potencialmente, a los niveles de aminoácidos intravacuolares. Vam6 ha sido identificado como un factor intercambiador de guanina para Gtr1. El complejo SEACIT, regulado por el complejo SEACAT, actúa como GAP para Gtr1, mientras que el complejo formado por Lst4 y Lst7 hace lo propio con Gtr2. Con la configuración  $Gtr1^{GTP}$  y  $Gtr2^{GDP}$ , el complejo EGO activa TORC1, mientras que la configuración inversa lo inactiva. TORC1 activo estimula el crecimiento favoreciendo el anabolismo y reprimiendo el catabolismo y las respuestas a estrés a través de sus dos efectores principales: la quinasa Sch9 y las fosfatasas Tap42-PP2As. Adaptado de Loewith y Hall (2011).

En levadura, la actividad de TORC1 ha mostrado ser particularmente sensible a glutamina (Crespo *et al.*, 2002) y leucina (Binda *et al.*, 2009). Es más, dada su localización en la membrana vacuolar, se cree que el complejo EGO puede responder a niveles intravacuolares de aminoácidos (Loewith y Hall, 2011). Aunque se desconocen muchos detalles del mecanismo de activación de TORC1 a través del complejo EGO, parece que en presencia de aminoácidos Gtr1 es cargado con guanósil trifosfato (GTP) y Gtr2 lo es con guanósil difosfato (GDP), de manera que la configuración  $Gtr1^{GTP}$ - $Gtr2^{GDP}$  activa el complejo EGO que a su vez activa TORC1 (Eltschinger y Loewith, 2015). En ausencia de aminoácidos, predomina la conformación  $Gtr1^{GDP}$ - $Gtr2^{GTP}$ , que resulta en la inhibición de TORC1. Se ha propuesto que el intercambiador de guanina (GEF, *Guanine nucleotide Exchange Factor*) Vam6 regula el estado de unión a

nucleótidos de guanina de la proteína Gtr1 (Binda *et al.*, 2009) y que un complejo formado por las proteínas Lst4 y Lst7 funciona como proteína activadora de GTPasa (GAP, *GTPase-Activating Protein*) sobre Gtr2 (Pelli-Gulli *et al.*, 2015). Asimismo, el complejo SEACIT (*Seh1-Associated subcomplex Inhibiting TORC1 signalling*), el cual es regulado a su vez por el complejo SEACAT (*Seh1-Associated subcomplex Activating TORC1 signalling*), actúa como GAP regulando a Gtr1 (Binda *et al.*, 2009; Bar-Peled *et al.*, 2013).

A pesar de que tradicionalmente se ha considerado que la ruta TOR responde principalmente a señales extracelulares (como nutrientes o estrés), está tomando fuerza la visión de que también está regulada por señales intracelulares. Es decir, que los efectores aguas abajo de los complejos TORC1 y TORC2 están implicados en el control de la actividad de dichos complejos, los cuales actuarían a modo de bucles que se retroalimentan negativamente (Eltschinger y Loewith, 2015).

#### *Aguas abajo de TORC1: la quinasa Sch9 y las fosfatasas Tap42-PP2As*

La regulación del crecimiento por parte de TORC1 tiene lugar a través de una compleja red de señalización que comienza con sus dos sustratos principales: la quinasa Sch9 y las fosfatasas Tap42-PP2As (Loewith y Hall, 2011; Figura 1.7). No obstante, las vías de señalización dependientes del complejo TORC1 todavía no se han caracterizado completamente. Sch9 es una proteína quinasa de la familia AGC (denominada así por las proteínas quinasas A, G y C de mamíferos; Pearce *et al.*, 2010) que es fosforilada por TORC1 (Powers, 2007). Sch9 regula de una manera dependiente de TORC1 la biogénesis de ribosomas, la iniciación de la traducción y la entrada del ciclo celular en fase G0 (Urban *et al.*, 2007). Asimismo, TORC1 regula a las fosfatasas tipo 2A (Pph21, Pph22 y Pph3), así como a fosfatasas relacionadas con la familia 2A (Sit4 y Ppg1). Estas fosfatasas interactúan con la proteína reguladora Tap42 en función de la actividad de TORC1, por lo que se les conoce como Tap42-PP2As (Di Como y Arndt, 1996). Tap42 es fosforilada por TORC1 cuando éste está activo y forma un complejo con las fosfatasas PP2As, mientras que la inactivación de TORC1 resulta en la defosforilación de Tap42 y, por lo tanto, en una disminución de su afinidad por las fosfatasas, las cuales se liberan y pueden actuar (Loewith y Hall, 2011).

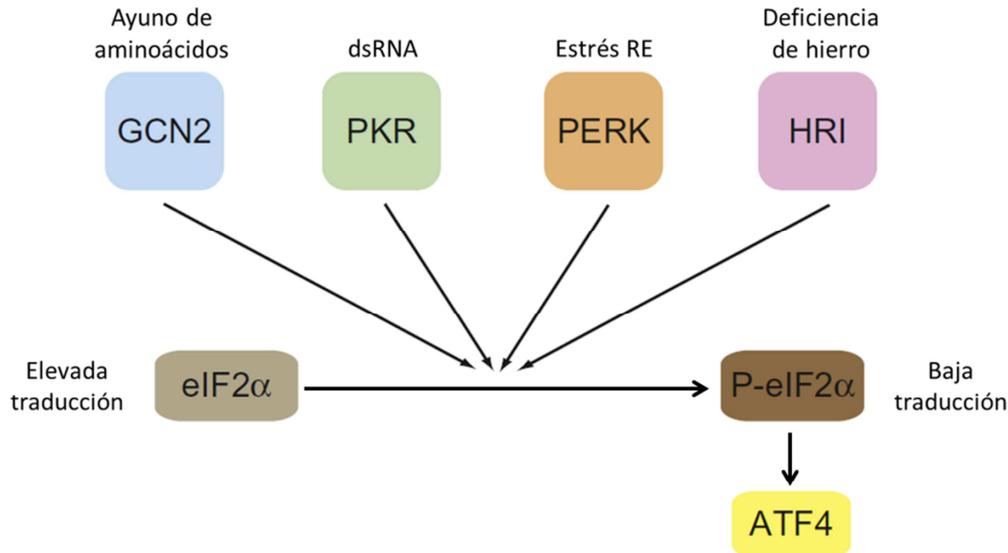
Uno de los mecanismos que tiene TORC1 de controlar el crecimiento es la regulación de la síntesis de proteínas. Este hecho se detectó por primera vez cuando se observó que un tratamiento con rapamicina provoca un marcado descenso en la síntesis proteica a través del bloqueo de la iniciación de la traducción (Barbet *et al.*, 1996). Como se detallará en el siguiente apartado (1.4.2), una diana principal en la regulación de la traducción es el factor de iniciación de la traducción eIF2 (*eukaryotic Initiation Factor 2*), cuya subunidad  $\alpha$  es fosforilada bajo ayuno de aminoácidos interfiriendo de forma dominante en la traducción de la mayoría de mRNAs (Hinnebusch, 2005). La quinasa de eIF2 $\alpha$  conservada en eucariotas es Gcn2 y se activa al unirse a tRNAs descargados que se acumulan cuando hay ayuno de aminoácidos. Además, la actividad de Gcn2 también puede ser regulada mediante fosforilación. Por una parte, la fosforilación en la Serina 577 (Ser577) de Gcn2 reduce su afinidad por tRNAs descargados y, por tanto, su actividad. La inhibición de TORC1 mediante un tratamiento con rapamicina produce de forma rápida la defosforilación de la Ser577 dependiente de las Tap42-PP2As, aumentando la afinidad de Gcn2 por tRNAs descargados y su actividad quinasa (Cherkasova y

## Introducción

Hinnebusch, 2003). Asimismo, la inhibición de Sch9 conlleva la fosforilación de eIF2 $\alpha$  a través de un mecanismo todavía no identificado (Urban *et al.*, 2007). Además de Gcn2 y eIF2 $\alpha$ , TORC1 actúa sobre otras dianas para regular la síntesis de proteínas. Concretamente, afecta al estado de fosforilación de la proteína Eap1 de levadura, que podría actuar parcialmente como homólogo funcional de las proteínas 4E-BP (*4E Binding Proteins*) de mamíferos (Cosentino *et al.*, 2000). En estos organismos, TORC1 activo fosforila las proteínas 4E-BP impidiendo su interacción con la proteína eIF4E. Al inactivarse TORC1, las proteínas 4E-BP en su estado no fosforilado interactúan con eIF4E inhibiendo la formación del factor de iniciación de la traducción eIF4F (complejo heterotrimérico formado por eIF4E-eIF4G-eIF4A) y provocando el descenso de la tasa de síntesis proteica (Raught y Gingras, 2007). Asimismo, TORC1 también puede actuar sobre el factor eIF4G en levadura (Berset *et al.*, 1998).

### 4.2. La ruta GAAC (General Amino Acid Control)

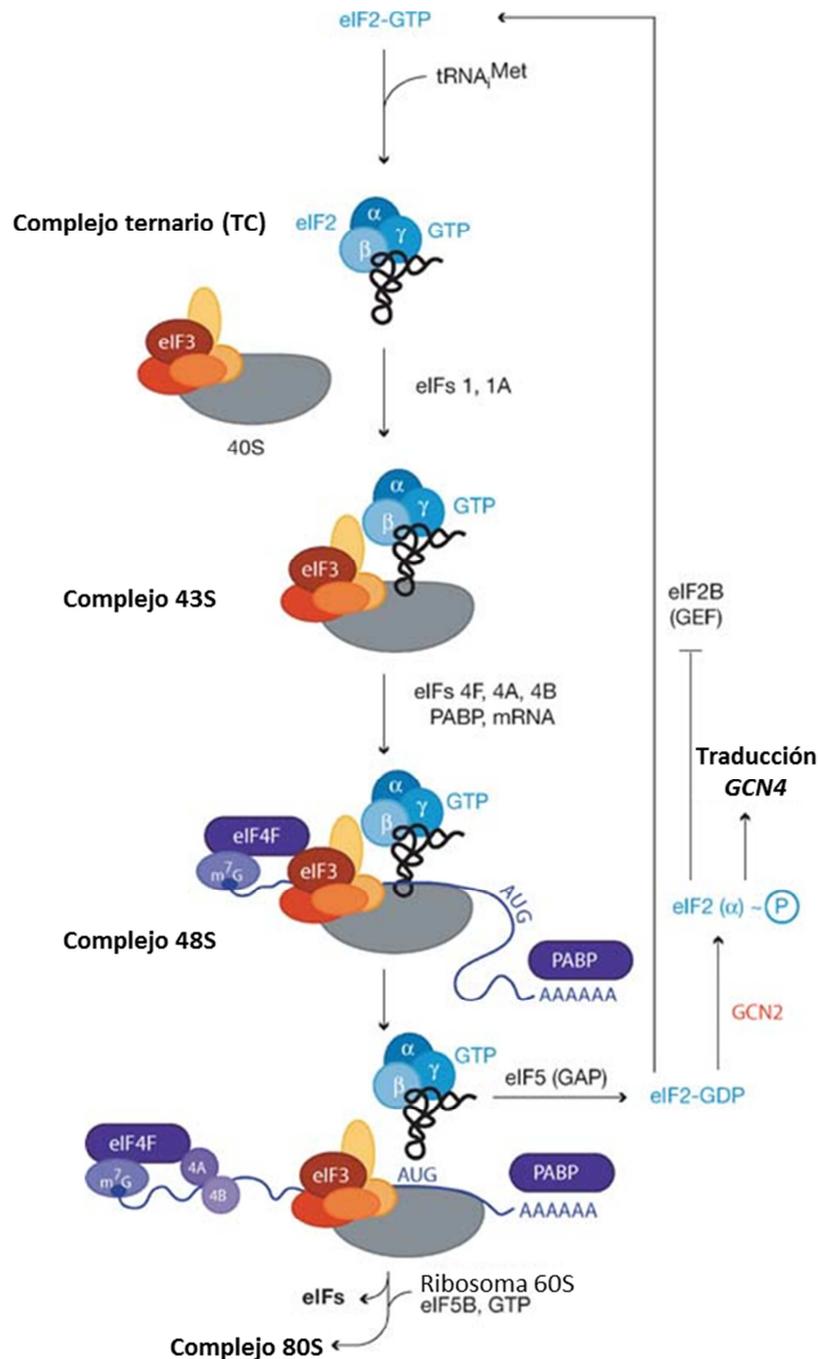
Otro de los principales sistemas mediante el cual la levadura se adapta a variaciones en los niveles de determinados nutrientes o a situaciones de estrés se basa en la ruta GAAC, también conocida como ruta GCN (*General Control Noninducible or Nonderepressible*), que coordina la tasa de iniciación de la traducción de mRNAs con la disponibilidad de aminoácidos proporcionando un mecanismo de respuesta rápido a cambios en las condiciones fisiológicas de las células (Hinnebusch, 2005; Wek *et al.*, 2006). El elemento central de dicha ruta es Gcn2, la única quinasa conocida de eIF2 $\alpha$  que se encuentra conservada en la evolución de todos los eucariotas, de hongos a plantas y animales (Hinnebusch, 2005; Lageix *et al.*, 2008; Dalton *et al.*, 2012). El ayuno de aminoácidos activa Gcn2, que fosforila a su sustrato eIF2 $\alpha$  provocando la inhibición de la síntesis general de proteínas y favoreciendo selectivamente la traducción de mRNAs que contienen pequeñas pautas de lectura abierta (ORFs, *Open Reading Frames*) situadas aguas arriba de la secuencia codificante del gen (uORFs, *upstream ORFs*) (Hinnebusch, 2005). El caso mejor caracterizado de activación traduccional mediada por Gcn2 es el del factor de transcripción Gcn4, responsable de la inducción de la mayoría de genes que codifican enzimas de biosíntesis de aminoácidos. Esta doble respuesta (inhibición de la síntesis proteica y la traducción selectiva de Gcn4) permite a las células que se encuentran en ambientes con escasez de nutrientes limitar el consumo de aminoácidos a la vez que se redirigen los recursos para aumentar su biosíntesis. Mientras que en levadura solo se conoce una quinasa (Gcn2) capaz de fosforilar eIF2 $\alpha$  (Krishnamoorthy *et al.*, 2001), en mamíferos existe una familia de quinasas de eIF2 $\alpha$  que surgió a partir de la quinasa GCN2 ancestral. Esta familia está compuesta por cuatro miembros que responden a diversos estreses, entre ellos: GCN2 a ayuno de aminoácidos, PKR a infecciones virales, PERK a un mal plegamiento de las proteínas en el retículo endoplasmático y HRI a ayuno de hierro (deficiencia de grupos hemo) (Wek *et al.*, 2006; Dever *et al.*, 2007; Dalton *et al.*, 2012; Figura 1.8). Además de producir una parada general en la traducción, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  estimula la traducción selectiva del mRNA del factor de transcripción ATF4, responsable de la inducción de numerosos genes de la respuesta integrada a estrés (ISR, *Integrated Stress Response*).



**Figura I.8. Las quinasas de eIF2 $\alpha$  en mamíferos.** Cada quinasa de eIF2 $\alpha$  se activa por un tipo distinto de estrés induciendo la fosforilación de eIF2 $\alpha$ : GCN2 (*General Control Nonderepressible-2*) por ayuno de aminoácidos, PKR (*double-stranded RNA-activated Protein Kinase*) por infecciones virales, PERK (*Pancreatic eIF2 $\alpha$ /PKR-Endoplasmic Reticulum-related Kinase*) por estrés relacionado con el plegamiento incorrecto de proteínas en el retículo endoplasmático (RE) y HRI (*Haem-Regulated Inhibitor*) por deficiencia en grupos hemo. En su forma defosforilada, eIF2 $\alpha$  mantiene de manera eficiente la traducción de proteínas, sin embargo, una vez fosforilada causa una inhibición general de la traducción. Paradójicamente, la traducción de ATF4 aumenta con la fosforilación de eIF2 $\alpha$  e induce genes de la respuesta integrada a estrés. Adaptado de Dalton *et al.* (2012).

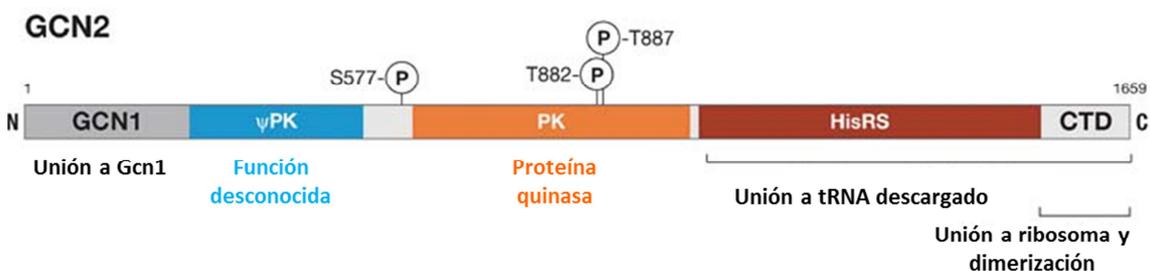
Para facilitar la comprensión del mecanismo de inhibición de la síntesis de proteínas por parte de Gcn2, se describe a continuación de forma resumida el proceso de iniciación de la traducción de mRNAs en células eucariotas (Hinnebusch, 2005). Dicho proceso comienza con la unión de un complejo ternario (TC, *Ternary Complex*), formado por un tRNA de metionina cargado (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>) y eIF2 asociado a GTP (eIF2-GTP), a la subunidad 40S del ribosoma, dando lugar al complejo de iniciación 43S (Figura I.9). El mRNA es activado por el factor de iniciación de la traducción eIF4F, que se asocia a la caperuza del extremo 5' del mRNA, y por la proteína PABP (*Poly A Binding Protein*), que reconoce y se une a la cola de poliadenina en el extremo 3'. La proteína PABP interacciona con el factor eIF4F provocando la circularización del mRNA, permitiendo la unión del mRNA al complejo 43S y dando lugar a la formación del complejo 48S. Éste último comienza a escanear el mRNA hasta dar con el codón de inicio AUG, que codifica el aminoácido metionina. Al emparejarse las bases del anticodón del Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> con el codón AUG, el GTP del TC es hidrolizado a GDP, tras lo que se libera eIF2-GDP y se incorpora la subunidad ribosomal 60S para formar el complejo de iniciación 80S, capaz de sintetizar proteínas. El eIF2-GDP liberado es reciclado por el GEF eIF2B para dar eIF2-GTP y poder formar otro TC que de paso a un nuevo ciclo de traducción. La reacción de eIF2-GDP a eIF2-GTP constituye un punto crítico de control de la traducción, pues, como ya se ha comentado, la quinasa Gcn2, en levadura, y la familia de quinasas relacionadas con GCN2, en mamíferos, inhiben dicha reacción mediante la fosforilación de la Ser51 en la subunidad  $\alpha$  de eIF2. Al ser fosforilado en su subunidad  $\alpha$ , eIF2 (eIF2 $\alpha$ -P) deja de ser un sustrato de eIF2B para pasar a ser un inhibidor competitivo, causando un descenso considerable en la formación de eIF2-GTP y del TC y teniendo como consecuencia en última instancia la inhibición general de la iniciación de la traducción. Puesto que la fosforilación de eIF2-GDP en la subunidad  $\alpha$  aumenta

su afinidad por eIF2B (Krishnamoorthy *et al.*, 2001), la fosforilación de solo una parte del total de factores eIF2 en la célula puede reducir considerablemente la síntesis proteica.



**Figura I.9. Representación simplificada de la ruta de iniciación de la traducción en eucariotas.** Los factores eIF1 y eIF1A promueven la unión del complejo ternario (eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup>) y eIF3 para formar el complejo de preiniciación 43S junto con la subunidad ribosomal 40S. Los factores eIF4 y la proteína de unión a poli(A) PABP facilitan la asociación del mRNA al complejo 43S para generar el complejo 48S, el cual busca el codón de inicio AUG en el mRNA. Una vez encontrado el codón AUG, eIF5 estimula la hidrólisis del GTP de eIF2, tras lo que se libera el factor eIF2-GDP y se une la subunidad ribosomal 60S (paso estimulado por otra GTPasa, eIF5B) para producir el complejo de iniciación 80S. El reciclaje de eIF2-GDP a eIF2-GTP está catalizado por el GEF eIF2B. Dicha reacción se inhibe por la fosforilación de la subunidad α de eIF2 mediada por Gcn2. Adaptado de Hinnebusch (2005).

El aumento en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en células con ayuno de aminoácidos ocurre sin un incremento en la cantidad de proteína Gcn2 (Wek *et al.*, 1990), en cambio, éste se debe a una acumulación de tRNAs descargados (Wek *et al.*, 1995; Hinnebusch, 1996; Wek *et al.*, 2004; Hinnebusch, 2005), ya que Gcn2 se une con similar afinidad a diferentes tipos de tRNAs deacilados (descargados) pero muestra afinidad reducida por tRNAs acilados (cargados) (Dong *et al.*, 2000). La falta de un determinado aminoácido puede provocar la deacilación de tRNAs no cognados (específicos de otros aminoácidos), además de los tRNA cognados, y diferentes tipos de tRNAs descargados pueden activar Gcn2 (Zaborske *et al.*, 2009). La unión a tRNAs deacilados requiere un dominio con homología con la histidil tRNA sintetasa (HisRS, *Histidyl-tRNA Synthetase*) y un segmento rico en lisinas del dominio C-terminal (CTD, *C-Terminal Domain*) (Wek *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 2000; Figura I.10). Así pues, se cree que estos dominios interaccionan parcialmente con el dominio quinasa (PK) (Qiu *et al.*, 1998) evitando la activación de Gcn2 con niveles basales de tRNAs descargados, sin embargo, bajo ayuno de aminoácidos los tRNAs descargados se unen al dominio HisRS eliminando las asociaciones inhibitorias (Dong *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2001) y el dominio HisRS unido al tRNA interacciona con el dominio PK estimulando la activación de la quinasa (Qiu *et al.*, 2001). Asimismo, la activación de Gcn2 precisa de autofosforilación en las treoninas Thr882 y Thr887 (Romano *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 2002) y de dimerización, para lo que resulta fundamental el dominio CTD (Qiu *et al.*, 1998; 2001). Este dominio también es requerido para la asociación de Gcn2 con los ribosomas ya que puede interaccionar con segmentos de doble cadena de los rRNA (Ramirez *et al.*, 1991; Zhu y Wek, 1998). Además, el dominio de unión a Gcn1 le permite interaccionar con el complejo formado por las proteínas Gcn1 y Gcn20, el cual también interacciona con el ribosoma y media en la activación de Gcn2 (Garcia-Barrio *et al.*, 2000; Sattlegger y Hinnebusch, 2005). Se ha propuesto que el complejo Gcn1-Gcn20 facilita la unión de tRNAs descargados al sitio A del ribosoma o la transferencia de estos desde el sitio A al dominio HisRS de Gcn2 para su activación (Hinnebusch y Natarajan, 2002).



**Figura I.10. Dominios funcionales de Gcn2.** Se muestran los dominios funcionales a los que pertenecen los 1659 aminoácidos de Gcn2 (180 kDa). Desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, se observa el dominio de unión a Gcn1, el dominio pseudoquinasa de función desconocida ( $\Psi$ PK), el dominio quinasa (PK), el dominio de homología con la histidil tRNA sintetasa (HisRS) y el dominio C-terminal (CTD). Se indican con letras P el sitio de fosforilación en la Ser577 (dependiente de TORC1) y los sitios de autofosforilación en las Thr882 y Thr887. Adaptado de Hinnebusch (2005).

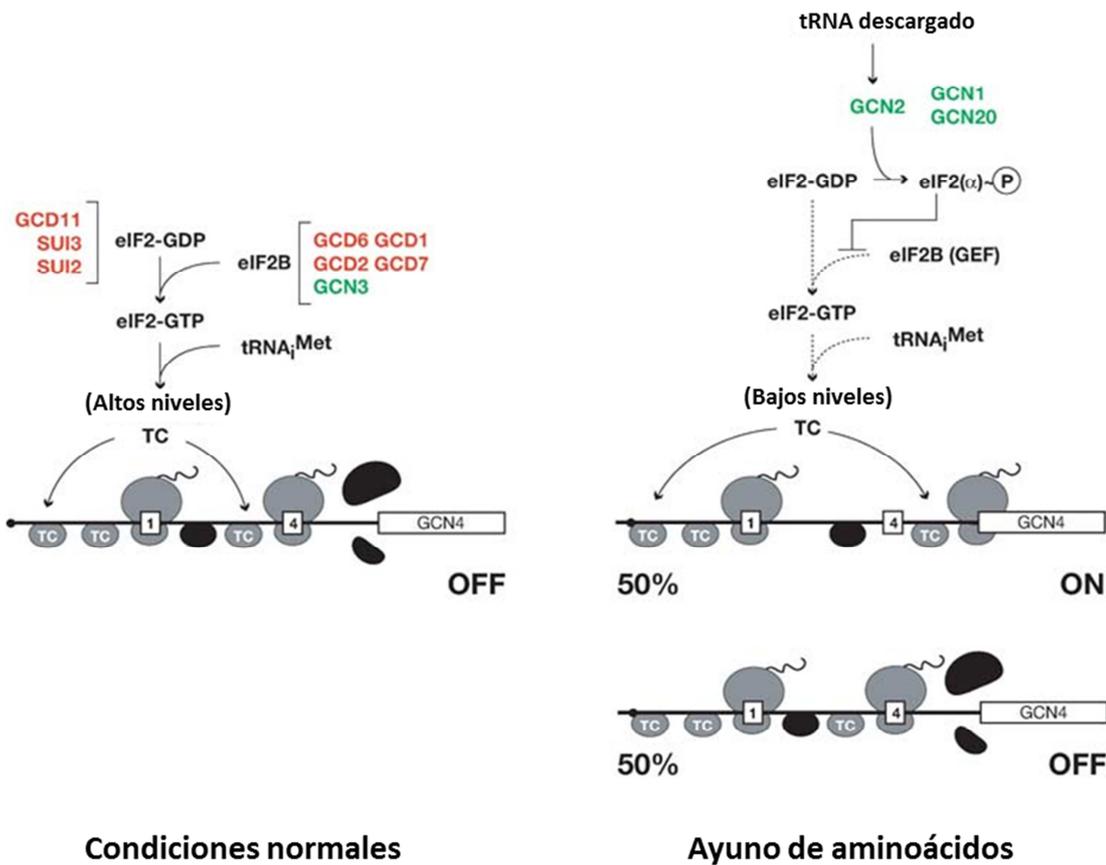
Aunque el ayuno de aminoácidos es la principal causa que desencadena la activación de la ruta GAAC, se ha descrito la activación de Gcn2 bajo otras situaciones de estrés como la limitación de glucosa (Yang *et al.*, 2000), el ayuno de purinas (Rolfes y Hinnebusch, 1993), el crecimiento en medio con alta salinidad (Goossens *et al.*, 2001; Narasimhan *et al.*, 2004; Zaborske *et al.*,

2009), en tratamientos con el agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS) (Natarajan *et al.*, 2001), con rapamicina (Cherkasova y Hinnebusch, 2003; Narasimhan *et al.*, 2004) o en situaciones de acidificación intracelular (Hueso *et al.*, 2012). Aunque estos estreses no están relacionados directamente con el ayuno de aminoácidos, parecen causar la activación de Gcn2 a través de la deacilación de los tRNAs. Esta idea viene apoyada por el hecho de que también bajo las citadas condiciones de estrés la activación de Gcn2 requiere la capacidad de unión a tRNAs de su dominio regulatorio HisRS. Además, Zaborske y colaboradores (2009) sugieren que la reducción en la carga del iniciador tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> en condiciones de salinidad indica que dicho estrés podría reducir los niveles del complejo ternario de eIF2 $\alpha$  y bloquear la iniciación de la traducción mediante mecanismos no totalmente dependientes de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . En cualquier caso, todavía falta una explicación clara para el origen de la descarga de los tRNAs en las distintas situaciones de estrés, lo cual se comentará más extensamente en el apartado “Discusión”.

Como se ha comentado en el inicio del presente apartado, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  por parte de Gcn2 no sólo reduce de forma general la iniciación de la traducción, sino que al mismo tiempo incrementa selectivamente la traducción del mRNA de *GCN4* (Figura I.11), que codifica el activador transcripcional de la familia bZIP (*basic leucine-Zipper*) Gcn4 (Ellenberger *et al.*, 1992). Este factor de transcripción forma un homodímero capaz de unirse a secuencias de unión específicas, denominadas UAS<sub>GCRE</sub> (*Upstream Activating Sequence GCN4 Responsive*), que se localizan en los promotores de los genes que regula directamente (Hill *et al.*, 1986; Struhl, 1989; Natarajan *et al.*, 2001). No obstante, parte de los genes inducidos por Gcn4 podrían serlo indirectamente, ya que Gcn4 regula la expresión de numerosos factores de transcripción. De hecho, los estudios sobre la expresión global de genes indican que Gcn4 induce cerca de una décima parte del genoma de *S. cerevisiae* en células con ayuno de aminoácidos (Natarajan *et al.*, 2001). Este factor de transcripción estimula la expresión numerosos genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos, concretamente, induce genes de las rutas de biosíntesis de todos los aminoácidos excepto la de cisteína y, aunque no promueve directamente la expresión de los genes implicados en su biosíntesis, sí induce genes de biosíntesis de sus precursores serina y homocisteína. Gcn4 también induce la transcripción de genes de biosíntesis de purinas, de aminoacil-tRNA sintetasas, de precursores de aminoácidos y vitaminas, de transportadores de aminoácidos, de componentes de los peroxisomas, de proteínas *carrier* mitocondriales, de la homeostasis de glucógeno (provocando la reducción de los niveles celulares), de proteínas reguladoras (quinasas, fosfatasa y factores de transcripción) y de proteínas relacionadas con la autofagia, mientras que, por otro lado, reprime la expresión de genes relacionados con proteínas ribosomales y factores de la traducción. El sentido biológico de este cambio en la expresión génica controlado por Gcn4 tiene que ver con la adaptación a situaciones de escasez de aminoácidos favoreciendo el aumento de su contenido intracelular.

La regulación a nivel traduccional de Gcn4 por parte de la ruta GAAC se basa en cuatro uORFs de solo dos o tres codones de largo. Según el modelo de regulación existente (Hinnebusch, 2000; Hinnebusch y Natarajan, 2002; Hinnebusch, 2005; Figura I.11), los ribosomas comienzan traduciendo el uORF1, tras lo que el 50 % se disocian y el otro 50 % continúan escaneando el mRNA en forma de subunidades 40S. Este primer uORF parece ser un elemento regulador positivo al permitir que en torno a la mitad de ribosomas no se disocian tras su traducción. En

condiciones normales (sin ayuno de aminoácidos), prácticamente todas las subunidades ribosomales 40S que continúan unidas al mRNA vuelven a unir un TC y reinician la traducción en los uORFs 2-4, disociándose definitivamente del mRNA sin traducir *GCN4*. Bajo ayuno de aminoácidos, Gcn2 fosforila eIF2 $\alpha$  haciendo disminuir los niveles de TC, por lo que aproximadamente el 50 % de las subunidades 40S que continúan escaneando el mRNA desde el uORF1 sobrepasan las uORF4 2-4 sin unir ningún TC. Muchos de estos ribosomas vuelven a unir un TC antes de llegar al codón de inicio de *GCN4* y como consecuencia se derreprime su traducción.



**Figura I.11. Modelo para el control traduccional de *GCN4*.** Se muestra esquemáticamente el mRNA de *GCN4* con las uORFs 1 y 4; para simplificar, las uORFs 2 y 3 se omiten ya que son funcionalmente redundantes con la uORF4. Las subunidades ribosomales 40S están dibujadas en gris cuando se encuentran asociadas a un complejo ternario (TC) y pueden reiniciar la traducción en el siguiente condón de inicio que encuentren. Las subunidades 40S unidas al mRNA pero sin TC son de color negro. Los ribosomas 80S se muestran traduciendo las uORF1, uORF4 o el mRNA *GCN4* con los péptidos sintetizados en forma de cola. Las subunidades 40S y 60S libres (en negro) se muestran disociándose del mRNA después de traducir la uORF4. Se indican las subunidades de eIF2 y de su GEF eIF2B. Los factores reguladores positivos para la traducción de *GCN4* están marcados en verde y los negativos en rojo. Después de la traducción de la uORF1, aproximadamente el 50 % de las subunidades ribosomales 40S permanecen unidas al mRNA y reanudan la búsqueda de otra ORF. En condiciones normales (sin ayuno de aminoácidos), la subunidad 40S vuelve a unir rápidamente el TC, dado que la concentración de TC es alta, y reinicia la traducción en la uORF4, tras lo cual el ribosoma se disocia del mRNA y no llega a traducir *GCN4*. Bajo condiciones de ayuno de aminoácidos, en torno al 50 % de subunidades 40S no son capaces de volver a unir el TC para reiniciar la traducción en la uORF4 debido a que la concentración de TC es baja, por lo que continúan buscando otra ORF hasta llegar a *GCN4*, donde sí reinician la traducción. El otro 50 % de subunidades 40S logra unir el TC antes de llegar a la uORF4, la traducen y se disocian sin llegar a *GCN4*. Adaptado de Hinnebusch (2005).

## Introducción

No obstante, hay indicios de que Gcn2 podría estimular la traducción selectiva de otros mRNAs además del de *GCN4*. Molin y colaboradores (2011) demostraron que la pérdida de función de *GCN2*, a diferencia de la de *GCN4*, reduce considerablemente la capacidad de la levadura para elevar los niveles de la sulfiredoxina Srx1 y proponen que esto ocurre a través de una regulación traduccional por parte de Gcn2. Es más, el mRNA de Srx1 contiene uORFs, aunque aún no se ha demostrado directamente que Gcn2 regule la traducción de dicho mRNA (Murguía y Serrano, 2012). Asimismo, se ha sugerido que Gcn2 podría activar la traducción de un regulador desconocido del transporte de leucina (Hueso *et al.*, 2012).

Cabe destacar la existencia de diversos trabajos que apuntan a que Gcn2 tiene otras funciones más allá de la regulación de la traducción a través de su principal sustrato eIF2 $\alpha$ . Por ejemplo, al producirse daños en el DNA por un tratamiento con MMS (Menacho-Marquez *et al.*, 2007) o por la exposición a radiación ultravioleta (Tvegard *et al.*, 2007), Gcn2 parece inhibir la síntesis de proteínas y retrasar el ciclo celular en la transición G1/S a través de mecanismos todavía no dilucidados pero independientes de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Ello sugiere que Gcn2, al ser activado por daños en el DNA, tendría otros sustratos (componentes de las rutas de reparación y de control del DNA, por ejemplo) mediante los que modularía la respuesta al estrés (Murguía y Serrano, 2012). Resulta interesante que en mamíferos se haya identificado a la metionil-tRNA sintetasa (MRS) como nuevo sustrato directo de GCN2 (Kwon *et al.*, 2011). La enzima GCN2 activada por radiación ultravioleta fosforila a MRS en la Ser662 causando, por un lado, la inhibición de la actividad MRS, lo que refuerza la represión general de la traducción que tiene lugar a través de eIF2 $\alpha$ , y, por otro, la inducción de una ruta de reparación del DNA.

## 5. Homeostasis de hierro en *S. cerevisiae*

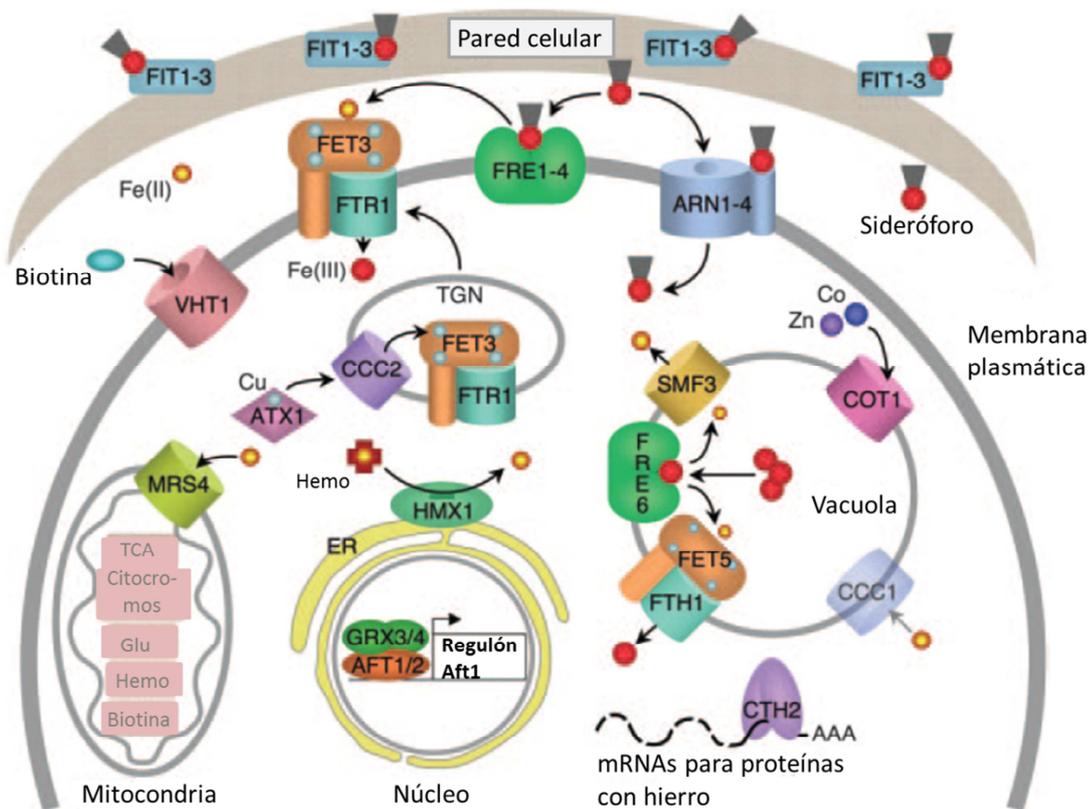
El hierro es un nutriente esencial para prácticamente todos los organismos puesto que los cofactores proteicos basados en hierro, tales como los complejos hierro-azufre (Fe/S), los grupos hemo y otros grupos prostéticos con hierro son necesarios para el ensamblaje funcional de numerosas proteínas (Paoli *et al.*, 2002; Ozer y Bruick, 2007; Lill y Mühlenhoff, 2008; Zhang, 2014). Los cofactores de hierro activan y dotan de estructura adecuada a enzimas de gran importancia en muchos de los procesos más importantes que tienen lugar en la célula. Así pues este metal (aunque también otros metales de transición como el Cu, el Zn o el Mn) se sitúa en el centro catalítico de numerosas enzimas que aprovechan su capacidad de actuar tanto de donador como de aceptor de electrones en las reacciones redox. Puesto que es un metal fundamental para la viabilidad de las células, éstas han desarrollado estrategias para optimizar su adquisición y almacenamiento y así asegurarse el mantenimiento de los niveles de hierro apropiados. No obstante, el hierro puede comprometer la viabilidad celular si se encuentra en exceso, ya que, debido precisamente a sus propiedades redox, puede catalizar la formación de ROS que resulten en graves daños a lípidos, proteínas y DNA (Dawes, 2004; Lyons y Eide, 2007). Por tanto, las células deben mantener un delicado equilibrio entre su deficiencia y unos niveles demasiado elevados.

### 5.1. Transporte de hierro de alta afinidad y respuestas transcriptómicas y metabólicas a los niveles de hierro

Aunque el hierro es un metal muy abundante en la naturaleza, la biodisponibilidad es baja por su reducida solubilidad en condiciones ambientales, encontrándose normalmente en forma de sales férricas o quelatos, de modo que *S. cerevisiae* ha desarrollado mecanismos para solubilizarlo y poder absorberlo. Así, en situaciones en las que existen altos niveles externos de hierro extracelular, éste es reducido en la parte exterior de la membrana plasmática mediante las metaloreductasas de la familia *FRE* (Martins *et al.*, 1998; Yun *et al.*, 2001) y después internalizado por los transportadores de membrana de baja afinidad Fet4 y Smf1, los cuales también pueden transportar  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^+$  y  $Zn^{2+}$  (Supek *et al.*, 1996; Dix *et al.*, 1994; 1997). En cambio, cuando las concentraciones externas de hierro son bajas, las células de levadura emplean un sistema de transporte de alta afinidad, el cual opera mediante dos rutas paralelas (Figura I.12). Una de ellas, denominada ruta reductora, consiste en la reducción del hierro férrico ( $Fe^{3+}$ ) a ferroso ( $Fe^{2+}$ ) por las reductasas *FRE* y en su posterior reoxidación y transporte al interior celular por un complejo específico de hierro formado por la oxidasa multicobre Fet3 (Askwith *et al.*, 1994) y la permeasa transmembrana Ftr1 (Stearman *et al.*, 1996). Antes de ser transferido al citosol por Ftr1, el hierro ferroso es oxidado en primer lugar por Fet3 en una reacción dependiente de cobre y que requiere oxígeno molecular (Philpott, 2006). El cobre se inserta en la proteína Fet3 de manera posttraduccional en un compartimento post-Golgi de la ruta secretora a través de un proceso en el que la chaperona de cobre Atx1 une cobre citosólico y lo transfiere a Ccc2, el transportador microsomal de cobre que lo bombea al lumen de las vasículas post-Golgi. No obstante, todavía no se comprende bien cómo se transporta el hierro una vez está dentro de la célula. Es probable que ya en el citosol se una a ligandos biológicos de bajo peso molecular como el glutatión y, posteriormente, las glutaredoxinas medien en el tráfico intracelular y en el reparto del conjunto de especies de hierro lábiles del citosol a las rutas que lo requieren (Hider y Kong, 2011; Mühlenhoff *et al.*, 2010; 2015).

La otra vía de transporte está mediada por sideróforos, que son compuestos de bajo peso molecular que unen  $Fe^{3+}$  con alta afinidad y especificidad (Neilands, 1995). *S. cerevisiae* no sintetiza sideróforos, aunque puede captar los que son liberados al medio por otros microorganismos (Lesuisse y Labbe, 1989). A bajas concentraciones, los sideróforos unidos a hierro férrico son transportados a través de la membrana plasmática por transportadores específicos de la familia *ARN* (Yun *et al.*, 2000a,b; Philpott, 2006). Esta levadura expresa cuatro transportadores de sideróforos en respuesta a deficiencia de hierro (Arn1-4). Cada transportador *ARN* tiene 14 dominios transmembrana, según las predicciones sobre las secuencias de aminoácidos, y muestra especificidad por un grupo diferente de sideróforos, exceptuando alguna variación puntual en dicha especificidad dependiendo la cepa de *S. cerevisiae* (Lesuisse *et al.*, 2001). Una vez dentro de la célula, el hierro ha de ser dissociado del sideróforo antes de ser usado, no obstante, no está claro el mecanismo por el que esto ocurre. En función del tipo de sideróforo, se ha detectado su acumulación tanto en la vacuola como en el citosol, pero no se sabe con seguridad si la liberación del hierro ocurre por una degradación del sideróforo o por un proceso de reducción de  $Fe^{3+}$ , en cualquier caso estas moléculas podrían servir para almacenar el hierro en una forma estable (Philpott y Protchenko, 2008). Asimismo, cuando las concentraciones exteriores de sideróforos con  $Fe^{3+}$  son relativamente

altas, éste también puede ser reducido por reductasas de la membrana plasmática (Fre1-4) e internalizado por transportadores de Fe<sup>2+</sup> (Philpott, 2006). En el transporte mediado por sideróforos también intervienen tres manoproteínas de la pared celular, Fit1, Fit2 y Fit3, que contribuyen a la retención y absorción de sideróforos (Protchenko *et al.*, 2001).



**Figura I.12. Respuesta a ayuno de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*.** Los nombres de los genes bajo el control transcripcional de Aft1 y Aft2 se indican con letra de color negro. En texto gris, CCC1 y proteínas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), los citocromos respiratorios, las rutas de biosíntesis de glutamato (Glt1), grupos hemo y biotina, indicando que se reprimen durante la deficiencia de hierro. Adaptado de Philpott y Protchenko (2008).

La activación de este sofisticado sistema de transporte de alta afinidad, además de otros genes relacionados con el metabolismo del hierro, está coordinada a nivel transcripcional de manera que en condiciones de deficiencia de hierro la levadura responde activando la expresión de un conjunto de genes (entre 30 y 40) bajo el control del factor de transcripción dependiente de hierro Aft1 (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995; 1996; Tabla I.1). Aft1 se expresa de manera constitutiva y su función es regulada a través de su localización subcelular. De manera que, cuando la concentración de hierro intracelular es alta, Aft1 se encuentra localizado en el citoplasma y no activa la transcripción, mientras que cuando hay bajos niveles de hierro, Aft1 se acumula en el núcleo donde se une al DNA y activa la transcripción de sus genes diana (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). Aft1 es el regulador principal de la transcripción en respuesta a los niveles de hierro, siendo necesario para activar adecuadamente la expresión de sus genes diana (Kaplan y Kaplan, 2009). No obstante, existe un gen parálogo que codifica el factor de transcripción Aft2 (Blaiseau *et al.*, 2001; Rutherford *et al.*, 2001). Ambos reconocen y se unen a

secuencias consenso similares en las regiones aguas arriba de sus genes diana y pueden activar la transcripción de un grupo de genes parcialmente solapante, aunque los efectos transcripcionales de Aft2 solo se perciben en ausencia de Aft1 (Philpott y Protchenko, 2008). Aft1 se une de forma más fuerte y específica que Aft2 al DNA en la secuencia canónica de respuesta a hierro TGCACCC, en cambio Aft2 puede reconocer otras secuencias variantes presentes en los genes *MRS4* y *SMF3*, involucrados en el transporte mitocondrial y vacuolar, respectivamente (Rutherford *et al.*, 2003; Courel *et al.*, 2005), por lo que se cree que Aft2 podría tener un papel más específico en la distribución del hierro a nivel intracelular (Courel *et al.*, 2005). En cualquier caso las funciones de Aft2 en la respuesta a la deficiencia de hierro están mucho menos claras que en el caso de Aft1.

**Tabla I.1. Principales genes del regulón de Aft1 y Aft2 con la localización subcelular y las funciones de sus respectivos productos.** Adaptado a partir de la información recogida en: Philpott y Protchenko (2008), Kaplan y Kaplan (2009), [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) y [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org).

Gen	Localización de la proteína	Función
<i>FIT1</i>	Pared celular	Unión de sideróforos
<i>FIT2</i>	Pared celular	Unión de sideróforos
<i>FIT3</i>	Pared celular	Unión de sideróforos
<i>FRE1</i>	Membrana plasmática	Ferrireductasa
<i>FRE2</i>	Membrana plasmática	Ferrireductasa
<i>FRE3</i>	Membrana plasmática	Ferrireductasa
<i>FRE4</i>	Membrana plasmática	Ferrireductasa
<i>FRE5</i>	Desconocido	Ferrireductasa putativa de membrana
<i>FET3</i>	Membrana plasmática	Oxidasa multicobre
<i>FTR1</i>	Membrana plasmática	Permeasa de hierro
<i>ARN1</i>	Membrana plasmática, endosoma	Transporte de sideróforos
<i>ARN2/TAF1</i>	Membrana plasmática	Transporte de sideróforos
<i>SIT1/ARN3</i>	Membrana plasmática, endosoma	Transporte de sideróforos
<i>ARN4/ENB1</i>	Membrana plasmática	Transporte de sideróforos
<i>VHT1</i>	Membrana plasmática	Transporte de biotina
<i>FRE6</i>	Vacuola	Ferrireductasa
<i>SMF3</i>	Vacuola	Transporte de Fe <sup>2+</sup>
<i>FET5</i>	Vacuola	Oxidasa multicobre
<i>FTH1</i>	Vacuola	Permeasa de hierro
<i>COT1</i>	Vacuola	Transporte de Zn <sup>2+</sup> y Co <sup>2+</sup>
<i>AKR1</i>	Golgi	Palmitoil transferasa
<i>CCC2</i>	Golgi	Transporte de Cu a vesículas
<i>MRS4</i>	Mitocondria	Transportador de Fe <sup>2+</sup>
<i>ISU1</i>	Mitocondria	Ensamblaje complejos Fe/S
<i>HMX1</i>	Retículo endoplasmático	Hemo oxigenasa
<i>CTH1</i>	Núcleo	Proteína de unión a mRNA
<i>TIS11/CTH2</i>	Citosol, núcleo	Proteína de unión a mRNA
<i>ATX1</i>	Citosol	Chaperona de Cu, traspa Cu a Ccc2
<i>BNA2</i>	Citosol	Triptófano 2,3-dioxigenasa
<i>ECM4</i>	Citosol	Glutación transferasa

## Introducción

Aft1, además de genes de toma de hierro, regula genes relacionados con su almacenamiento y movilización en la célula. Dentro de ella, la vacuola es el principal reservorio (Raguzzi *et al.*, 1988) y, cuando hay hierro abundante en el citoplasma, éste se traslada a la vacuola a través del transportador Ccc1 (Chen y Kaplan, 2000), lo que le permite protegerse de sus potenciales efectos tóxicos y almacenar hierro para cuando escasea en el medio extracelular (Li *et al.*, 2001). Cuando los niveles de hierro bajan, *CCC1* se reprime y Aft1 activa la expresión de proteínas vacuolares que permiten la salida de hierro de la vacuola al citosol. Por ejemplo, Fre6 se localiza en la vacuola donde participa en la movilización de hierro y cobre hacia el citosol (Rees y Thiele, 2007; Singh *et al.*, 2007), proceso en el que también interviene un complejo constituido por Fet5 y Fth1, dos parálogos de Fet3 y Ftr1, respectivamente (Spizzo *et al.*, 1997; Urbanowski y Piper, 1999). Asimismo, en condiciones de escasez de hierro, las células son más sensibles a los efectos tóxicos de otros cationes metálicos y por ello aumentan su almacenamiento en la vacuola a través de transportadores como Cot1, que es específico para otros metales diferentes al hierro como el zinc y el cobalto (Conklin *et al.*, 1992; MacDiarmid *et al.*, 2000). El gen que codifica la hemo oxigenasa de levadura, *HMX1*, también se induce en estas condiciones (Protchenko y Philpott, 2003; Kim *et al.*, 2006). La proteína Hmx1 se localiza en la parte citosólica del retículo endoplasmático y degrada grupos hemo, los cuales contienen hierro y controlan la activación de genes del metabolismo aeróbico (Kwast *et al.*, 1998), muchos de ellos relacionados con citocromos respiratorios, muy ricos en hierro. A través de la disminución de los grupos hemo la célula aumenta la disponibilidad de hierro para cubrir necesidades prioritarias y disminuye la cantidad de este metal presente en los complejos respiratorios. De hecho, ante la escasez de hierro, *S. cerevisiae* lleva a cabo un reajuste general del metabolismo favoreciendo rutas en las que emplea menos proteínas con hierro, como aquellas que contienen complejos Fe/S o grupos hemo, con el objetivo de incrementar la eficiencia en el uso de este metal y preservar los procesos esenciales. Un ejemplo es la biosíntesis de glutamato, ya que la levadura redirige su biosíntesis desde una ruta mediada por la enzima Glt1, que requiere un complejo Fe/S (Curti *et al.*, 1996), a una ruta alternativa que no lo requiere empleando una modulación a nivel transcripcional y postranscripcional (Philpott *et al.*, 2012). También ocurre algo similar en la biosíntesis de biotina, cuyo paso limitante está codificado por el gen *BIO2*, que codifica una proteína que necesita un complejo Fe/S para ser activa (Marquet *et al.*, 2001). En ausencia de hierro, los genes de biosíntesis de biotina se reprimen, mientras que se induce el gen del transportador de biotina de alta afinidad, *VHT1* (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004).

Uno de los cambios más destacables cuando la levadura tiene falta de hierro consiste en la reducción de la respiración y en la inducción de la glucólisis en favor de un metabolismo fermentativo, lo que explica que células crecidas en medio sin hierro o que carecen del factor de transcripción Aft1 sean incapaces de crecer en presencia de fuentes de carbono no fermentables (Philpott *et al.*, 2012). Células crecidas con concentraciones óptimas de hierro y en presencia de glucosa se caracterizan por un metabolismo fermentativo durante la fase exponencial del crecimiento, que es un proceso menos rico que la respiración mitocondrial pero que le aporta una ventaja adaptativa a la levadura al permitirle aprovechar la glucosa en primer lugar y tener como subproducto el etanol, que puede ser después oxidado completamente por la ruta de los ácidos tricarbónicos y la cadena respiratoria. Una vez agotada la glucosa, se produce un cambio hacia el metabolismo respiratorio (cambio diáxico);

es entonces cuando la levadura ha alcanzado la fase estacionaria de crecimiento. Pues bien, para adaptarse a la respiración, el volumen celular ocupado por las mitocondrias aumenta considerablemente y a la vez el contenido interno en enzimas relacionadas con ruta de los ácidos tricarbónicos y los complejos respiratorios. Esto hace que se incrementen los niveles de hierro total dentro de la mitocondria, puesto que muchas de estas enzimas requieren hierro en forma de complejos Fe/S y grupos hemo (Philpott *et al.*, 2012). No obstante, se ha observado que la concentración mitocondrial de hierro no cambia de células fermentativas a respiratorias, sino que lo que se produce es un incremento proporcional del hierro total acompañado del aumento de tamaño de la mitocondria y un cambio en la distribución de las formas en las que el hierro está presente (Garber Morales *et al.*, 2010). Así, mientras que en células respiratorias gran parte del hierro se usa para sintetizar los complejos Fe/S y grupos hemo de las proteínas, las células fermentativas tienen niveles menores de estas proteínas pero en cambio mucha mayor cantidad de Fe<sup>2+</sup> no hemínico de alto spin (asociado principalmente a complejos de bajo peso molecular y en menor medida a proteínas), de Fe<sup>3+</sup> mononuclear y Fe<sup>3+</sup> precipitado como nanopartículas, pudiendo servir de reservorio para sintetizar los complejos Fe/S y grupos hemo esenciales. El mayor contenido en hierro total para sintetizar los cofactores necesarios para la respiración se consigue expresando algunos transportadores de hierro de alta afinidad de una manera mediada tanto por la quinasa dependiente de glucosa del complejo Snf1-Snf4 como por Aft1 (Haurie *et al.*, 2003).

Muy probablemente, la homeostasis de aminoácidos también se ve afectada por la deficiencia de hierro, ya que la biosíntesis de varios aminoácidos depende de proteínas que contienen complejos Fe/S (Lill y Mühlenhoff, 2008). Sin embargo, Shakoury-Elizeh y colaboradores (2010) demostraron mediante análisis metabólicos que células deficientes en hierro tienen niveles de aminoácidos similares o mayores que células en condiciones normales de hierro, a excepción de una ligera reducción de glutamato. Tan solo después de un ayuno de hierro prolongado se detectó una deficiencia severa en lisina. Es más, este grupo observó que muchos genes relacionados con la biosíntesis y el transporte de aminoácidos se inducen en deficiencia de hierro, pese a que dicha biosíntesis tiene, en la mayoría de casos, algún paso dependiente de hierro. El hecho de que se mantengan unos niveles adecuados de aminoácidos a pesar de la falta de hierro y, por consiguiente, de un probable defecto en la síntesis de los mismos es atribuible a la robustez de los mecanismos homeostáticos de la levadura (Philpott *et al.*, 2012). Concretamente, la ruta GAAC, que posiblemente se active en estas condiciones, reduciría la tasa general de síntesis de proteínas y estimularía sistemas de síntesis de aminoácidos a través de Gcn4. Adicionalmente, la activación de la autofagia también contribuiría al mantenimiento de los niveles de aminoácidos.

En el regulón de Aft1 hay un gen denominado *TIS11* o *CTH2* (en la tesis se hará referencia a él como *TIS11*) que se ve fuertemente inducido bajo deficiencia de hierro y cuyo producto es responsable de la represión específica de mRNAs de proteínas relacionadas con la utilización de hierro (Puig *et al.*, 2005). Tis11 y su paróloga Cth1 son proteínas de unión a mRNA que reconocen elementos ricos en AU (adeninas y uracilos) en la región no traducida 3' de mRNAs específicos y promueven su degradación, permitiendo a la célula reprogramar el metabolismo dependiente de hierro y el almacenamiento del metal (por ejemplo induciendo la degradación de *CCC1*). Buena parte de la modulación de la homeostasis de hierro a nivel postranscripcional

se da a través de estas dos proteínas, especialmente Tis11, ya que Cth1 parece expresarse solo de manera transitoria en fases tempranas de la privación de hierro para desestabilizar preferentemente mRNAs de proteínas mitocondriales involucradas en la respiración o la síntesis de aminoácidos (Puig *et al.*, 2008).

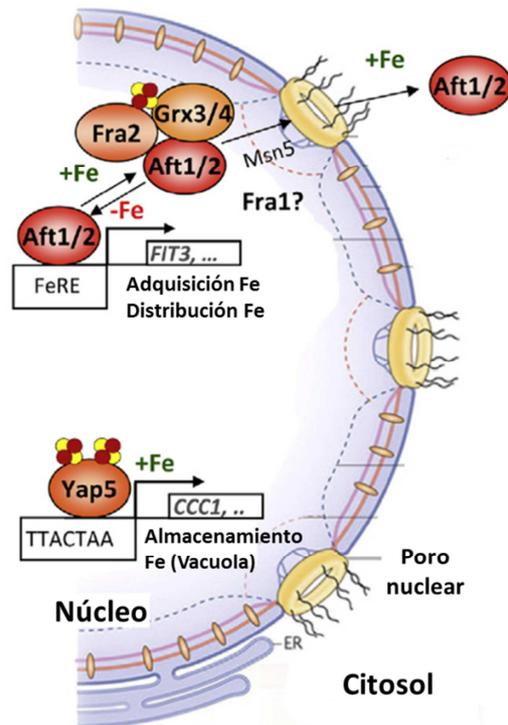
### 5.2. Percepción de los niveles de hierro intracelulares: complejos Fe/S

Los complejos Fe/S son cofactores proteicos con un origen ancestral (Imlay, 2006) y se encuentran abundantemente en las células eucariotas cumpliendo funciones fundamentales en reacciones de transferencia de electrones, en procesos catalíticos y regulatorios y en el almacenamiento de Fe y S (Beinert *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2005). Las formas más simples y comunes de estos complejos son [2Fe-2S] y [4Fe-4S], que contienen  $Fe^{2+/3+}$  y sulfuro  $S^{2-}$ , aunque también existen como [3Fe-4S] y otras formas más complejas (Stehling y Lill, 2013). Normalmente, los complejos Fe/S se asocian a las proteínas a través de la coordinación del hierro por parte del azufre de residuos de cisteína o del nitrógeno de residuos de histidina, aunque excepcionalmente también se pueden insertar a través de otros aminoácidos o cofactores como la S-adenosil metionina (Lanz y Booker, 2012). La mitocondria es esencial para la generación de complejos Fe/S (Lill y Kispall, 2000). Tal y como revisan Stehling y Lill (2013), el proceso de síntesis de estos complejos requiere decenas de proteínas y es iniciado por la maquinaria de ensamblaje de complejos Fe/S mitocondriales (ISC, *mitochondrial Iron-Sulphur Cluster*). La maquinaria de ensamblaje ISC es responsable de la maduración de todas las proteínas mitocondriales asociadas a complejos Fe/S y, además, el núcleo de dicha maquinaria es requerido también para la biosíntesis de las proteínas Fe/S citosólicas y nucleares debido a que produce un compuesto intermediario con azufre, todavía no caracterizado completamente, que es exportado al citosol por el transportador ABC Atm1 de la membrana mitocondrial interna. En el citosol, la maquinaria de ensamblaje de proteínas Fe/S citosólicas (CIA, *Cytosolic Iron-Sulphur protein Assembly machinery*) usa dicho precursor para madurar e insertar los complejos Fe/S en proteínas citosólicas y nucleares específicas. Las proteínas Fe/S mitocondriales participan en procesos como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (p.ej. aconitasa), la cadena transportadora de electrones (p.ej. complejos respiratorios I-III), la oxidación de ácidos grasos y la biosíntesis de ácido lipoico y biotina. En el citosol se sintetizan las proteínas Fe/S que intervienen en la biosíntesis de aminoácidos (p.ej. isopropilmalato isomerasa), en la modificación de tRNA y en la traducción y su regulación (p.ej. Rli1). Por último, las proteínas Fe/S nucleares participan en la replicación del DNA (p.ej. DNA polimerasas, helicasas y primasas), en la reparación del mismo y en la regulación de la longitud de los telómeros.

El ensamblaje de complejos Fe/S mitocondriales por el núcleo de la maquinaria ISC y su transporte al citosol por Atm1 son esenciales para la señalización que regula el factor de transcripción Aft1 en levadura (Chen *et al.*, 2004b; Rutherford *et al.*, 2005; Lill *et al.*, 2014). Aft1 se mueve entre el núcleo y el citosol en respuesta a los niveles de hierro (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002), siendo transportado al núcleo por la carioferina Pse1 independientemente del hierro presente (Ueta *et al.*, 2003) y expulsado de éste por el transportador Msn5 bajo altos niveles del metal (Ueta *et al.*, 2007). Como consecuencia, Aft1 queda retenido en el núcleo cuando hay deficiencia de hierro. No obstante, la expulsión de Aft1 del núcleo mediada por Msn5 no es necesaria para inhibir la actividad de Aft1 (Ueta *et al.*, 2012). En cambio, las

monotiol glutaredoxinas parálogas Grx3 y Grx4 (Grx3-4) (Ojeda *et al.*, 2006) y las proteínas Fra1 y Fra2 (Kumanovics *et al.*, 2008) son responsables de la señalización que indica el nivel de hierro celular y, de hecho, la pérdida de función de cualquiera de estas proteínas (en el caso de las glutaredoxinas especialmente en el doble mutante  $\Delta grx3\Delta grx4$ ) conlleva la activación de Aft1 independientemente de los niveles de hierro. Las Grx3-4 pueden formar homodímeros a través de su unión a un complejo [2Fe-2S], el cual hace de puente y resulta esencial tanto para el tráfico intracelular de hierro como para la transmisión de la señal de los niveles del metal. Este complejo Fe/S está coordinado por el residuo de cisteína del motivo CGFS del sitio activo de las glutaredoxinas y por una molécula de glutatión reducido, siendo su ensamblaje en las Grx3-4 independiente de la maquinaria CIA (Muhlenhoff *et al.*, 2010). Mutaciones en la cisteína del sitio activo de las Grx3-4 impiden la unión de los complejos Fe/S y, en consecuencia, la levadura pierde la capacidad de regular Aft1 (Muhlenhoff *et al.*, 2010). Por lo tanto, el complejo Fe/S con las Grx3-4 funciona como un sensor de hierro para el factor de transcripción Aft1 y explica cómo el núcleo de la maquinaria de ensamblaje ISC y Atm1 participan en la regulación de la homeostasis celular de hierro (Ueta *et al.*, 2012; Lill *et al.*, 2012). Los complejos [2Fe-2S] puente permiten la formación de heterodímeros entre las Grx3-4 y la proteína Fra2, en los que un residuo de histidina de Fra2 resulta fundamental para la estabilización del complejo Fe/S y la regulación adecuada de Aft1 (Li *et al.*, 2009a; 2011a). El papel de Fra1 no está claro, si bien se ha observado que podría formar complejos con Fra2, que a su vez se une a Grx3-4 (Kumanovics *et al.*, 2008). Además de unirse con Fra2, las Grx3-4 pueden interactuar con Aft1 (también con Aft2) en un modo dependiente de complejos Fe/S, provocando así la disociación del factor de transcripción de sus promotores diana (Ojeda *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2011; Ueta *et al.*, 2012; Figura I.13). Entonces, Aft1 oligomeriza facilitando su expulsión al citosol por Msn5 (Dlouhy y Outten, 2013). Cuando hay bajos niveles de hierro, se encuentran pocos complejos Fe/S disponibles para unirse al complejo Fra2/Grx3-4, por lo que Aft1 no se disocia y permanece sobre el DNA induciendo la transcripción de su regulación.

En condiciones en las que hay elevados niveles de hierro, además de inhibir Aft1 y Aft2, la levadura activa el factor de transcripción Yap5, que interviene en la detoxificación por exceso de hierro al inducir la transcripción del gen *CCC1*, entre otros (Li *et al.*, 2008; 2011b). Yap5, cuya actividad transcripcional también depende del sistema ISC, une dos complejos [2Fe-2S] en su dominio activador que le permiten percibir altos niveles de hierro (Rietzschel *et al.*, 2015).



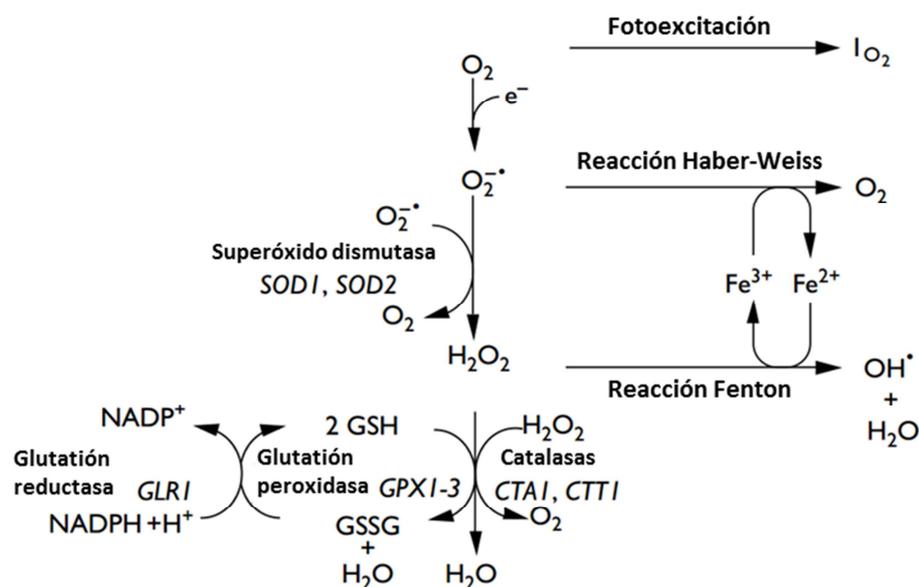
**Figura I.13. El papel de los complejos Fe/S en la regulación de los factores de transcripción de respuesta a hierro en *S. cerevisiae*.** Parte superior: Los genes involucrados en la adquisición celular y distribución intracelular de hierro están bajo el control de los factores de transcripción Aft1 y Aft2. Aft1 se mueve entre el citosol y el núcleo de una manera dependiente de hierro y funciona como un activador transcripcional bajo limitación de hierro. Las monotiol glutarredoxinas Grx3 y Grx4 interaccionan con Aft1-Aft2 y la proteína tipo BOLA Fra2, lo que resulta en la disociación de Aft1-Aft2 de sus promotores diana (FeRE, *Fe deficiency-Responsive Element*) bajo condiciones de suficiencia de hierro. El complejo Fe/S unido a Grx3-Grx4 es esencial para el proceso. El papel de Fra1 no está claro. Parte inferior: El regulador b-ZIP de respuesta a estrés Yap5 coordina la respuesta adaptativa a niveles elevados de hierro induciendo *CCC1*, que codifica un transportador vacuolar de metales divalentes. Yap5 percibe los niveles tóxicos de hierro a través de complejos Fe/S unidos a su dominio activador. Adaptado de Mühlenhoff *et al.* (2015).

### 5.3. Relación entre el hierro y el estrés oxidativo

En ausencia de estrés, las especies reactivas de oxígeno se producen de manera normal, principalmente como subproductos del metabolismo aeróbico y de la fotosíntesis, y son rápidamente eliminadas por los sistemas de defensa antioxidante de la célula. El estrés oxidativo surge cuando los mecanismos de supervivencia celulares son incapaces de contrarrestar las ROS, teniendo lugar un desequilibrio entre su producción y su metabolización (Dawes, 2004).

Como se ha comentado anteriormente, un efecto común en células afectadas por estrés osmótico, salino o por altas temperaturas es la aparición de estrés oxidativo debido a una elevada producción de ROS, moléculas que son altamente reactivas gracias a la presencia de una capa de electrones de valencia desapareados y que tienen la capacidad de dañar proteínas, membranas y DNA. Las ROS más importantes son el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ). La respiración mitocondrial es el principal proceso biológico que lleva a la generación del anión superóxido, que ocurre como consecuencia de una fuga de electrones de los complejos I y III de la cadena

de transporte de electrones. Los superóxidos, aunque pueden reaccionar directamente con algunas proteínas, no son por sí mismos radicales muy reactivos, pero dan lugar a otras ROS que sí lo son. La enzima superóxido dismutasa transforma el anión superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual también puede ser generado por otras oxidasas. El peróxido de hidrógeno no posee carga y es capaz de atravesar con facilidad las membranas, pudiendo ejercer como molécula de señalización de estrés en organismos como las plantas (Neill *et al.*, 2002). Esta molécula también es relativamente poco reactiva, pero tiene efectos deletéreos al convertirse en el altamente reactivo radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton, que es catalizada por iones metálicos, principalmente  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  (Figura I.14). La reacción de Haber-Weiss genera las formas reducidas de iones metálicos a partir de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{O}_2^-$ , lo que permite que haya  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  disponible para dar lugar a la reacción de Fenton. El radical hidroxilo reacciona indiscriminadamente con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos y ácidos orgánicos y puede participar en reacciones de transferencia de electrones e hidrógenos para generar otros radicales, generalmente menos reactivos que el  $\text{OH}^\bullet$  (Dawes, 2004). Por otro lado, el anión superóxido puede oxidar los complejos Fe/S de determinadas enzimas, lo que causa su pérdida de función y la liberación de hierro libre que podría participar en la reacción de Fenton exacerbando el estrés oxidativo (Flint *et al.*, 1993; Keyer e Imlay, 1996; Srinivasan *et al.*; 2000).



**Figura I.14. Especies reactivas de oxígeno y mecanismos de defensa en levadura.** Las principales especies reactivas de oxígeno incluyen el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) y el oxígeno singlete ( $\text{I O}_2$ ). Se indican los sistemas de defensa enzimáticos (superóxido dismutasa, glutación reductasa, glutación peroxidasa y catalasas), los cuales intervienen en la inactivación de ROS, junto a los genes de levadura que codifican las enzimas. También se muestra el ejemplo de la participación de iones de Fe en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss y la formación de  $\text{OH}^\bullet$ . Abreviaturas: GSH, glutación reducido; GSSG, glutación oxidado; nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada ( $\text{NADP}^+$ ) y reducida ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ). Adaptado de Dawes (2004).



## OBJETIVOS



La presente tesis doctoral se ha realizado con base en un convenio I+D+i entre la empresa Fertinagro Nutrientes S.L. (Teruel) y el laboratorio del profesor doctor Ramón Serrano Salom. Considerando la necesidad de la empresa de demostrar los posibles efectos protectores frente a estrés abiótico de varios bioestimulantes presentes en sus fertilizantes y de conocer sus mecanismos de acción, se establecieron los siguientes objetivos:

1. Estudio sistemático del efecto de los bioestimulantes sobre el crecimiento de la levadura control (silvestre), teniendo en cuenta la velocidad de crecimiento en la fase exponencial y el rendimiento de los cultivos tras la diauxia (fase estacionaria). Ello permitirá identificar los bioestimulantes que aumenten el vigor de la levadura, que no tengan efectos apreciables o que tengan efectos tóxicos sobre este organismo.
2. Estudio del efecto de los bioestimulantes sobre la tolerancia a diversos estreses abióticos: calor, estrés hídrico u osmótico, estrés salino y estrés oxidativo. Los dos bioestimulantes con más efectos positivos pasarán a la siguiente fase de estudio.
3. Determinar el efecto de los bioestimulantes seleccionados en la fase anterior sobre la expresión global de genes empleando micromatrices de DNA.
4. Analizar el efecto de los bioestimulantes seleccionados sobre cepas de levadura mutadas en determinadas rutas que puedan proporcionar información sobre su mecanismo de acción.
5. Integración de resultados obtenidos para llegar a un modelo sobre el mecanismo de acción de los distintos bioestimulantes.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, plásmidos y medios de cultivo

En la tabla M.1 se muestran las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

**Tabla M.1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizados en este trabajo.**

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
BY4741 (silvestre)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
<i>Δaft1</i>	BY4741 <i>Δaft1::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δfet3</i>	BY4741 <i>Δfet3::KanMX4</i>	EUROSCARF
MCM6	BY4741 <i>YEp352 [AFT1::URA3]</i>	Este trabajo
<i>Δgcn2</i>	BY4741 <i>Δgcn2::KanMX4</i>	EUROSCARF
GCN2 <sup>c</sup>	BY4741 <i>GCN2<sup>c</sup>-M719V-E1537G</i>	Menacho-Marquez <i>et al.</i> , 2007
<i>Δgcn4</i>	BY4741 <i>Δgcn4::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δtor1</i>	BY4741 <i>Δtor1::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δego1</i>	BY4741 <i>Δego1::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δego3</i>	BY4741 <i>Δego3::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δgtr1</i>	BY4741 <i>Δgtr1::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δgtr2</i>	BY4741 <i>Δgtr2::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δsch9</i>	BY4741 <i>Δsch9::loxP-Kan-loxP</i>	Pascual-Ahuir y Proft, 2007
MCM1	BY4741 <i>pRS426 [GFP-AFT1::URA3]</i>	Este trabajo
MCM2	BY4741 <i>Δgcn2::KanMX4 pRS426 [GFP-AFT1::URA3]</i>	Este trabajo
MCM3	BY4741 <i>GCN2<sup>c</sup>-M719V-E1537G pRS426 [GFP-AFT1::URA3]</i>	Este trabajo
<i>SUI2</i> (silvestre)	<i>MATa ura3-52 leu2-3,-112 trp1-Δ63 Δsui2 Δp919 [SUI2, URA3] pRS-65 [pRS414 SUI2-TRP1]</i>	Hueso <i>et al.</i> , 2012
<i>SUI2-S51A</i>	<i>MATa ura3-52 leu2-3,-112 trp1-Δ63 Δsui2 Δp919 [SUI2, URA3] pRS-67 [pRS414 SUI2 S51A-TRP1]</i>	Hueso <i>et al.</i> , 2012
S288C (silvestre)	<i>MATα</i>	Mortimer y Johnston, 1986
YPH499 (silvestre)	<i>MATa ura3-52 lys2-801 (ambar) ade2-101 (ocre) trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>	Yun <i>et al.</i> , 2000a
YPH499 <i>Δfet3</i>	YPH499 <i>Δfet3::TRP1</i>	Yun <i>et al.</i> , 2000a
YPH499 <i>Δarn1-4</i>	YPH499 <i>Δarn1::HISG Δarn2::HISG Δarn3::HISG Δarn4::HISG</i>	Yun <i>et al.</i> , 2000a
YPH499 <i>Δfet3Δarn1-4</i>	YPH499 <i>Δfet3::TRP1 Δarn1::HISG Δarn2::HISG Δarn3::HISG Δarn4::HISG</i>	Yun <i>et al.</i> , 2000a

Para generar el mutante de sobreexpresión de *AFT1* (cepa MCM6), un fragmento *XbaI* con la ORF del gen *AFT1* bajo el control de su propio promotor se subclonó en el sitio *XbaI* del plásmido *YEp352*, con el cual se transformó la cepa *BY4741*. Previamente, la ORF de *AFT1* con su promotor se amplificó a partir de DNA genómico de la cepa *BY4741* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se usaron los cebadores *AFT1for* (GCTCTAGAGCGCCAAGTAGATGAGTCGTGAAGAG) y *AFT1rev* (GCTCTAGAGCAGCCTAATCTACCGCAAAG) los cuales contienen sitios de corte específicos para la enzima *XbaI* y amplifican una secuencia de aproximadamente 3 kb (600 pb aguas arriba del codón de iniciación del gen y 274 pb aguas abajo del codón de terminación).

El plásmido *pRS426*, que contenía una construcción con el gen del factor de transcripción *AFT1* marcado en su extremo amino terminal con GFP y bajo el control de su propio promotor (*Crisp*

## Materiales y métodos

*et al.*, 2003), fue utilizado para transformar las cepas BY4741,  $\Delta gcn2$  y GCN2<sup>c</sup> obteniendo las cepas MCM1, MCM2 y MCM3, respectivamente. Las características y la procedencia de los plásmidos empleados en esta tesis se muestran en la tabla M.2.

**Tabla M.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

Nombre	Características	Procedencia
pRS426	2 $\mu$ , AmpR, URA3, GFP-AFT1	Crisp <i>et al.</i> , 2003
YEp352	2 $\mu$ , AmpR, URA3, AFT1	Este trabajo

En condiciones habituales de trabajo, los cultivos de levadura fueron incubados a 28 °C en agitación (200 rpm) en los medios descritos más abajo (Sherman, 2002). Para el almacenamiento a largo plazo, la levadura se mantuvo a -80 °C en viales con una solución de glicerol al 15 %. Para su uso rutinario se conservó a 4 °C en placas de medio sólido. Para medir la absorbancia a 660 nm de los cultivos se utilizó un espectrofotómetro SP8001 (Dinko).

### Medio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*)

Se trata de un medio rico en nutrientes preparado a partir de 1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona bacteriológica y 2 % de glucosa.

### Medio SD (*Synthetic Dextrose*)

Este medio mínimo sintético se preparó disolviendo 0,67 % de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) sin aminoácidos, 2 % de glucosa y 50 mM de MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) llevado a pH 6,0 con Tris Base. De acuerdo con las necesidades de cada cepa, se suplementó el medio con los aminoácidos y las bases púricas y pirimidínicas requeridas (30  $\mu$ g/ml adenina, 100  $\mu$ g/ml triptófano, 100  $\mu$ g/ml lisina, 30  $\mu$ g/ml histidina, 100  $\mu$ g/ml leucina, 100  $\mu$ g/ml metionina, 30  $\mu$ g/ml uracilo). Para la preparación de medios sólidos se añadió un 2% de agar. Para la obtención de medio SD pobre en hierro se añadió el quelante de hierro extracelular BPS (batofenantrolina disulfonato) en las concentraciones indicadas y, adicionalmente en los casos en que se especifica, se sustituyó el YNB por YNB sin hierro. Para la preparación de medio mínimo con galactosa (SGal), se sustituyó la glucosa por galactosa.

## 2. Bioestimulantes

La empresa Fertinagro Nutrientes S.L., a través del Dr. Miguel Ángel Naranjo Olivero, proporcionó al laboratorio del profesor Ramón Serrano soluciones concentradas de los bioestimulantes que se citan a continuación (se incluye el fosfito en esta denominación pese a que estrictamente no es considerado un bioestimulante) y con los que se suplementó el medio de crecimiento de la levadura:

- Fosfito 30-20 (referido en esta tesis como Fosfito).
- Fulvato potásico
- Amino22
- Vinacillas
- Extracto de algas
- Ácido húmico

La empresa mantuvo la confidencialidad sobre los detalles de la composición de los bioestimulantes, si bien informó que su nomenclatura está asociada a la naturaleza química de los mismos, a excepción del Vinacillas cuya composición nos es desconocida completamente. Cabe destacar que el Fosfito 30-20 es una mezcla de fosfito (30 % p/p) y potasio (20 % p/p). Asimismo, el Amino22 es un hidrolizado de proteínas obtenido por hidrólisis química.

## 3. Análisis del crecimiento y de la tolerancia a estrés

### 3.1. Ensayo de crecimiento en medio líquido

La capacidad de crecimiento de cultivos de levadura en medio líquido se evaluó monitorizando el crecimiento de los cultivos en placas multipocillo mediante un analizador Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd.). Cada pocillo se rellenó con 350 µl de medio inoculado y se tomaron lecturas de densidad óptica cada 30 min durante las 96 h de duración de cada experimento con un filtro de banda ancha (420-580 nm) para reducir la contribución del medio a las lecturas. En todos los casos se partió de cultivos saturados diluidos hasta una absorbancia a 660 nm teórica inicial de 0,02 unidades. Las placas se mantuvieron a 28 °C durante la incubación y se agitaron a máxima intensidad durante 60 s antes de cada lectura. Cada cultivo se creció por triplicado para reducir en lo posible los errores de carga, se eliminó el valor de densidad óptica (DO) dado por el medio de cultivo y las medias de los datos de las 3 réplicas técnicas de cada condición fueron corregidas para obviar la pérdida de linealidad de las densidades ópticas con altas densidades celulares utilizando la fórmula publicada por Warringer y Blomberg (2003):  $DO_{\text{corregida}} = DO_{\text{medida}} + 0,449*(DO_{\text{medida}})^2 + 0,191*(DO_{\text{medida}})^3$ . Se analizaron dos parámetros a partir de las curvas de crecimiento de los cultivos obtenidas después de realizar el tratamiento de los datos: la tasa (o velocidad) de crecimiento y el rendimiento de los cultivos en la fase estacionaria. El rendimiento de los cultivos se obtuvo a partir del valor moda de las densidades ópticas corregidas en la fase estacionaria. Para determinar la tasa de crecimiento, se representaron las curvas de crecimiento en escala semilogarítmica transformando los datos de densidad óptica corregida a  $\log_{10}$  (Log DO vs t). Se realizó un ajuste lineal fiable ( $R^2$  próximo a 1) de los datos de la fase exponencial de las curvas en escala semilogarítmica, calculando la pendiente de la recta obtenida y dividiendo su valor

## Materiales y métodos

por  $\log_{10}e$ . El resultado de esta división corresponde al valor de la tasa de crecimiento ( $\mu$  en  $h^{-1}$ ).

### 3.2. Ensayo de crecimiento en medio sólido

Se obtuvieron diluciones seriadas de cultivos líquidos saturados de las distintas cepas de levadura y fueron transferidas (3  $\mu$ l de cada dilución) con la ayuda de un replicador (Sigma-Aldrich) a placas de medio sólido con las condiciones a estudiar. Las placas fueron incubadas durante 4 días a 28°C.

### 3.3. Ensayos de supervivencia a estrés oxidativo y a choque térmico

#### 3.3.1. Estrés oxidativo

Para determinar la posible tolerancia a estrés oxidativo conferida por los bioestimulantes se llevaron a cabo ensayos de supervivencia a peróxido de hidrógeno, un oxidante que induce muerte celular cuando se encuentra en altas concentraciones (Hoeberichts *et al.*, 2010). Cultivos saturados se diluyeron hasta una  $Abs_{660}$  (Absorbancia a 660 nanómetros) de 0,1 unidades en 2 ml de medio SD líquido y se incubaron en tubos de cristal de 15 ml en ausencia (control) o presencia de los distintos aditivos hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ). Seguidamente se añadió  $H_2O_2$  en las concentraciones indicadas y se dejaron incubar los cultivos durante 30 min. Se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l en el tiempo 0 y a los 30 min de incubación con  $H_2O_2$  para determinar la tolerancia mediante recuento celular de viables. Para realizar el recuento celular, las alícuotas se diluyeron 2000 veces en  $H_2O$  milliQ estéril y se extendieron 200  $\mu$ l en placas de medio YPD sólido. La supervivencia de cada cultivo se calculó como el porcentaje de las unidades formadoras de colonias supervivientes a los 30 min respecto al número de colonias en el tiempo 0.

#### 3.3.2. Choque térmico

Cultivos saturados se diluyeron hasta una  $Abs_{660}$  de 0,1 unidades en 10 ml de medio SD líquido y dejaron crecer en matraces de vidrio de 50 ml en ausencia o presencia de los distintos aditivos hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ). Los matraces se introdujeron en un baño de calor a 44 °C durante 30 min, tomando alícuotas de 5  $\mu$ l a los 0 y a los 30 min. El recuento celular de viables se realizó de la misma forma que en la apartado 3.3.1.

## 4. Ensayo de degradación de peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno presente en una muestra se puede detectar y medir mediante un ensayo fluorimétrico basado en la oxidación (dependiente de peróxido de hidrógeno) del ácido homovanílico por la peroxidasa de rábano, lo que da lugar al ácido 2,2'-dihidroxi-3,3'-dimethoxibifenil-5,5-diacético (Wang *et al.*, 1995). Este compuesto es un dímero fluorescente que puede ser excitado a 315 nm y que posee su máximo de emisión a 425 nm.

Para averiguar si determinados bioestimulantes son capaces de degradar  $H_2O_2$ , se prepararon muestras con medio SD y los bioestimulantes a ensayar a su concentración adecuada de uso y

se añadió 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como muestra control se utilizó medio SD con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para determinar la concentración precisa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de cada muestra se construyó una recta de calibrado utilizando patrones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0, 0,5, 1, 1,5, 2 y 3 mM. Se prepararon dos soluciones: solución A (tampón Hepes 50 mM ajustado a pH 7,6, ácido homovalínico 5 mM y peróxidasa de rábano 2,5 U/ml) y solución B (solución A sin peroxidasa). Para realizar las medidas se utilizó el espectrofotómetro de luminiscencia (Perkin Elmer LS50B) y la cubeta de vidrio (Hëlma 101-QS de 10 mm). En la cubeta se depositaron 200 µl de muestra y 2,8 ml de solución A y se midió la fluorescencia (Valor A). Para cada muestra se llevó un control con la solución B (Valor B). Se realizaron dos controles más, a partir de la fluorescencia de la solución A y B sin muestra (a los que se llamó Valores C y D, respectivamente). El valor final de fluorescencia se calculó con la siguiente fórmula: Valor fluorescencia = (Valor A – Valor C) – (Valor B – Valor D). Todas las muestras y sus controles se midieron a los 0 y a los 60 min.

## 5. Purificación y manipulación de ácidos nucleicos

### 5.1. Aislamiento de DNA plasmídico en *E. coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* se empleó el método descrito por Holmes y Quigley (1981). Las células de 2 ml de cultivo crecidas en medio LB con el antibiótico selectivo se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 0,5 ml de STET (10% sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA y 1% Triton X-100), se añadió 5 µl de lisozima 5% y se calentó a 95°C durante 2 min para lisar las células. A continuación, se centrifugó a 12800 rpm durante 15 min y se eliminó el sedimento (restos celulares y DNA cromosómico). Al sobrenadante se le agregó 1 volumen (≈ 400 µl) de isopropanol y se dejó precipitar a -20°C durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 12800 rpm durante 15 min y se resuspendió el precipitado en 200 µl de agua estéril, tras lo que se añadió 700 µl de etanol absoluto:acetato de amonio 7,5 M (6:1) y se dejó a -20°C durante 20 min. A continuación, se centrifugó a 12800 rpm durante 15 min y se lavó el precipitado con etanol 70%. Finalmente el precipitado se resuspendió en 40 µl de agua estéril.

### 5.2. Aislamiento de DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la preparación de DNA genómico de *S. cerevisiae* se empleó el método basado en la publicación de Winston y colaboradores (1983). Se partió de un cultivo de 10 ml crecido hasta la fase exponencial ( $Abs_{660} \approx 2-3$ ) en medio YPD. Las células se concentraron por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de tampón SoE (0,9 M sorbitol y 0,1 M EDTA, pH 8), tras lo cual se volvieron a centrifugar y resuspender en 300 µl de SoE. En este punto se tomó una alícuota de 5 µl que se diluyó en 1 ml de tampón TCES (0,2 M Tris-HCl pH 8, 0,2 M NaCl, 50 mM EDTA y 2 % SDS) para medir la  $Abs_{660}$  inicial de antes de hacer protoplastos. Se añadió 20 µl de DTT (ditiotreitól) 0,5 M y 25 µl de *Zymolyase 20 T* (AMSBIO) al 1 % en SoE y se incubó 30 min a 37 °C. Tras ello se tomó otra alícuota de 5 µl para medir de nuevo la  $Abs_{660}$  y comprobar que ésta había caído hasta a menos del 10 % del valor inicial. Para lisar los protoplastos, se añadió 0,9 ml de TCES y 10 µl de proteinasa K al 2 %. Se mezcló por inversión y se dejó incubar 30 min a 65 °C. A continuación se separó cada muestra en dos microtubos (≈ 0,6 ml en cada uno) y se trató con 0,6 ml de PCI (fenol neutralizado:cloroformo:alcohol isoamílico; 25:24:1), se mezcló

## Materiales y métodos

bien y se centrifugó durante 5 min a 12800 rpm para separar las fases y acumular en la interfase proteínas desnaturalizadas y polisacáridos insolubles residuales de las paredes celulares. Se tomó la fase superior ( $\approx 0,5$  ml), se añadió 10  $\mu$ l de RNasa A al 1 % y se dejó incubar 30 min a 37 °C para degradar el RNA de la levadura. El DNA genómico se precipitó añadiendo 1 ml de etanol:acetato amónico 7,5M (6:1) y manteniéndose 10 min a -20 °C, tras lo cual se centrifugó durante 5 min a 12800 rpm. El DNA se lavó dos veces con etanol 70 % y después de dejarse secar al aire se resuspendió en 25  $\mu$ l de agua estéril.

### 5.3. Electroforesis de DNA

Para comprobar la integridad y concentración del DNA plasmídico y genómico extraído se emplearon geles de agarosa 0,7 % fundida en tampón de electroforesis TBE 0,5X (45 mM TrisBase, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA). Tanto el tampón de electroforesis como el gel se prepararon con 0,05 % de bromuro de etidio. La visualización del DNA se realizó iluminando el gel con luz ultravioleta a 254 nm de longitud de onda. Como tampón de carga se utilizó tampón 6X azul (40% sacarosa, 0,1 M EDTA y 0,25% azul de bromofenol). Como marcadores de tamaño y peso molecular se utilizaron los patrones comerciales 1Kb y  $\lambda$ /*HindIII* de Invitrogen. Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, se empleó el kit *GENECLEAN turbo kit* (MP Biomedicals).

### 5.4. Aislamiento de RNA de *S. cerevisiae*

Se aisló RNA de células de levadura crecidas en 10 ml de medio SD hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ) empleando un método basado en el descrito por Li *et al.* (2009b). Las células del cultivo se concentraron por centrifugación en frío (4 °C) durante 5 min a 2500 rpm y se resuspendieron en 1 ml de agua estéril. Cada muestra se dividió en dos microtubos (500  $\mu$ l en cada uno) y se volvió a centrifugar a 4 °C durante 2 min a 12800 rpm. Las células se resuspendieron en 400  $\mu$ l de *RNA isolation buffer* (5 % SDS, 10 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 6), tras lo cual se incubaron durante 5 min a 65 °C. Seguidamente, los microtubos se colocaron en hielo y se añadió 200  $\mu$ l de KCl 0,3 M (pH 6,0). Después se centrifugaron a 4 °C durante 5 min y a 12800 rpm. El sobrenadante se pasó a un nuevo microtubo y se añadió un volumen de PCI ácido. Se centrifugó 5 min a 12000 rpm, se recogió la fase superior y se añadió 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. A continuación se dejaron las muestras un mínimo de 10 min a -20 °C y después se centrifugaron durante 10 min a 12800 rpm. Finalmente se lavó el RNA precipitado con 1 ml de etanol 70 % y, tras volver a centrifugar 5 min a 12800 rpm, se resuspendió el RNA en 100  $\mu$ l de agua estéril. Posteriormente, el RNA se purificó mediante un kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) que permite su unión a una membrana porosa de sílica gel, un tratamiento con DNasa y su posterior elución. La integridad del RNA se comprobó mediante geles no desnaturalizantes y para conocer su concentración se utilizó un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop).

### 5.5. Electroforesis de RNA bajo condiciones no desnaturalizantes

Para comprobar la integridad del RNA extraído se emplearon geles de agarosa al 1 % fundida en tampón de electroforesis TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA) con 0,001 % de bromuro de etidio. Las muestras se prepararon con el tampón de carga 1,25X (55 % formamida, 20% formaldehído, 12,5 % MAE 10X, 8 % glicerol, 0,05 % azul de bromofenol y

0,001 % de bromuro de etidio) y se calentaron a 56 °C durante 10 min antes de cargarlas en el gel. El marcador *0,5 -10 kb RNA Ladder* (Invitrogen) se trató como una muestra más. Los geles se corrieron 1-2 h a 50 V y la visualización del DNA se realizó iluminando el gel con luz ultravioleta a 254 nm de longitud de onda.

#### 5.6. Síntesis de cDNA

Se partió de 1 µg de RNA total previamente purificado y cuya integridad se hubo verificado mediante electroforesis de la muestra. Se añadió 4 µl de *5X Reaction Mix* y 2 µl de *Maxima Enzyme Mix* (Thermo Scientific) en un volumen total de 20 µl (en el *mix* está incluido el oligodT). La incubación tuvo dos etapas: una primera de 10 min a 25°C y otra de 30 min a 50°C. Finalmente la reacción se inactivó calentando a 85°C durante 5 min.

#### 5.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Todos los cebadores utilizados en este trabajo fueron sintetizados por la empresa Isogen Life Science. La reacción de PCR para la clonación de *AFT1* y su promotor se llevó a cabo en tubos estériles, donde se añadieron los siguientes reactivos:

- 200 ng DNA molde
- 20 µl tampón *Phusion HF 5X*
- 8 µl dNTPs 10 mM
- 5 µl cebador sentido 10 µM
- 5 µl cebador antisentido 10 µM
- 1 µl DNA polimerasa (*Phusion*) 1U /µl
- Volumen final de 100 µl con agua MilliQ estéril

Se utilizó la enzima *Phusion High-Fidelity Polymerase* (New England Biolabs) para una amplificación del DNA de alta fidelidad. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) con el siguiente programa:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 min
- 30 ciclos de:
  - desnaturalización: 30 s a 95°C
  - hibridación de los cebadores: 30 s a una temperatura de anillamiento de 55 °C
  - extensión: 1,5 min a 72 °C
- 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min

#### 5.8. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción

Esta técnica se empleó para realizar el clonaje de *AFT1*. La digestión con enzimas de restricción del DNA plasmídico y del DNA amplificado mediante PCR se llevó a cabo en las condiciones de reacción recomendadas por el proveedor. Se empleó de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de DNA a digerir.

### 5.9. Ligación de moléculas de DNA

La ligación de moléculas de DNA se llevó a cabo empleando 1 U de la enzima *T4 DNA Ligase* (Invitrogen) por cada 10 µl de volumen de reacción. Para la ligación de fragmentos, se utilizaron 100 ng de inserto manteniendo una relación molar de 1:3 (vector:inserto). La incubación se realizó durante 1 h a 22 °C y 16 h a 16 °C. A continuación se transformó el producto de la ligación en células competentes de *E. coli*.

## 6. Técnicas de transferencia génica

### 6.1. Transformación de *E. coli*

#### 6.1.1. Obtención de células competentes para transformación por choque térmico

Se añadió 400 µl de un cultivo saturado de *E. coli* (cepa DH5α) a 200 ml de medio SOB (2 % triptona, 0,5 % extracto de levadura, 10 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM MgSO<sub>4</sub>) y se incubó a temperatura ambiente hasta alcanzar una Abs<sub>660</sub> de 0,5-0,7. Se recogieron las células por centrifugación en frío a 5000 rpm durante 5 min, y se resuspendieron en 10 ml de TB (*Transformation Buffer*) frío (0,48 % Pipes, 16 mM CaCl, 170 mM KCl, 40 mM MnCl<sub>2</sub>, ajustado a pH 6,7). Tras una incubación de 10 min en hielo, se realizó otra centrifugación en frío de 5 min a 5000 rpm. Finalmente, las células se resuspendieron en 10 ml de TB frío y se agregaron 750 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Tras incubar de nuevo 10 min en hielo, se distribuyeron las células en alícuotas de 100 µl que se guardaron a -80 °C.

#### 6.1.2. Transformación por choque térmico

Se añadió 5 µl de plásmido, o mezcla de ligamiento, a una alícuota de 50 µl de células competentes de *E. coli* y se colocó 30 min en hielo. Transcurrido ese tiempo se realizó un choque térmico de 1,5 min a 42°C, e inmediatamente se colocó en hielo durante 5 min. A continuación, se agregaron 800 µl de medio LB (1 % triptona, 0,5 % extracto de levadura, 1 % NaCl, ajustado a pH 7 con NaOH) y se incubó 1 h a 37°C en agitación. Finalmente, se repartió el volumen de la transformación en varias placas de LB con ampicilina.

### 6.2. Transformación de *S. cerevisiae*

#### 6.2.1. Obtención de células competentes para transformación por choque térmico

Tomando 100 µl de un cultivo saturado de células de la cepa a transformar de *S. cerevisiae*, se inocularon 100 ml de medio YPD líquido y se incubaron durante la noche hasta alcanzar una Abs<sub>660</sub> de entre 0,6-1 unidades. Las células se centrifugaron en dos tubos de 50 ml a 2500 rpm durante 5 min, se lavaron con 5 ml de Li-TE (acetato de litio 100 mM, Tris 10 mM pH 7,5 y EDTA 0,4 mM) y se pasaron a un único tubo tras lo cual se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de Li-TE y se incubaron durante 30 min a 30 °C sin agitación. Posteriormente se añadió 50 µl de ssDNA 1 % (DNA de esperma de salmón) y las células se repartieron en alícuotas de 50 µl. Parte de las alícuotas se utilizaron inmediatamente para proceder a la transformación de alta eficiencia (apartado 6.2.2) y el resto

se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  añadiendo previamente  $11,5\text{ }\mu\text{l}$  de glicerol 80 % por cada  $50\text{ }\mu\text{l}$  de células competentes.

#### 6.2.2. Transformación de células competentes de levadura por el método de alta eficiencia

Se mezcló  $50\text{ }\mu\text{l}$  de células competentes con entre  $0,1$  y  $10\text{ }\mu\text{g}$  de plásmido y  $600\text{ }\mu\text{l}$  de solución PEG-Li-TE (40% PEG-4000 en Li-TE 1X). Esta solución se preparó inmediatamente antes de realizar la transformación. La mezcla se incubó 30 min a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se sometió a un choque térmico a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Se recogieron las células por centrifugación (1 min, 12800 rpm), se resuspendieron en  $100\text{ }\mu\text{l}$  de agua estéril y se extendieron sobre placas de medio selectivo incubando éstas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se observaron colonias (aproximadamente después de 3 días de incubación).

## 7. Análisis de la expresión génica con micromatrices de DNA

### 7.1. Características de las micromatrices empleadas

En este trabajo se han utilizado micromatrices de DNA provenientes del laboratorio del Dr. Joaquin Ariño, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona. Cada micromatriz contiene las secuencias completas de aproximadamente el 85 % de las ORFs de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Posas *et al.*, 2000).

### 7.2. Preparación de la sonda de RNA para la hibridación

Cada experimento con micromatrices constó de 4 réplicas biológicas. Tras la extracción y purificación del RNA de células crecidas en ausencia (control) o en presencia de los bioestimulantes hasta la fase exponencial ( $\text{DO}_{660} \approx 0,4$ ) se llevó a cabo el marcaje del mismo con fluoróforos. Se empleó un método de marcaje indirecto, de modo que en primer lugar se obtuvo *aminoallyl-RNA* (aa-RNA) y a continuación se acoplaron los fluoróforos. Para ello se utilizó el kit *Aminoallyl MessageAmp<sup>TM</sup> RNA kit* (Ambion).

#### 7.2.1. Amplificación del RNA y síntesis del aa-RNA

En primer lugar se sintetizó cDNA de doble cadena a partir del RNA purificado. Para la síntesis de la primera hebra del cDNA, se tomaron  $0,5\text{ }\mu\text{g}$  de RNA y se añadió  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  de cebador T7-oligo-dT en un volumen total de  $6\text{ }\mu\text{l}$ . Los tubos se incubaron a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min en un termociclador, calentado previamente a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se hizo una centrifugación breve para recoger cualquier posible condensado y se mantuvieron los tubos en hielo. Seguidamente, se añadió a cada muestra  $1\text{ }\mu\text{l}$  de *First Strand Buffer* 10X,  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  de inhibidor de ribonucleasas,  $2\text{ }\mu\text{l}$  de dNTPs y  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  de transcriptasa reversa. Los tubos se incubaron durante 2 h a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un termociclador, se volvieron a centrifugar brevemente para recoger posibles condensados y se dejaron en hielo. A continuación, se sintetizó la segunda hebra del cDNA. A cada muestra se le añadieron  $5\text{ }\mu\text{l}$  de *Second Strand Buffer* 10X,  $2\text{ }\mu\text{l}$  de dNTPs,  $1\text{ }\mu\text{l}$  de DNA polimesasa,  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  de RNasa H y  $31,5\text{ }\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas y se incubó 2 h a  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un termociclador. Finalmente, el cDNA se purificó utilizando el kit *DNA clear* de Ambion. Tras la purificación del

## Materiales y métodos

cDNA, se realizó una transcripción *in vitro* incorporando el nucleótido modificado 5-(3-*aminoallyl*)-UTP (Ambion), obteniendo así el aa-RNA. Para ello se añadió a cada muestra de cDNA (aproximadamente 7 µl) 1,5 µl de solución aaUTP 50 mM, 6 µl de ATP, CTP, GTP mix 25 mM, 1,5 µl de solución UTP 50 mM, 2 µl de *Reaction Buffer 10X* y 2 µl de *T7 enzyme mix*. La mezcla se incubó a 37 °C alrededor de 14 h. Finalmente, se añadió 80 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de aproximadamente 100 µl, se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se efectuó otra purificación empleando el kit *MegaClear* de Ambion.

### 7.2.2. Acoplamiento con los fluoróforos

Una vez purificado el aa-RNA, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento con los fluoróforos Cy3 y Cy5 (*N-hydroxyl succinimidyl dyes*) de GE Healthcare. En 2 de las 4 réplicas de cada experimento, se empleó el fluoróforo Cy3 para las muestras control y el Cy5 para las muestras correspondientes a los tratamientos con bioestimulante. En las otras 2 réplicas se marcó de forma contraria, para eliminar la variabilidad debida a la mayor o menor hibridación de los fluoróforos. Para realizar el marcaje, 7,5 µg de aa-RNA se desecaron en la centrífuga *SpeedVac*, se disolvieron en 10 µl de *Coupling Buffer* y posteriormente se mezclaron con 18 µl del fluoróforo apropiado disuelto en DMSO. La reacción de acoplamiento transcurrió durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, el aa-RNA acoplado al fluoróforo se purificó usando de nuevo el kit *MegaClear* y se cuantificó la fluorescencia mediante el espectrofotómetro ND-1000. Finalmente, se mezclaron 30 pmol de cada aa-RNA (muestra de tratamiento y muestra control) marcado con su correspondiente fluoróforo y se desecó en una centrífuga de vacío *SpeedVac* hasta quedar un volumen de aproximadamente 5 µl.

### 7.3. Preparación de las micromatrices para la hibridación

Previamente a su uso, los cristales deben ser rehidratados, empleando vapor de agua a 60 °C durante 5 s, y secándose en un termobloque a 65 °C durante otros 5 s. Este proceso se realizó 3 veces consecutivas. Tras la hidratación, el DNA de las micromatrices se fijó exponiendo los cristales a 65 mJ empleando el *UV cross-linker* (Stratagene). A continuación, los cristales se lavaron dos veces con una solución de 0,1 % SDS y cuatro veces con agua. Cada lavado duró 2 min. Finalmente, se introdujo el cristal en etanol absoluto durante 30 s, y se secó por centrifugación a 2000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente.

### 7.4. Prehibridación e hibridación de las micromatrices

Los cristales se prehibridaron 30-45 min a 42 °C con 50 ml de solución de prehibridación (SSC 3X, 0,01 % BSA y 0,1 % SDS) en un tubo de 50 ml. Transcurrido ese tiempo, los cristales se lavaron a temperatura ambiente, 2 veces con agua (lavados de 1 min cada uno) y una vez en propanol (20 s), y se secaron por centrifugación a 2000 rpm durante 5 min. Inmediatamente después se realizó la hibridación. Para ello cada micromatriz se cubrió con una cubierta 60x22 mm *LifterSlip* (Erie Scientific) y se utilizó una cámara de hibridación de micromatrices (*ArrayIt Hybridization Cassete*, TeleChem).

Al aa-RNA marcado (sonda) se le añadió la mezcla de hibridación, que consta de 50 µl de formamida desionizada, 30 µl de SSC 20X, 5 µl de SDS 10 % y 5 µl de solución *Denhardt's 100X* (BSA 20 g/l, Ficoll®400 20 g/l, polivinilpirrolidona 20 g/l), una mezcla de polímeros de elevado

peso molecular capaces de saturar los lugares de hibridación no específica y así aumentar artificialmente la concentración de sonda disponible. La mezcla de hibridación se desnaturalizó a 95 °C durante 5 min y se aplicó al cristal. Los cristales se incubaron a 37 °C en un baño de agua durante 16 h en la cámara de hibridación.

#### 7.5. Lavado y escaneado de las micromatrices

Finalizada la hibridación, los cristales se lavaron en agitación del siguiente modo: el primer lavado se realizó con SSC 1X y SDS 0,1 % a 30 °C (5 min), el segundo con SSC 0,2X y SDS 0,1 % a 30 °C (5 min), el tercero y el cuarto con SSC 0,1X a 28 °C (2 min) y finalmente con SSC 0,01X durante 2 min a 28 °C. Los cristales se secaron por centrifugación a 2000 rpm durante 7 min a temperatura ambiente.

Las micromatrices hibridadas se escanearon a 532 nm para el fluoróforo Cy3 y a 635 nm para el fluoróforo Cy5, usando el escáner Genepix 4000B (Axon Molecular Devices) a una resolución de 10 µm. Se ajustó manualmente la intensidad de señal para cada canal, con el propósito de incrementar la diferencia entre el fondo y la señal de cada punto, así como para reducir el número de puntos saturados.

#### 7.6. Preprocesamiento de los datos con Genepix

Mediante el programa *GenePix 4.1 microarray-analysis* (Axon Molecular Devices) se cuantificó la intensidad de cada punto, se realizó una primera normalización de los datos (basada en que el cociente rojo/verde sea igual a 1) y se analizaron las imágenes. Tras este análisis, los puntos con manchas, saturados en ambos canales, o con una intensidad en alguno de los dos canales menor del doble de la intensidad del fondo en ese canal, se eliminaron.

#### 7.7. Procesamiento de los datos con Accuity y análisis estadístico

Mediante el programa Accuity, se realizó una nueva normalización de los datos mediante el método LOWESS (*Locally Weighted Scatter plot Smoother*). Asimismo, se eliminaron aquellos puntos que no estuviesen representados en al menos 3 de las 4 réplicas y se invirtió el cociente en las 2 réplicas cuyo marcaje se realizó con los fluoróforos invertidos.

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SAM (*Significant Analysis of Microarrays*) (Tusher *et al.*, 2000), que permite determinar aquellos genes cuyo nivel de inducción o represión es estadísticamente significativo (se consideró un error máximo del 12,6 % en el caso del Amino22 y del 9,8 % en el del Fulvato potásico). Como genes diferencialmente expresados en el tratamiento con Amino22 se consideraron aquellos genes más de 1,4 veces inducidos o reprimidos respecto al control, mientras que en el caso del Fulvato potásico se consideraron aquellos genes inducidos o reprimidos más de 1,5 veces respecto al control.

## 8. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

A partir de cDNA obtenido como se ha explicado anteriormente, los experimentos de qRT-PCR se llevaron a cabo en placas multipocillo (Applied Biosystems) añadiendo los siguientes componentes:

- 1  $\mu$ l de cDNA
- 1  $\mu$ l de cebador sentido 10  $\mu$ M
- 1  $\mu$ l de cebador antisentido 10  $\mu$ M
- 4  $\mu$ l de Polimerasa 5X *PyroTaq Evagreen qPCR Mix Plus (ROX)* (Cultek Molecular Biotek)
- Volumen final de 20  $\mu$ l con agua MilliQ estéril

En la Tabla A.1 del Anexo I se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de qRT-PCR. Las reacciones se realizaron en un termociclador 7500 *Fast Real-Time* (Applied Biosystems) con el siguiente programa:

- 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min
- 40 ciclos:
  - 15 s de desnaturalización a 95°C
  - 30 s de hibridación de los cebadores a 55°C
  - 30 s de extensión a 72°C
- Ciclo final de desnaturalización-renaturalización

La especificidad de la amplificación por PCR se comprobó mediante una curva de disociación (de 60°C a 95°C), además se calculó la eficiencia de la PCR y se utilizó *UBC6* como el gen de referencia (Teste *et al.*, 2009). La abundancia relativa de mRNA fue calculada usando el método *comparative threshold cycle* (Pfaffl, 2001).

## 9. Determinación del contenido total en hierro

Se recogieron 150 ml de células crecidas hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ) en medio SD y se lavaron dos veces con 50 mM Tris-HCl, pH 6,5, 10 mM EDTA. Los pellets fueron digeridos con 1 ml de una mezcla de ácido nítrico y ácido perclórico en una proporción 5:2 a 80 °C durante 1 h (Li y Kaplan, 1998). Después de la digestión, las muestras se diluyeron hasta un volumen de 4 ml con agua MilliQ, se filtraron y se analizó el Fe en solución con un espectrofotómetro de absorción atómica GBC SensAA (GBC Scientific Equipment Pty Ltd). Las mediciones en el espectrofotómetro de absorción atómica se realizaron con una lámpara de cátodo hueco para hierro (SMI-LabHut Ltd.). Para determinar la concentración precisa de hierro en cada muestra se construyó una recta de calibrado utilizando patrones de  $Fe_2SO_4$  de 0, 0,6, 1, 1,5, 2 y 5  $\mu$ g/ml. Todas las muestras se midieron por triplicado.

## 10. Localización subcelular de Aft1-GFP

La localización intracelular de Aft1 se determinó mediante microscopía de fluorescencia de la proteína unida a GFP (Crisp *et al.*, 2003; Kumanovics *et al.*, 2008). Los cultivos de levadura fueron crecidos durante toda la noche hasta alcanzar la fase estacionaria en medio SD con bajo hierro (20  $\mu$ M BPS) y se colocaron en un portaobjetos para microscopía. La microscopía de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio Leica DM5000 B (Leica Microsystems) con un filtro de GFP. Las imágenes se procesaron usando el *software* NIS elements F (Nikon). Posteriormente se cuantificó el número de células con localización nuclear de Aft1-GFP. Se realizaron dos experimentos independientes y, en cada experimento, se examinaron 7 campos por condición, tras lo que se determinó el porcentaje de células con fluorescencia nuclear. Se contaron más de 200 células por condición.

## 11. Análisis estadísticos

A menos que se especifique lo contrario, los resultados expuestos en esta tesis corresponden a un mínimo de tres experimentos independientes (o repeticiones biológicas) y las barras de error representan el error estándar. Para determinar las diferencias significativas en los resultados de los diferentes ensayos realizados se llevaron a cabo pruebas estadísticas mediante el *software* de análisis de datos Statgraphics Centurion. En aquellos experimentos en los que se comparan únicamente dos grupos de datos se utilizó la prueba estadística *t* de Student para datos independientes. Para comparar varios tratamientos (o mutantes) frente al mismo control (o cepa silvestre) se realizó un test ANOVA de un solo factor y se aplicó el procedimiento LSD de Fisher en la prueba de rango múltiple. Para realizar comparaciones múltiples entre varios tratamientos y respecto a su control se realizó un test ANOVA de un solo factor aplicando en la prueba de rango múltiple el procedimiento HSD de Tukey.



## RESULTADOS



## 1. Evaluación preliminar del crecimiento de la levadura en presencia de los bioestimulantes y establecimiento de las condiciones ideales de estudio

La empresa Fertinagro Nutrientes S.L. proporcionó a nuestro laboratorio soluciones concentradas de 6 bioestimulantes de fertilizantes para el estudio de sus efectos sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés abiótico, manteniendo la confidencialidad sobre la composición química de los mismos. No obstante, como orientación, se nos aconsejó emplearlos en torno a una dilución 1:1000. En los primeros análisis de crecimiento de la levadura, los bioestimulantes se añadieron a medio de cultivo rico YPD. Asimismo, se decidió estudiar el crecimiento bajo condiciones de estrés abiótico empleando NaCl, para el estrés salino, y sorbitol, para el estrés osmótico, añadiendo diferentes concentraciones de ambos compuestos al medio de cultivo con el objetivo de seleccionar aquellas que evidenciasen con mayor claridad los efectos de los bioestimulantes.

La cepa de levadura de referencia en esta tesis es la BY4741, empleada en la mayoría de experimentos como levadura control. Se trata de una cepa robusta y de crecimiento relativamente rápido. Los parámetros de crecimiento valorados son la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial y el rendimiento de los cultivos en la fase estacionaria tras la diauxia, los cuales se obtuvieron mediante el analizador Bioscreen C. La segunda fase de crecimiento de la levadura no se puede monitorizar mediante este analizador, ya que al llegar a este punto, las células de levadura forman agregados en los pocillos de las placas empleadas e impiden que el cultivo siga creciendo normalmente y, por tanto, que se pueda continuar registrando de manera correcta su crecimiento. Así pues, se consideró que el rendimiento final de los cultivos en la fase estacionaria coincide con la densidad óptica en el rango 420-580 nm alcanzada después de 96 horas de cultivo. La fase *lag* o de latencia, que se corresponde con el tiempo de retraso en comenzar el crecimiento, no se tuvo en cuenta debido a que la adición de los bioestimulantes prácticamente no producía cambios en dicho parámetro (datos no mostrados).

### 1.1. Estudio preliminar de los efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento de la levadura en medio YPD

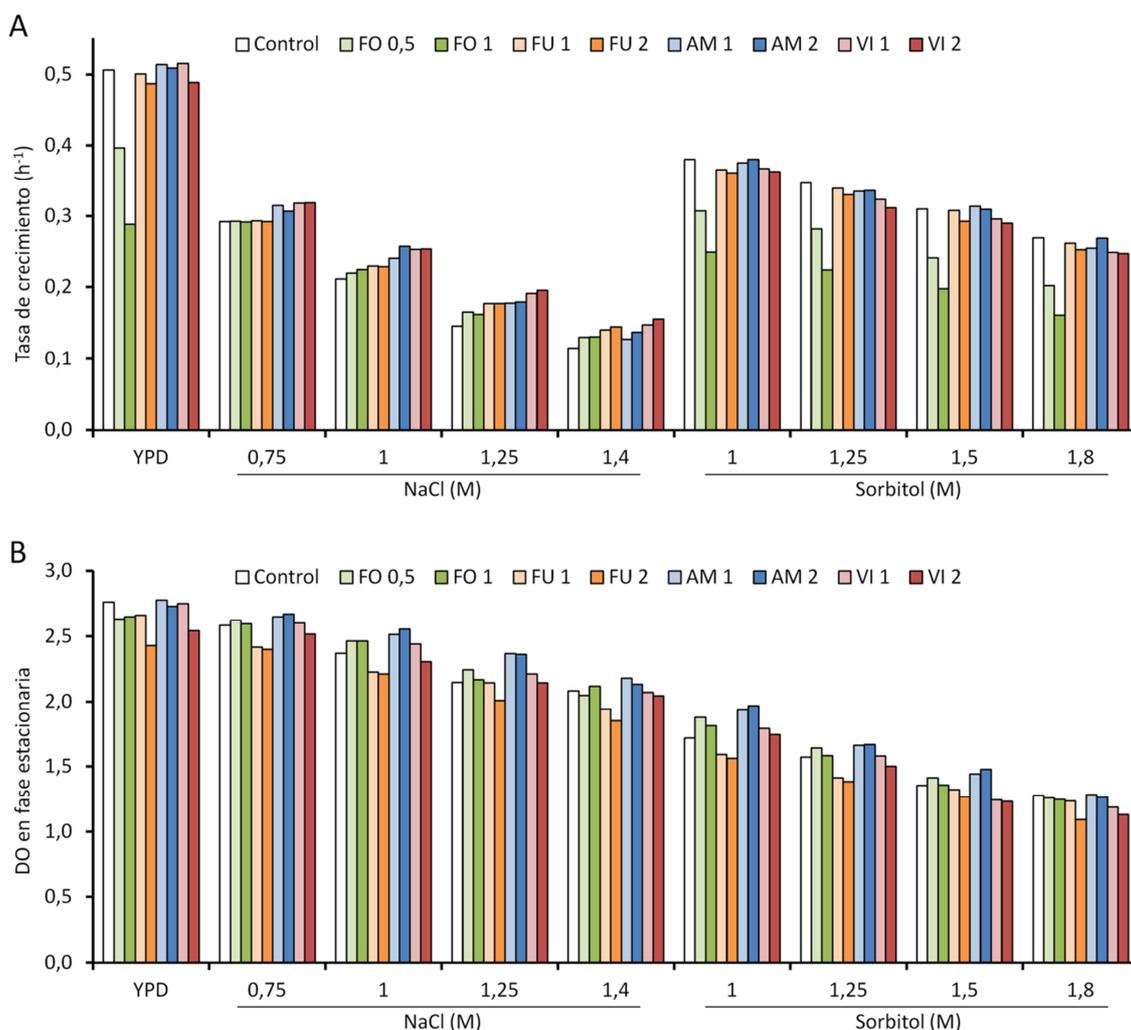
En el primer análisis del crecimiento de la levadura control en medio YPD bajo distintas condiciones de estrés salino y osmótico se evaluaron únicamente cuatro de los bioestimulantes (Fosfito, Fulvato potásico, Amino22 y Vinacillas) debido a que solo estos se encontraban disponibles en el laboratorio cuando se inició la investigación. Cada uno de ellos se añadió en dos concentraciones diferentes, las cuales se escogieron siguiendo las recomendaciones de la empresa y de acuerdo con pruebas realizadas previamente. Es necesario explicar que en este primer ensayo se realizó únicamente una “repetición biológica” de cada condición, ya que consistía en un análisis preliminar para encontrar las condiciones óptimas que nos permitiesen llevar a cabo un análisis posterior más exhaustivo sobre la posible capacidad de los bioestimulantes para mejorar el crecimiento y tolerancia a estrés. Pese a ser un experimento realizado una sola vez, al tratarse de una serie de varias concentraciones, los valores se apoyan unos a otros y el resultado puede considerarse representativo. Además en el Bioscreen C cada valor representa la media de tres repeticiones

## Resultados

técnicas del mismo cultivo. Los datos de la tasa de crecimiento y rendimiento de los cultivos se muestran en la Figura R.1 (A y B, respectivamente).

### Fosfito

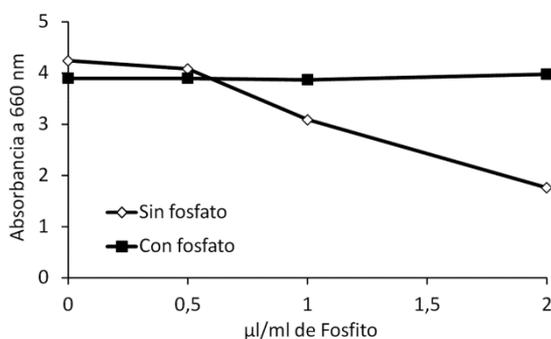
En ausencia de estrés (YPD), el Fosfito provocó una inhibición en la tasa de crecimiento de un 22 % respecto al control (sin bioestimulante) cuando se añadió a una concentración de 0,5  $\mu\text{l/ml}$  de medio y un 43 % cuando se añadió a 1  $\mu\text{l/ml}$ . Esta inhibición se pudo contrarrestar suplementando el medio con fosfato (Figura R.2). Respecto al rendimiento final de los cultivos, se observó una disminución del 5 % con ambas concentraciones de bioestimulante.



**Figura R.1. Efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio YPD.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de los cultivos crecidos en medio YPD con diferentes concentraciones de NaCl y sorbitol y suplementados con distintas concentraciones de los bioestimulantes Fosfito (FO), Fulvato potásico (FU), Amino22 (AM) y Vinacillas (VI), indicadas en  $\mu\text{l}$  de concentrado por ml. Los valores corresponden a un solo experimento.

En presencia de NaCl no solo no se observó inhibición en la velocidad de crecimiento, si no que con concentraciones de 1, 1,25 y 1,4 M de NaCl se produjo un incremento de la misma que llega hasta alrededor del 13 % en medio de cultivo con 1,25 y 1,4 M de NaCl, tanto con 0,5 como con 1  $\mu\text{l/ml}$  de Fosfito. En condiciones de estrés osmótico tuvo lugar una inhibición de la

tasa de crecimiento muy similar a la que se produjo sin estrés, aunque en el rendimiento se vio un incremento sutil, más evidente con 1 M de sorbitol, pero que fue desapareciendo a medida que se aumentó la concentración del agente osmótico.



**Figura R.2. La inhibición del crecimiento causada por el Fosfito se contrarresta añadiendo fosfato al medio de cultivo.** Se midió la absorbanza a 660 nm de cultivos de levadura crecidos durante toda la noche en medio YPD con diferentes concentraciones de Fosfito y sin fosfato añadido (sin fosfato) o añadiendo 20 mM de fosfato (con fosfato). Los valores corresponden a un solo experimento.

### *Fulvato potásico*

El tratamiento con Fulvato potásico no resultó en cambios remarcables en la tasa de crecimiento de los cultivos crecidos en ausencia de estrés o con estrés osmótico, más allá de un pequeño descenso, que en ningún caso superó el 6 %, cuando se usó a una concentración de 2 µl/ml. Sin embargo, en presencia de NaCl en concentraciones de 1 M o mayores, el Fulvato aumentó la tasa de crecimiento respecto al control (hasta más de un 20 % con NaCl 1,25 y 1,4 M). Los cultivos tratados con Fulvato potásico tuvieron rendimientos menores a los del control, tanto en ausencia como en presencia de estrés, algo que se percibe especialmente con la concentración más alta del bioestimulante (2 µl/ml).

### *Amino22*

Las células tratadas con Amino22 y crecidas en ausencia de estrés prácticamente no presentaron diferencias en la velocidad de crecimiento ni en el rendimiento respecto al control. Sin embargo, también en este caso, el Amino22 produjo una mejora de la tolerancia en condiciones de estrés salino, incrementando el rendimiento final de los cultivos (en torno al 10 % con NaCl 1 y 1,25 M) además de la tasa de crecimiento (hasta un 22 % con NaCl 1 y 1,25 M), no apreciándose diferencias consistentes entre las dos dosis de bioestimulante estudiadas (1 y 2 µl/ml). Bajo condiciones de estrés osmótico se apreció un aumento del rendimiento en los cultivos tratados con Amino22, especialmente con sorbitol 1 M, condición en la que subió aproximadamente un 13 %.

### *Vinacillas*

El Vinacillas no modificó la tasa de crecimiento en ausencia de estrés, a diferencia de lo que ocurrió bajo estrés salino, donde produjo un sensible aumento con las diferentes concentraciones de NaCl aplicadas (un 9 % con 0,75 M, un 20 % con 1 M y en torno al 30 % con 1,25 y 1,4 M), no existiendo diferencias considerables entre las dos dosis estudiadas (1 y 2 µl/ml). Por el contrario, en condiciones de estrés osmótico, la velocidad de crecimiento disminuyó levemente. En el rendimiento de los cultivos crecidos con o sin estrés, la dosis baja

## Resultados

de bioestimulante (1  $\mu\text{l/ml}$ ) no provocó apenas cambios respecto al control, mientras que la dosis alta (2  $\mu\text{l/ml}$ ) tendió a dar rendimientos algo menores.

### 1.2. Estudio preliminar de los efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento de la levadura en medio SD

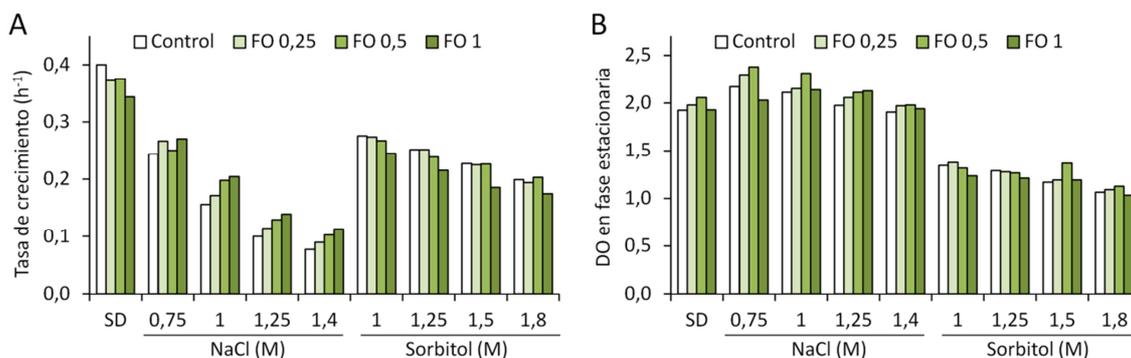
Los resultados en medio YPD mostraron escasos efectos positivos de los bioestimulantes sobre el crecimiento de la levadura, exceptuando el incremento, en mayor o menor medida, de la velocidad de crecimiento bajo condiciones de estrés salino. Por tanto, se valoró la posibilidad de que gran parte de los posibles efectos protectores frente a estrés abiótico o de mejora del crecimiento se estuviesen viendo enmascarados por el hecho de realizar los cultivos en un medio rico en nutrientes. Por ejemplo, cabría esperar una importante mejora del crecimiento en presencia de los aminoácidos que aporta el aditivo Amino22, a menos que el propio medio ya contenga este tipo de nutrientes en exceso y la presencia del bioestimulante no suponga un beneficio. De hecho, la peptona y el extracto de levadura utilizados para preparar el medio YPD contienen aminoácidos en abundancia. Así pues, a partir de este momento, se decidió emplear medio mínimo SD para el cultivo de la levadura, el cual contiene sulfato amónico como fuente de nitrógeno y es mucho más pobre en nutrientes que el YPD.

Para evaluar el efecto de cada bioestimulante sobre el crecimiento de la levadura en medio SD y determinar las concentraciones de uso óptimas, se crecieron células de levadura en presencia de 3 concentraciones distintas de bioestimulante. Dichas concentraciones son de 0,5, 1, y 2  $\mu\text{l/ml}$ , a excepción del Fosfito para el que se usaron 0,25, 0,5 y 1  $\mu\text{l/ml}$ , ya que se había observado que en medio YPD tiene un efecto inhibitorio sobre la tasa de crecimiento. Además, de igual modo que en el anterior apartado, se cultivaron en ausencia de estrés y bajo estrés salino y osmótico y se realizó únicamente un experimento para cada condición.

#### *Fosfito*

En medio mínimo, el Fosfito también inhibió la tasa de crecimiento en ausencia de estrés, aunque en menor proporción que en YPD (Figura R.3A). Es destacable que concentraciones de 0,25 y 0,5  $\mu\text{l/ml}$  del compuesto produjeron prácticamente la misma reducción de la velocidad de crecimiento (un 6 %), mientras que la concentración de 1  $\mu\text{l/ml}$  resultó inhibirla más del doble (un 14 %). Por otra parte, tuvo lugar un aumento de la velocidad de crecimiento en condiciones de estrés salino, el cual que se acentuó cuanto mayor fue la concentración de Fosfito empleada. Concretamente, con 0,5  $\mu\text{l/ml}$  de Fosfito, la velocidad de crecimiento subió aproximadamente un 30 % en medio con NaCl 1, 1,25 y 1,4 M, mientras que con 1  $\mu\text{l/ml}$  el incremento fue ligeramente mayor. La concentración de 0,5  $\mu\text{l/ml}$  de Fosfito mejoró el rendimiento en presencia de NaCl, proporcionando un aumento respecto al control que llegó al 10 % con 0,75 y 1 M (Figura R.3B). Bajo estrés osmótico, las concentraciones de 0,25 y 0,5  $\mu\text{l/ml}$  no produjeron apenas inhibición de la velocidad de crecimiento, en cambio la concentración más alta de Fosfito lo hizo de forma considerable (en torno a un 14 % con las diferentes concentraciones de sorbitol). En el rendimiento de los cultivos no se observaron diferencias reseñables, más allá de un incremento aislado en presencia de sorbitol 1,5 M y 0,5  $\mu\text{l/ml}$  de Fosfito, lo que indica que probablemente se trate de un producto de la variabilidad y no de un aumento significativo.

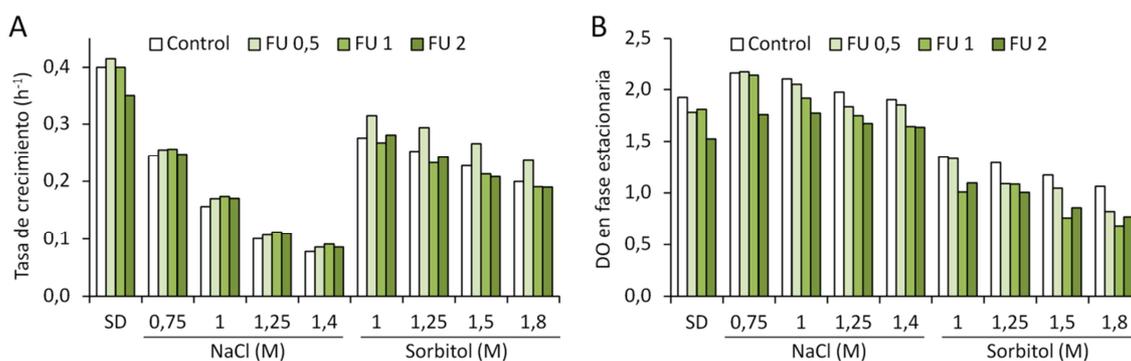
Considerando que una concentración de 0,5  $\mu\text{l/ml}$  de Fosfito dio los mejores resultados sobre el rendimiento de los cultivos con estrés salino, que bajo dicho estrés incrementó considerablemente la velocidad de crecimiento (alcanzando valores cercanos a los conseguidos con 1  $\mu\text{l/ml}$ ) y que, además, el efecto inhibitorio en ausencia de estrés y con estrés osmótico sobre la mencionada tasa de crecimiento fue el mínimo teniendo en cuenta las 3 concentraciones estudiadas, se eligió 0,5  $\mu\text{l/ml}$  como la concentración óptima de uso del Fosfito.



**Figura R.3. Efecto del Fosfito sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de los cultivos crecidos en medio SD con las concentraciones indicadas de NaCl y sorbitol y suplementados con 0,25, 0,5 y 1  $\mu\text{l}$  de Fosfito (FO) por ml. Los valores corresponden a un solo experimento.

#### *Fulvato potásico*

En la Figura R.4 se muestra el efecto del Fulvato potásico sobre el crecimiento de la levadura en medio SD.



**Figura R.4. Efecto del Fulvato potásico sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de los cultivos crecidos en medio SD con las concentraciones indicadas de NaCl y sorbitol y suplementados con 0,5, 1 y 2  $\mu\text{l}$  de Fulvato potásico (FU) por ml. Los valores corresponden a un solo experimento.

En ausencia de estrés, la concentración de 2  $\mu\text{l/ml}$  resultó inhibir la tasa de crecimiento y el rendimiento un 13 y un 21 %, respectivamente. Concentraciones menores del bioestimulante no afectaron prácticamente a la velocidad de crecimiento, pero sí produjeron un descenso del 6 % en el rendimiento. Las tres concentraciones de bioestimulante parecieron mejorar ligeramente la velocidad de crecimiento con estrés salino, con aumentos que están alrededor

## Resultados

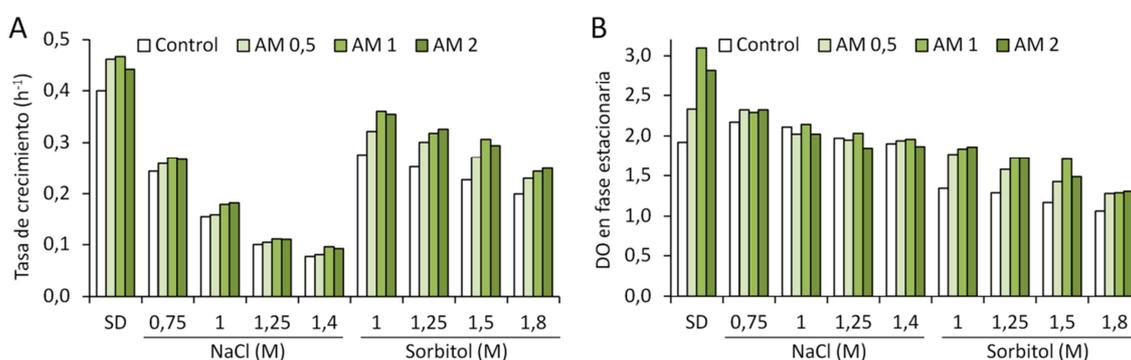
del 10 % en presencia de NaCl 1, 1,25 y 1,4 M. Sin embargo, concentraciones de 1 y 2  $\mu\text{l/ml}$  resultaron en rendimientos menores. En presencia de sorbitol, el Fulvato potásico en una concentración de 0,5  $\mu\text{l/ml}$  dio un aumento en la velocidad de crecimiento que ronda el 15 % en las distintas condiciones de estrés osmótico estudiadas, no obstante también produjo una reducción en el rendimiento en algunas de ellas.

Se determinó la concentración de 0,5  $\mu\text{l/ml}$  como la adecuada para el empleo del Fulvato potásico, puesto que es la que permitió una mejora de la velocidad de crecimiento en condiciones de estrés osmótico y la que tuvo, además, menor efecto inhibitorio sobre el rendimiento de los cultivos.

### Amino22

El Amino22 dio los resultados más prometedores en cuanto a la mejora del crecimiento tanto con estrés como sin él y estos se exponen en la Figura R.5. A diferencia de lo que ocurrió en medio YPD, en SD las tres concentraciones de bioestimulante mejoraron de forma clara la velocidad de crecimiento y el rendimiento de los cultivos en ausencia de estrés, aunque destaca la concentración intermedia (1  $\mu\text{l/ml}$ ), con la que dichos parámetros se vieron incrementados un 17 y un 61 % respectivamente. Esta concentración de Amino22 también mejoró la tasa de crecimiento (un 31 %) y el rendimiento (un 37 %) con sorbitol 1 M. En condiciones de estrés salino las concentraciones de 1 y 2  $\mu\text{l/ml}$  aumentaron levemente la tasa de crecimiento (hasta un 10 % con NaCl 1 M).

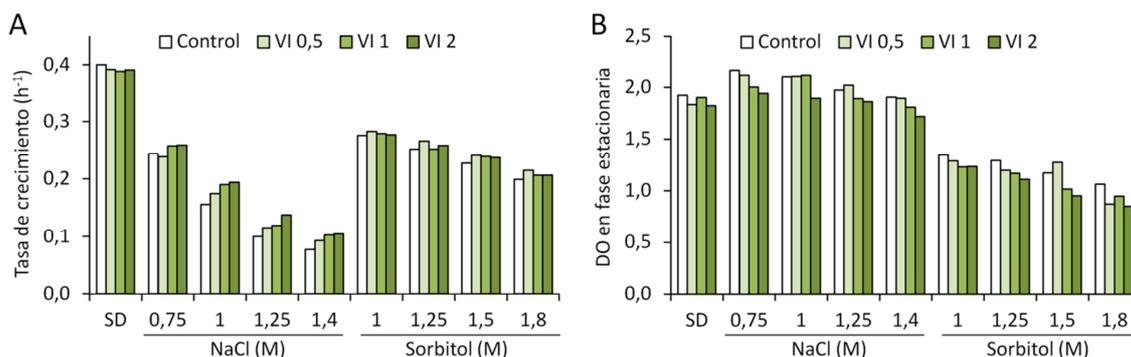
En este caso, se tomó 1  $\mu\text{l/ml}$  como concentración de uso del Amino22.



**Figura R.5. Efecto del Amino22 sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de los cultivos crecidos en medio SD con las concentraciones indicadas de NaCl y sorbitol y suplementados con 0,5, 1 y 2  $\mu\text{l}$  de Amino22 (AM) por ml. Los valores corresponden a un solo experimento.

### Vinacillas

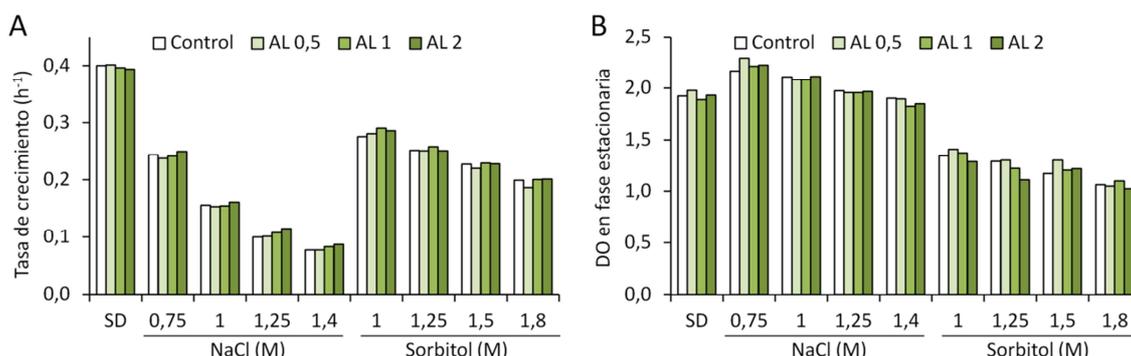
El Vinacillas mejoró la tasa de crecimiento de la levadura en presencia de estrés salino, en concreto, las concentraciones de 1 y 2  $\mu\text{l/ml}$  lo hicieron un 22 y un 25 % con NaCl 1 M y un 33 y un 36 % con NaCl 1,4 M, respectivamente (Figura R.6). Sin embargo, este bioestimulante pareció reducir el rendimiento de los cultivos, especialmente la concentración de 2  $\mu\text{l/ml}$ . Por ello, se decidió que la concentración óptima de empleo es 1  $\mu\text{l/ml}$ .



**Figura R.6. Efecto del Vinacillas sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de los cultivos crecidos en medio SD con las concentraciones indicadas de NaCl y sorbitol y suplementados con 0,5, 1 y 2  $\mu$ l de Vinacillas (VI) por ml. Los valores corresponden a un solo experimento.

### Extracto de algas

El extracto de algas prácticamente no modificó el crecimiento de la levadura en las condiciones estudiadas (Figura R.7). Tan solo se observó un incremento del 15 % respecto al control en la tasa de crecimiento con NaCl 1,25 y 1,4 M en presencia de 2  $\mu$ l/ml de bioestimulante, por lo que se utilizó esta concentración en los experimentos posteriores.

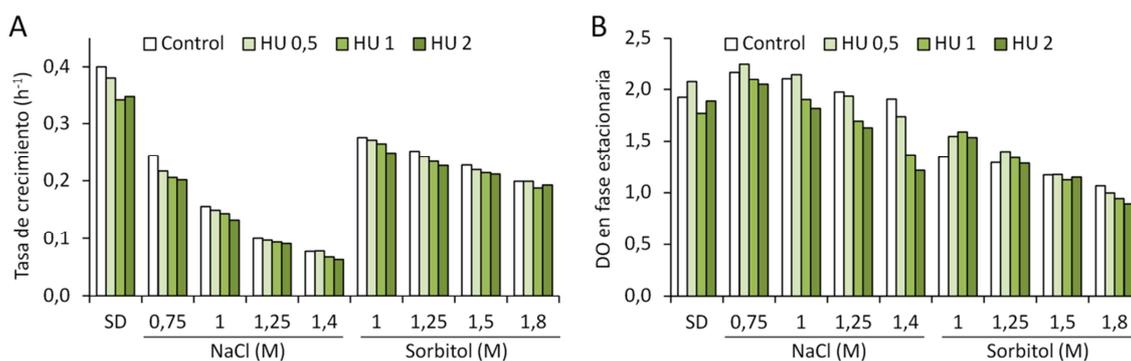


**Figura R.7. Efecto del Extracto de algas sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de los cultivos crecidos en medio SD con las concentraciones indicadas de NaCl y sorbitol y suplementados con 0,5, 1 y 2  $\mu$ l de Extracto de algas (AL) por ml. Los valores corresponden a un solo experimento.

### Ácido húmico

El Ácido húmico mostró un efecto inhibitorio dependiente de dosis sobre la tasa de crecimiento de la levadura tanto en presencia de estrés como en ausencia de éste (Figura R.8). Asimismo, se observó una reducción progresiva en el rendimiento de los cultivos a medida que aumentó la dosis de bioestimulante. Como efecto positivo sobre el crecimiento, tan solo se observó un incremento del rendimiento con sorbitol 1 M (en torno al 15 %) que se produce con las tres concentraciones estudiadas. Así pues, por ser la que menos inhibió el crecimiento, se seleccionó 0,5  $\mu$ l/ml como la concentración de uso para el Ácido húmico.

## Resultados



**Figura R.8. Efecto del Ácido húmico sobre el crecimiento de cultivos de levadura en medio SD.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de los cultivos crecidos en medio SD con las concentraciones indicadas de NaCl y sorbitol y suplementados con 0,5, 0,1 y 2  $\mu$ l de Ácido húmico (HU) por ml. Los valores corresponden a un solo experimento.

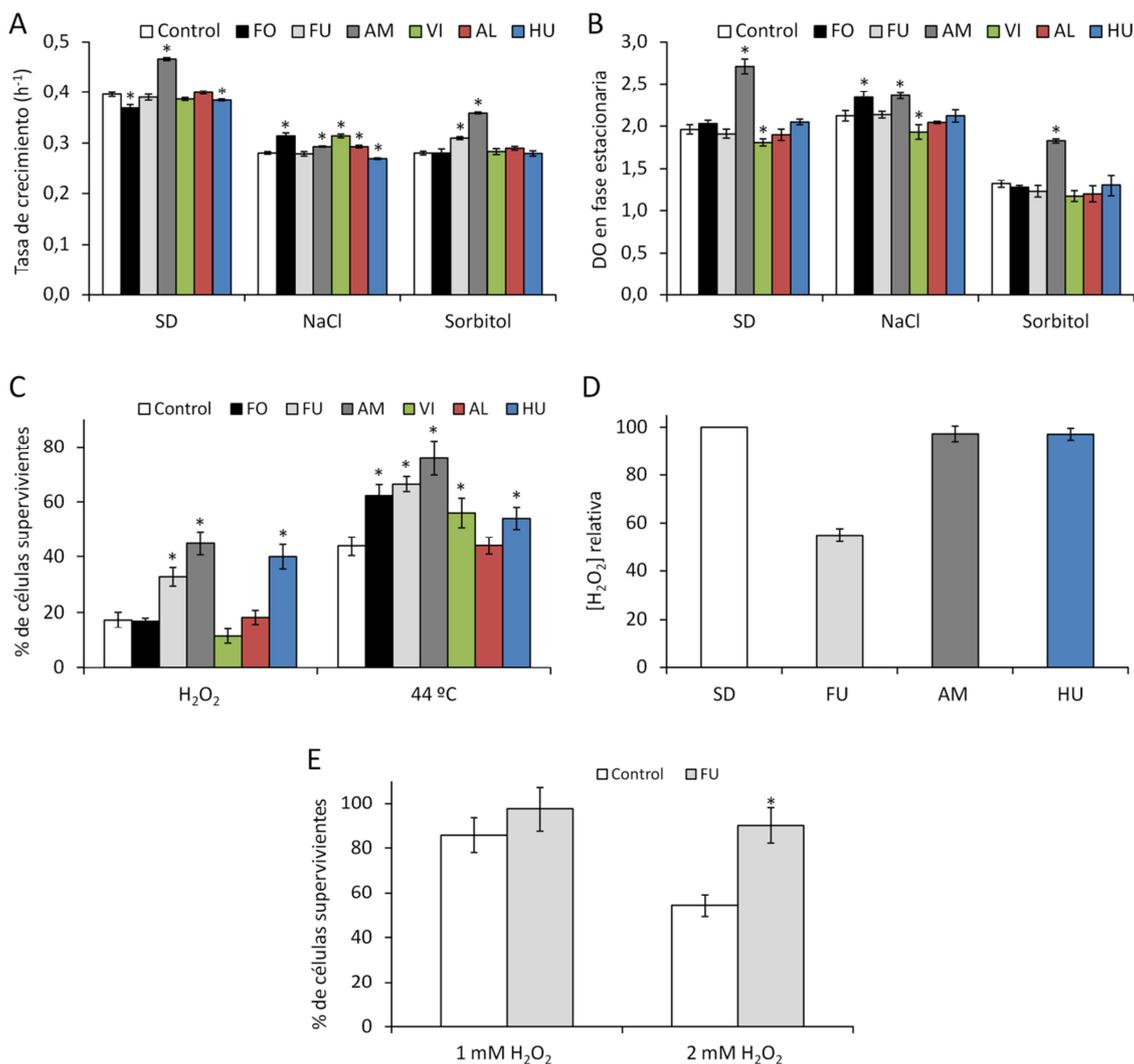
## 2. Efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés abiótico de la levadura

Una vez analizadas las pruebas iniciales de crecimiento en ausencia y presencia de estrés, se procedió a repetir los experimentos con las condiciones acotadas (dosis óptima de bioestimulante y concentraciones adecuadas de NaCl y sorbitol) para obtener datos consistentes y con validez estadística acerca del efecto de los bioestimulantes. Se estimó que una concentración de 1 M tanto de NaCl como de sorbitol podría evidenciar con claridad las posibles diferencias entre los tratamientos con los bioestimulantes y el control. No obstante, también se consideró de interés comparar el efecto de los bioestimulantes sobre los estreses salino y osmótico a partir de concentraciones de NaCl y sorbitol que ejerciesen la misma presión osmótica y de este modo poder discernir, en el caso del estrés salino, si un bioestimulante proporciona tolerancia frente a la toxicidad del Na o frente a un aumento de la presión osmótica. Por lo tanto, en primer lugar se empleó para el estrés osmótico una concentración de 1 M de sorbitol y para el salino su concentración osmótica equivalente de 0,64 M de NaCl (Wolf *et al.*, 1980). En cuanto a las concentraciones de uso óptimas de los bioestimulantes, que son las que se emplearon en los restantes experimentos de la tesis, se recapitulan a continuación (en  $\mu$ l de concentrado del bioestimulante por ml de medio de cultivo):

- Fosfito: 0,5  $\mu$ l/ml
- Fulvato potásico: 0,5  $\mu$ l/ml
- Amino22: 1  $\mu$ l/ml
- Vinacillas: 1  $\mu$ l/ml
- Extracto de algas: 2  $\mu$ l/ml
- Ácido húmico: 0,5  $\mu$ l/ml

Tal y como se muestra en la figura R.9 (A y B), solo un bioestimulante, el Amino22, resultó beneficioso para el crecimiento en ausencia de estrés, aumentando un 18 % la tasa de crecimiento y un 38 % el rendimiento final de los cultivos en comparación con el control. Por otro lado, el Fosfito y el Ácido húmico inhibieron la tasa de crecimiento un 7 y un 3 %,

respectivamente, y el tratamiento con Vinacillas provocó un descenso del 8 % en el rendimiento.



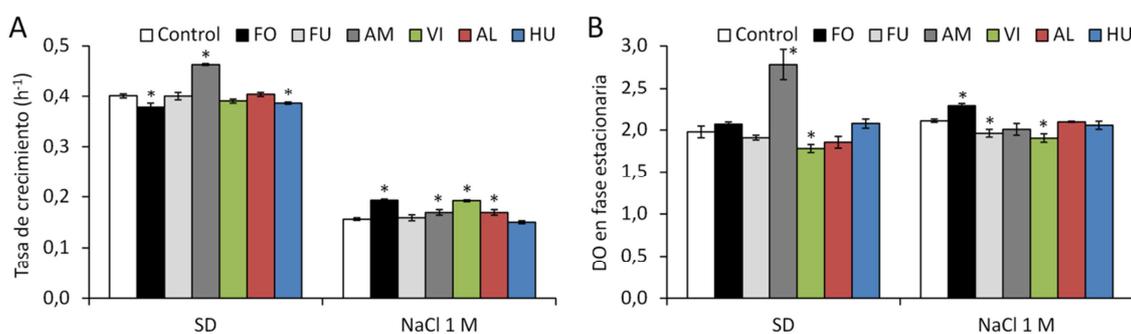
**Figura R.9. Efecto de los bioestimulantes sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de los cultivos crecidos en medio SD suplementado con las concentraciones seleccionadas de los distintos bioestimulantes en ausencia de estrés y en presencia de 0,64 M de NaCl y 1 M de sorbitol. C) Células crecidas en medio SD suplementado con los bioestimulantes hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ) se incubaron durante 30 min en los mismos medios con  $H_2O_2$  (2 mM) o a 44 °C, tras lo cual se determinó la supervivencia. D) Concentración relativa de  $H_2O_2$  tras una incubación de 1 h en medio SD en presencia de FU, AM y HU. Se partió de una concentración de  $H_2O_2$  de 2 mM. E) Células crecidas en medio SD en presencia o ausencia de FU hasta la mitad de la fase exponencial se lavaron con agua MilliQ y se resuspendieron en medio SD fresco (sin FU en ningún caso), tras lo cual se incubaron durante 30 min con distintas concentraciones de  $H_2O_2$  y se evaluó la supervivencia. Leyenda: FO (Fosfito), FU (Fulvato potásico), AM (Amino22), VI (Vinacillas), AL (Extracto de algas) y HU (Ácido húmico). \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ).

En presencia de NaCl (0,64 M), el Fosfito aumentó un 12 % la velocidad de crecimiento y un 10 % el rendimiento, mientras que el Amino22 también lo hizo un 4 y un 11 %, respectivamente. El Vinacillas provocó un incremento en la tasa de crecimiento idéntico al que tiene lugar con el Fosfito (12 %), sin embargo el rendimiento de los cultivos decreció un 9 %. El Extracto de algas produjo un aumento leve (4 %), aunque estadísticamente significativo, en la velocidad de

## Resultados

crecimiento, al mismo tiempo que el Ácido húmico la inhibió en la misma proporción. Con el objetivo de evaluar de manera más minuciosa el efecto de los bioestimulantes bajo estrés salino, también se analizó el crecimiento de la levadura con 1 M de NaCl (Figura R.10). También bajo estas condiciones, los cultivos tratados con Fosfite mostraron una mejora en la tasa de crecimiento, que subió un 23 % respecto al control, y sobre el rendimiento, que aumentó un 9 %. El Amino22 incrementó la velocidad de crecimiento un 8 %, sin embargo no se produjo un aumento en el rendimiento de los cultivos, el cual sí tuvo lugar con 0,64 M de NaCl. Asimismo, con el Extracto de algas y el Vinacillas la tasa de crecimiento se vio incrementada un 8 y un 23 %, respectivamente, aunque con este último el rendimiento descendió un 10 %.

En cuanto al estrés osmótico, se observó un efecto positivo sobre el crecimiento de los cultivos tratados con Amino22, el cual produjo un incremento del 28 % en la velocidad de crecimiento y del 39 % en el rendimiento. También tuvo un efecto beneficioso en estas condiciones el Fulvato potásico, con el que la tasa de crecimiento subió un 11 %.



**Figura R.10. Efecto de los bioestimulantes sobre el crecimiento en presencia de NaCl 1 M.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de los cultivos crecidos en medio SD en presencia de 1 M de NaCl y suplementados con las concentraciones seleccionadas de los distintos bioestimulantes. Leyenda: FO (Fosfite), FU (Fulvato potásico), AM (Amino22), VI (Vinacillas), AL (Extracto de algas) y HU (Ácido húmico). \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ).

Después de observar el crecimiento tanto en ausencia de estrés como bajo los estreses salino y osmótico en presencia de los bioestimulantes, se quiso estudiar su efecto sobre la tolerancia a otros estreses como el oxidativo y el térmico. Para ello se tomaron cultivos crecidos en medio SD con los bioestimulantes hasta la mitad de la fase exponencial y se incubaron en esos mismos medios con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM) o a 44 °C durante 30 minutos, tras lo cual se determinó el porcentaje de células supervivientes. Como se indica en la Figura R.9C, el Amino22, el Ácido húmico y el Fulvato potásico protegieron a las células frente al peróxido de hidrógeno. Respecto al control, el porcentaje de supervivencia se multiplicó por un factor de 2,6 en el caso del Amino22, por 2,3 con el Ácido húmico y por 1,9 con el Fulvato potásico. Frente al choque térmico a 44 °C resultaron proteger todos los bioestimulantes a excepción del Extracto de algas. En concreto, el Amino22 aumentó la supervivencia de las células por un factor de 1,7, el Fulvato potásico de 1,5, el Fosfite de 1,4, el Vinacillas de 1,3 y el Ácido húmico de 1,2.

A diferencia de los estreses por NaCl, sorbitol o altas temperaturas, que no pueden ser contrarrestados por interacción directa con el agente estresante, en el caso del estrés oxidativo los bioestimulantes Amino22, Ácido húmico y Fulvato potásico podrían actuar eliminando el peróxido de hidrógeno, así que se decidió realizar un ensayo para determinar si son capaces de degradar esta molécula. Como se muestra en la Figura R.9D, el Fulvato potásico degradó hasta un 45 % de  $H_2O_2$  después de una hora de incubación en medio SD y en presencia de 2 mM del agente oxidante. En cambio, con el Amino22 y el Ácido húmico no ocurrió ninguna degradación. Con esta información, se pensó en la posibilidad de que la tolerancia frente a estrés oxidativo observada en el tratamiento con Fulvato potásico se debiese a una interacción directa entre el  $H_2O_2$  y el bioestimulante en el medio de cultivo. Para comprobarlo, se realizó un nuevo ensayo en el que las células crecidas hasta la mitad de la fase exponencial con o sin Fulvato potásico fueron lavadas y resuspendidas en medio SD fresco y sin el bioestimulante, tras lo cual se incubaron con 1 y 2 mM de  $H_2O_2$  durante 30 minutos y se determinó la supervivencia. En las células crecidas en presencia de Fulvato potásico la supervivencia a un tratamiento de media hora con 2 mM de  $H_2O_2$  se multiplicó por 1,7 respecto al control (Figura R.9E). En el tratamiento con 1 mM de  $H_2O_2$  también se intuyó una tendencia a mayor supervivencia en las células tratadas con Fulvato potásico, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Se concluye por tanto que la tolerancia frente a estrés oxidativo conferida por el Fulvato potásico no está causada por una degradación del peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo.

Todos estos resultados, que se resumen en la Tabla R.1, muestran que el bioestimulante más polivalente es el Amino22, el cual resultó mejorar sensiblemente el crecimiento en ausencia de estrés y con estreses salino (NaCl) y osmótico (sorbitol), además de incrementar la supervivencia a estreses oxidativo ( $H_2O_2$ ) y por altas temperaturas (choque térmico a 44 °C). En el caso del estrés salino hay que destacar también el efecto protector del Fosfito, del Vinacillas y, en menor medida, del Extracto de algas. Los dos primeros protegieron, además, frente a choque térmico, al igual que el Ácido húmico que también mejoró la tolerancia a estrés oxidativo. No obstante, como segundo bioestimulante más polivalente se sitúa el Fulvato potásico, que protegió frente a estrés osmótico, oxidativo y térmico. Por lo tanto, el Amino22 y el Fulvato potásico fueron los bioestimulantes escogidos para pasar a la siguiente fase de la investigación, que tiene como objetivo identificar sus mecanismos de acción.

**Tabla R.1. Resumen de los efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura.** Se indica para cada condición si el bioestimulante tiene un efecto positivo (+), negativo (-) o no tiene ningún efecto significativo (/).

	Sin estrés	Estrés salino	Estrés osmótico	Estrés oxidativo	Estrés por altas temperaturas
<b>Fosfito</b>	-	+	/	/	+
<b>Fulvato potásico</b>	/	/	+	+	+
<b>Amino22</b>	+	+	+	+	+
<b>Vinacillas</b>	-	+	/	/	+
<b>Extracto de algas</b>	/	+	/	/	/
<b>Ácido húmico</b>	-	-	/	+	+

### 3. Estudio del mecanismo de acción del bioestimulante Amino22

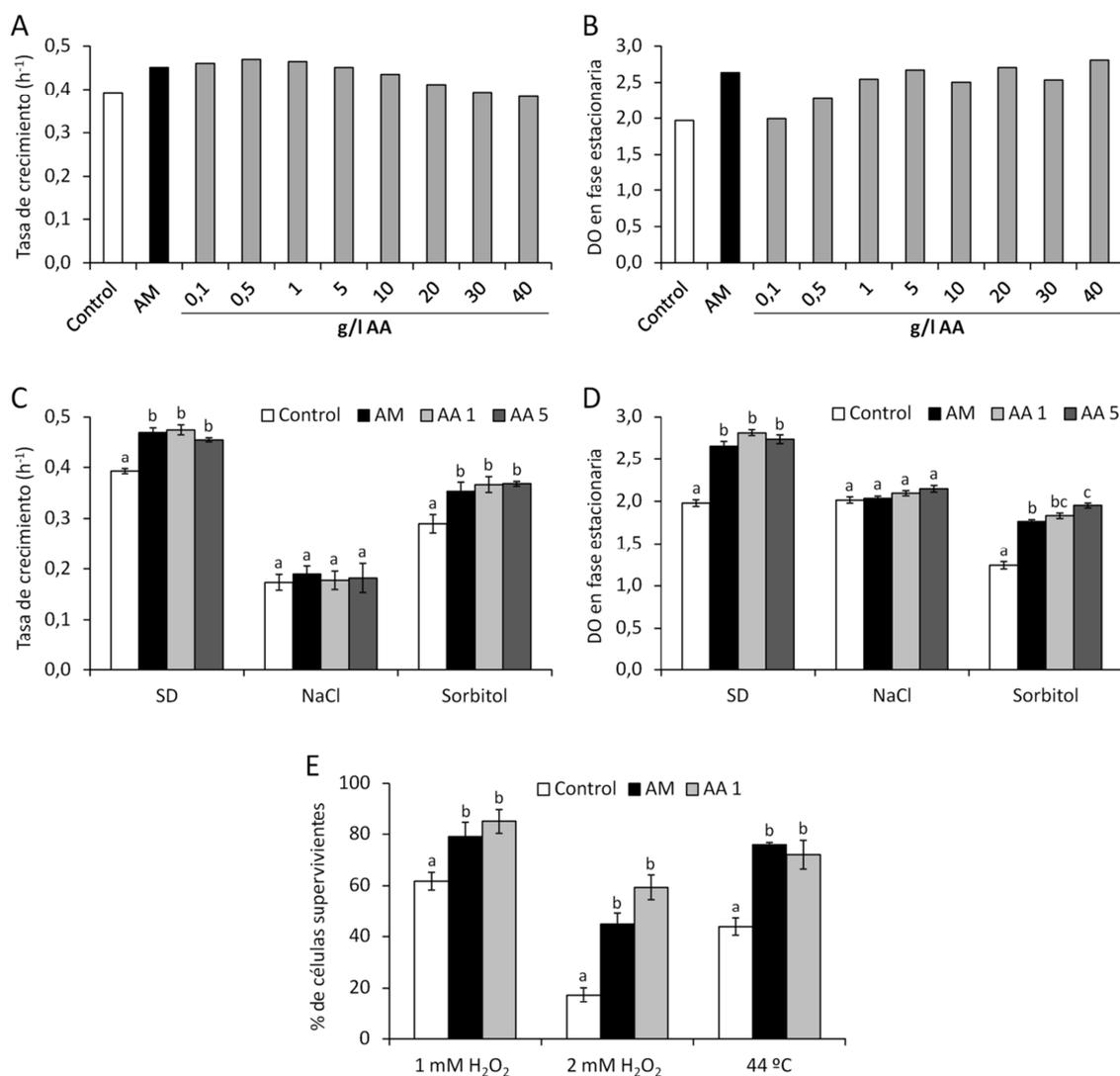
Como se ha visto en el apartado anterior, el Amino22 fue el bioestimulante más destacado en cuanto a la mejora del crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura, razón por la cual se seleccionó para estudiar su mecanismo de acción. Cabe recordar que en esta investigación se partió con escasa (o nula en algunos casos) información sobre la naturaleza química de cada bioestimulante y, por supuesto, sin detalles acerca de su composición. La única información que teníamos sobre el Amino22 era que se trata de una mezcla de aminoácidos obtenida por hidrólisis química. Sin embargo, el color marrón oscuro del concentrado del bioestimulante hacía sospechar que pudiese contener otros compuestos además de los aminoácidos. Por lo tanto, el siguiente paso consistió en intentar reproducir el efecto del Amino22 comparando su efecto con el de una mezcla de aminoácidos de composición perfectamente conocida con el objetivo de averiguar si dicho efecto se debe únicamente a la presencia de aminoácidos y, en ese caso, discernir qué aminoácidos tienen una mayor relevancia.

#### 3.1. Imitación del efecto del Amino22 con peptona de caseína ácida

Para “imitar” al Amino22 se utilizó peptona de caseína ácida (Laboratorios Conda) como fuente de aminoácidos. Se trata de un hidrolizado de caseína en medio ácido cuya composición se detalla en la Tabla A.2 del Anexo II. Se comparó el efecto del Amino22 sobre el crecimiento de la levadura en ausencia de estrés con el de una serie de concentraciones de peptona de caseína ácida (desde 0,1 g/l hasta 40 g/l), tal y como se muestra en la Figura R.11 (A y B). Se seleccionaron las concentraciones de 1 y 5 g/l por ser las que dieron resultados más similares a los del Amino22, tanto en la tasa de crecimiento como en el rendimiento de los cultivos. Se analizó de nuevo el efecto de dichas concentraciones de peptona de caseína ácida (o casaminoácidos) sobre el crecimiento, esta vez también en presencia de estrés salino (NaCl 1 M) y osmótico (sorbitol 1 M), mostrando éstas un efecto muy similar al del Amino22 (Figura R.11, C y D), si bien para sucesivos experimentos se escogió la concentración de 1 g/l por ser la menor de las dos y porque no presentó ninguna diferencia significativa respecto al Amino22 (la concentración de 5 g/l mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al Amino22 en el rendimiento en presencia de sorbitol). Por último, se empleó 1 g/l de casaminoácidos para evaluar su efecto sobre la tolerancia a estrés oxidativo y térmico. Los casaminoácidos incrementaron notablemente la supervivencia a ambos tipos de estrés produciendo unos resultados semejantes a los del Amino22 (Figura R.11E).

Teniendo en cuenta estos datos se asumió que con 1 g/l de casaminoácidos se puede reproducir el efecto del Amino22 sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura. Por lo tanto, en los sucesivos experimentos que tienen como objetivo dilucidar el mecanismo de acción de este bioestimulante, se llevó en paralelo al tratamiento con Amino22 un tratamiento con 1 g/l de casaminoácidos, exceptuando el análisis global de la expresión génica mediante micromatrices de DNA (apartado R.3.4), en el que tan solo se estudió el efecto del Amino22. Por otro lado, el efecto beneficioso de los aminoácidos sobre el crecimiento prácticamente desapareció en presencia de 1 M de NaCl (Figuras R.10 y R.11) y con 0,64 M éste fue considerablemente inferior al que se observó en presencia de sorbitol y en ausencia de estrés (Figura R.9 A y B), lo que probablemente fue debido a que el Na<sup>+</sup> inhibe específicamente el efecto de los aminoácidos. Asimismo, es muy posible que los aminoácidos no actúen contra la

toxicidad del  $\text{Na}^+$  y que la ligera mejora en el crecimiento que proporcionaron en condiciones de estrés salino se debiese a las mismas causas de la mejora que tuvo lugar en presencia de sorbitol y en ausencia de estrés. Por esta razón, se dejó de analizar el crecimiento bajo condiciones de estrés salino en experimentos posteriores.



**Figura R.11. La adición de 1 g/l de casaminoácidos reproduce el efecto del Amino22 sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de cultivos crecidos en medio SD suplementado con Amino22 (AM) y con diferentes concentraciones casaminoácidos (AA). Los valores corresponden a un solo experimento, no obstante, al tratarse de una serie de varias concentraciones, los valores se apoyan unos a otros y el resultado puede considerarse representativo. C y D) Tasa de crecimiento y densidad óptica en la fase estacionaria, respectivamente, de cultivos crecidos en medio SD suplementado con AM y con AA a 1 y 5 g/l en ausencia de estrés y en presencia de 1 M de NaCl y 1 M de sorbitol. E) Células crecidas hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $\text{Abs}_{660} \approx 0,4$ ) en medio SD suplementado con AM y con AA (1 g/l) se incubaron durante 30 min en los mismos medios con distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o a 44 °C, tras lo cual se determinó la supervivencia. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los valores ( $P < 0,05$ ).

## Resultados

### 3.2. Análisis del efecto individual de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura

La siguiente cuestión que se trató de resolver consistió en averiguar qué aminoácidos tienen mayor trascendencia en la mejora del crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura. Para ello, se analizó el crecimiento sin estrés y con estrés osmótico en presencia de cada uno de los aminoácidos que componen la peptona de caseína ácida, los cuales fueron añadidos al medio de cultivo en las mismas concentraciones en las que se encuentran al añadir 1 g/l de casaminoácidos. En la Figura R.12 se muestra el efecto de los distintos aminoácidos sobre la tasa de crecimiento y el rendimiento de los cultivos en ausencia de estrés (A y B, respectivamente) y en presencia de estrés osmótico (C y D, respectivamente). Aquellos aminoácidos que proporcionaron mejoras estadísticamente significativas respecto al control de como mínimo un 5 % en la velocidad de crecimiento y un 10 % en el rendimiento de los cultivos se reúnen en la Tabla R.2.

**Tabla R.2. Incrementos estadísticamente significativos de al menos un 5 % en la tasa de crecimiento y un 10 % en el rendimiento de cultivos crecidos en presencia de aminoácidos bajo condiciones de ausencia de estrés (SD) y de estrés osmótico (sorbitol).**

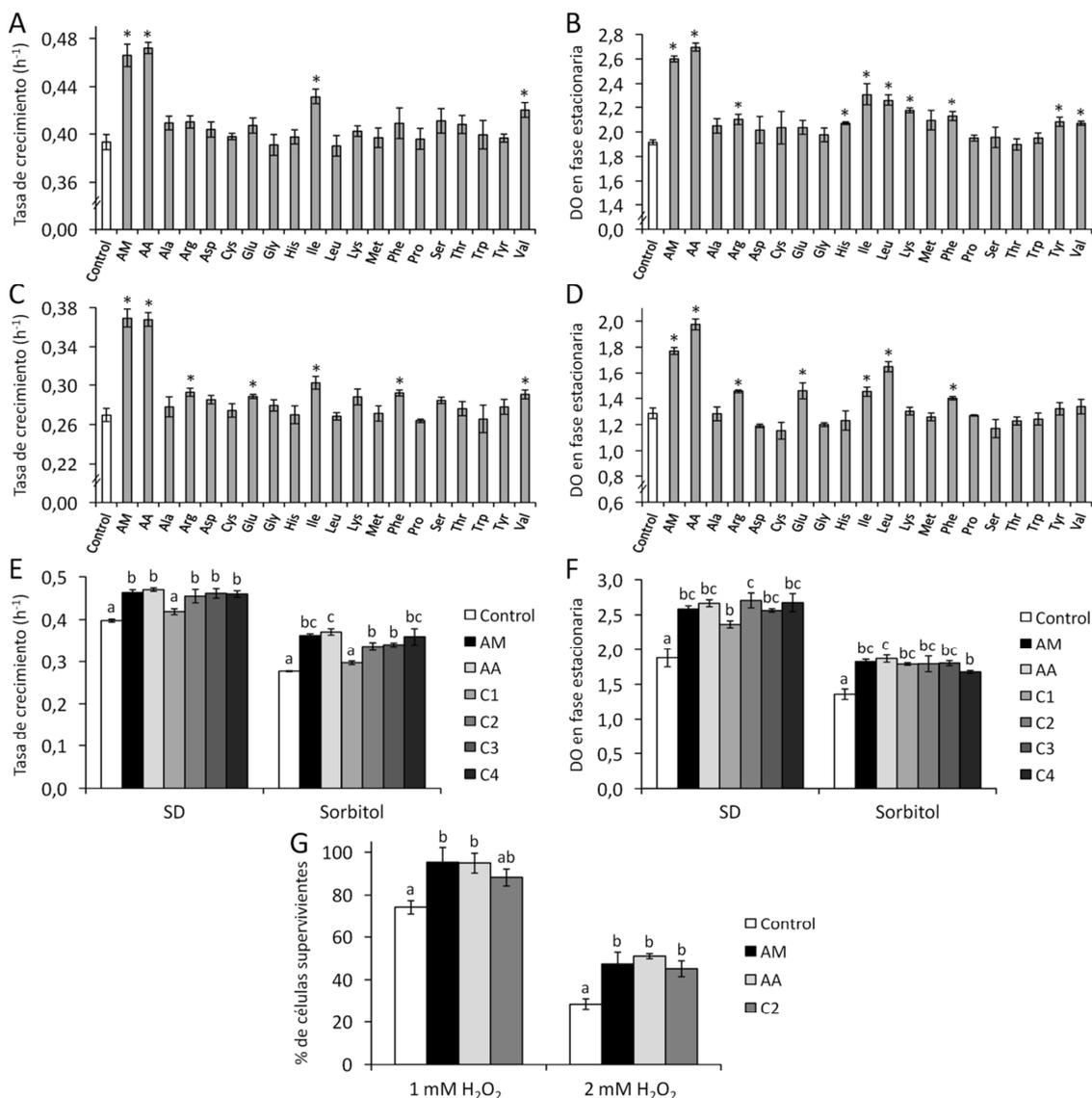
SD			
Tasa de crecimiento		Rendimiento	
Aminoácido	Incremento (%)	Aminoácido	Incremento (%)
Ile	10	Ile	21
Val	7	Leu	18
		Lys	14
		Phe	11

Sorbitol			
Tasa de crecimiento		Rendimiento	
Aminoácido	Incremento (%)	Aminoácido	Incremento (%)
Ile	12	Leu	28
Arg	9	Glu	13
Phe	8	Arg	13
Val	8	Ile	13
Glu	7		

A partir de los aminoácidos seleccionados según los criterios de la Tabla R.2 se elaboraron combinaciones de los mismos y se evaluó su efecto sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de las células de levadura. La primera combinación (C1) es la más simple y contiene Ile (mejoró notablemente la tasa de crecimiento y el rendimiento tanto en ausencia de estrés como con estrés osmótico), Leu (produjo un incremento importante en el rendimiento con y sin estrés) y Phe (aumentó el rendimiento sin estrés y la velocidad de crecimiento en presencia de sorbitol). La segunda combinación (C2) está compuesta por los tres aminoácidos anteriores y por Glu (mejoró la velocidad de crecimiento y rendimiento con sorbitol). La tercera combinación

consiste en los aminoácidos de la C2 además de Arg (como el Glu, mejoró la tasa de crecimiento y rendimiento bajo estrés osmótico). Por último, la cuarta combinación (C4) contiene los aminoácidos de la C3 y Val (incrementó la velocidad de crecimiento en ausencia de estrés y con sorbitol).



**Figura R.12. Efecto individual de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés.** A y B) Tasa de crecimiento y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria, respectivamente, de los cultivos crecidos en medio SD suplementado con Amino22 (AM), casaminoácidos (AA) y los diferentes aminoácidos que componen la peptona de caseína ácida añadidos en las mismas concentraciones en las que están presentes en ésta. C y D) Tasa de crecimiento y densidad óptica en la fase estacionaria, respectivamente, de los cultivos crecidos en medio SD con sorbitol 1 M suplementado con AM, AA y los diferentes aminoácidos que componen la peptona de caseína ácida. E y F) Tasa de crecimiento y densidad óptica en la fase estacionaria, respectivamente, de los cultivos crecidos en medio SD normal y medio SD con sorbitol 1 M en presencia de AM, AA y distintas combinaciones de aminoácidos. G) Células crecidas en medio SD en presencia de AM, AA y la combinación C2 hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Ab_{560} \approx 0,4$ ) se incubaron durante 30 min en los mismos medios con 1 y 2 mM de  $H_2O_2$ , tras lo cual se determinó la supervivencia. C1: Ile, Leu y Phe. C2: Glu, Ile, Leu y Phe. C3: Arg, Glu, Ile, Leu y Phe. C4: Arg, Glu, Ile, Leu, Phe y Val. \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los valores ( $P < 0,05$ ).

## Resultados

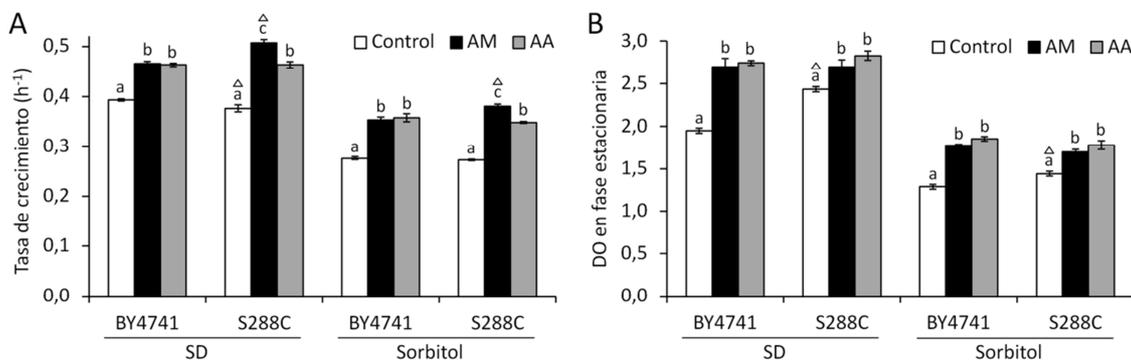
La C1 es la combinación que tuvo una menor influencia sobre el crecimiento, ya que no mejoró significativamente la velocidad de crecimiento respecto al control en las dos condiciones estudiadas (ausencia de estrés y estrés osmótico) y, además, produjo un rendimiento más bajo que los casaminoácidos en ausencia de estrés (Figura R.12, E y F). Las restantes combinaciones no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí, ni tampoco frente al Amino22, aunque sí se apreciaron algunas diferencias sutiles respecto a los casaminoácidos. Concretamente, la tasa de crecimiento de las células crecidas bajo estrés osmótico y tratadas con las combinaciones C2 y C3 fue un 8 % menor que con los casaminoácidos y el rendimiento de los cultivos tratados con la combinación C4 en presencia de sorbitol fue un 10 % menor. Dado que las combinaciones C2, C3 y C4 tuvieron un efecto muy similar entre sí y que con éstas se alcanzaron unos parámetros de crecimiento muy cercanos a los obtenidos con el uso de casaminoácidos, se llegó a la conclusión de que los aminoácidos de la C2 (Glu, Ile, Leu y Phe) son los que más influencia tuvieron a la hora de mejorar el crecimiento de la levadura. Posteriormente, se comparó el efecto de la C2 con el del Amino22 y los casaminoácidos bajo estrés oxidativo, sin observar diferencias significativas en la supervivencia de las células a dicho estrés, aunque sí que se apreció una tendencia en el tratamiento con C2 a una supervivencia ligeramente inferior (Figura R.12G).

### 3.3. Comparación del efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento de las cepas BY4741 y S288C

La cepa de levadura de referencia en esta tesis es la BY4741 y, como se especifica en Materiales y Métodos, es auxótrofa para His, Leu, Met y Ura. El hecho de que los casaminoácidos contengan His, Leu y Met podría suponer que al menos una parte de su efecto sobre el crecimiento se debiese a una complementación de las auxotrofías, ya que el suplemento de cada una que se añade en la preparación del medio de cultivo podría irse agotando a lo largo del crecimiento y la presencia de casaminoácidos restituirlo. En ese caso, los cultivos control crecerían peor que los tratados con aminoácidos debido a la escasez de His, Leu y/o Met y no a otros posibles efectos positivos de los aminoácidos sobre el crecimiento. Para comprobar en qué medida la mejora del crecimiento observada en presencia de aminoácidos se debe a la complementación de las auxotrofías, se estudió efecto del Amino22 y de los casaminoácidos sobre el crecimiento de la cepa S288C, que no tiene auxotrofías y de la cual deriva la cepa BY4741 (Mortimer y Johnston, 1986).

Tanto el Amino22 como el hidrolizado de caseína ácida mejoraron el crecimiento de la cepa S288C, si bien con algunas diferencias respecto a la cepa BY4741. La tasa de crecimiento del control en la cepa S288C apenas disminuyó (un 4 %) respecto al de la BY4741 en ausencia de estrés, y bajo estrés osmótico no hubieron diferencias significativas, mientras que los cultivos tratados con casaminoácidos tampoco mostraron diferencias entre cepas, ni con estrés ni en presencia de éste (Figura R.13A). Sin embargo, se observó un aumento de aproximadamente un 8 % en la velocidad de crecimiento, con y sin estrés, en la cepa S288C respecto a la BY4741 en el tratamiento con Amino22. En cuanto al rendimiento de los cultivos en fase estacionaria, no se observaron diferencias entre cepas cuando fueron tratadas con Amino22 o con casaminoácidos, ni en ausencia de estrés ni con sorbitol (Figura R.13B). No obstante, el rendimiento de los controles de la cepa S288C fue mayor que el de los controles de la cepa BY4741. El mayor rendimiento de los cultivos control de la cepa S288C hizo que la mejora en el

tratamiento con casaminoácidos se redujese un 50 % respecto a la que tiene lugar en la cepa BY4741 en ausencia de estrés y un 40 % bajo estrés osmótico. Estos resultados indican que la complementación de las auxotrofías al añadir aminoácidos es parcialmente responsable de la mejora de los rendimientos en fase estacionaria que se observó en la cepa BY4741.



**Figura R.13. Comparativa del efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento de las cepas BY4741 y S288C.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de cultivos de las cepas BY4741 y S288C en presencia o ausencia de Amino22 (AM) y casaminoácidos (AA) en medio SD y en SD con sorbitol 1 M. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los valores ( $P < 0,05$ ).  $\Delta$ Diferencias significativas respecto al mismo tratamiento de la cepa BY4741 ( $P < 0,05$ ).

### 3.4. La presencia de aminoácidos reprime la expresión del regulón de Aft1

Como se ha visto en el apartado anterior, la mayor parte del efecto de los aminoácidos es independiente de la complementación de las auxotrofías de la cepa BY4741 y probablemente se deba a la activación de mecanismos moleculares que promuevan el crecimiento y mejoren la tolerancia a estrés abiótico. Con el fin de confirmar esta hipótesis e identificar con precisión el mecanismo de acción del Amino22, se comparó la expresión global de genes en células de levadura tratadas y sin tratar con el bioestimulante empleando micromatrices de DNA. El análisis transcriptómico se hizo con células crecidas hasta la mitad de la fase exponencial en medio SD y en ausencia de estrés. Se encontraron 19 genes diferencialmente expresados, 2 de ellos inducidos y 17 reprimidos. Las anotaciones génicas se consultaron en la base de datos SGD (*Saccharomyces Genome Database*; <http://www.yeastgenome.org/>). Los genes inducidos, una proteína de choque térmico y una glicoproteína secretora, se muestran en la Tabla R.3.

**Tabla R.3. Genes inducidos en células tratadas con Amino22 (AM) respecto a células sin tratar (control).**

Nombre estándar	Nombre sistemático	Anotación génica	Cociente (AM/control)
<i>HSP12</i>	YFL014W	Proteína de membrana plasmática involucrada en el mantenimiento de su organización durante el estrés	2,2
<i>YGP1</i>	YNL160W	Glicoproteína secretora relacionada con la pared celular	1,7

De los 17 genes reprimidos, 15 se pueden agrupar en dos categorías funcionales: Transporte de metales y Biosíntesis de aminoácidos y vitaminas (Tabla R.4). Es destacable que 8 de los 9 genes de la categoría de Transporte de metales (*SIT1*, *TIS11*, *FIT3*, *FET3*, *FTR1*, *FIT2*, *ARN1* y *ARN2*) están involucrados en la regulación de la homeostasis de hierro y son diana del factor

## Resultados

de transcripción Aft1, el cual se activa en condiciones de ayuno de hierro. El gen *ZRT1* codifica un transportador de Zn de alta afinidad (Zhao y Eide, 1996) y, aunque no suele ser incluido en el regulón de hierro dado que no interviene directamente en su homeostasis, se ha descrito que también puede ser activado por Aft1 y Aft2 (Courel *et al.*, 2005). En la categoría de Biosíntesis de aminoácidos y vitaminas se incluyen 4 genes (*HIS2*, *ARG3*, *TMT1* y *ARG5,6*) que intervienen en la biosíntesis de aminoácidos y cuya expresión es activada por Gcn4 en ausencia de aminoácidos (Natarajan *et al.*, 2001; Dumlao *et al.*, 2008) y otros dos genes (*SNO1* y *SNZ1*) que codifican proteínas para la biosíntesis de piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) y que también son diana de Gcn4 (Natarajan *et al.*, 2001). Por último, en la categoría de Miscelánea se incluyen el gen de una subunidad ribosomal (*RPS16A*) y el de una proteína endosomal involucrada en el recambio de proteínas de la membrana plasmática (*COS7*).

**Tabla R.4. Genes reprimidos en células tratadas con Amino22 (AM) respecto a células sin tratar (control).**

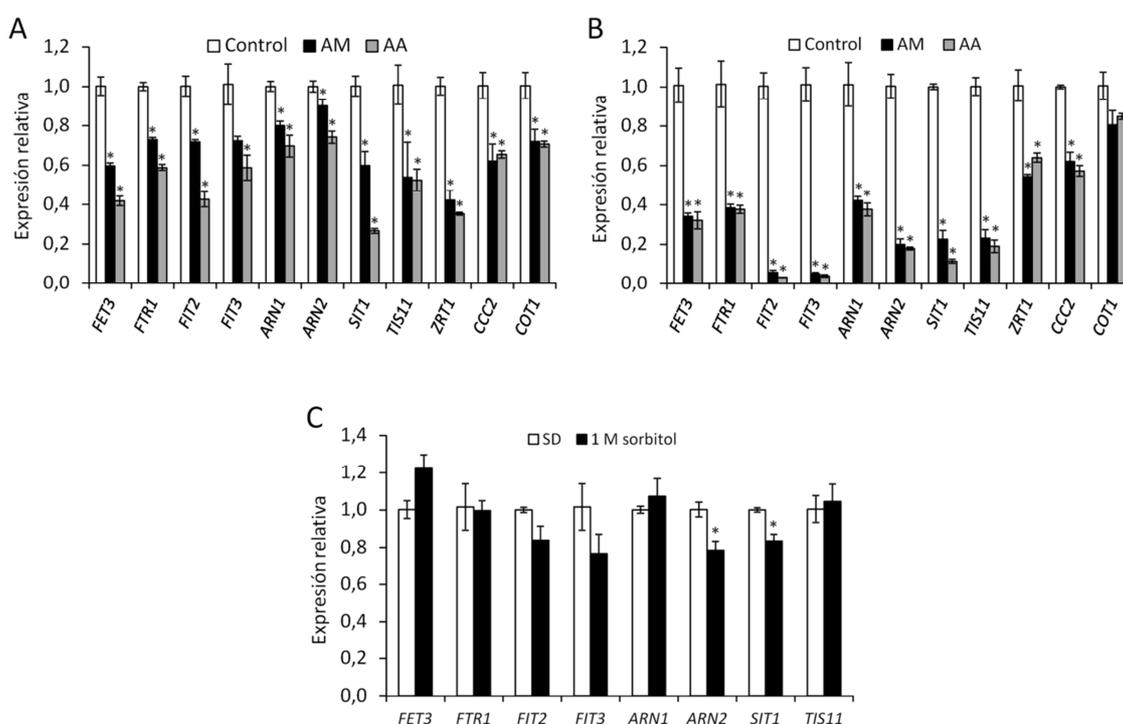
Nombre estándar	Nombre sistemático	Anotación génica	Cociente (control/AM)
<b>Transporte de metales</b>			
<i>SIT1</i>	YEL065W	Transportador de sideróforos	2,0
<i>TIS11</i>	YLR136C	Proteína de unión a mRNA	1,8
<i>FIT3</i>	YOR383C	Manoproteína de la pared celular	1,8
<i>FET3</i>	YMR058W	Ferro-O <sub>2</sub> -oxidoreductasa	1,8
<i>ZRT1</i>	YGL255W	Transportador de Zn de alta afinidad	1,7
<i>FTR1</i>	YER145C	Permeasa de Fe de alta afinidad	1,5
<i>FIT2</i>	YOR382W	Manoproteína de la pared celular	1,5
<i>ARN1</i>	YHL040C	Transportador de sideróforos	1,4
<i>ARN2</i>	YHL047C	Transportador de sideróforos	1,4
<b>Biosíntesis de aminoácidos y vitaminas</b>			
<i>HIS2</i>	YFR025C	Histidinolfosfatasa	2,1
<i>ARG3</i>	YJL088W	Ornitina carbamoiltransferasa	2,1
<i>SNO1</i>	YMR095C	Subunidad de la piridoxal 5'-fosfato sintasa con actividad glutaminasa	2,1
<i>SNZ1</i>	YMR096W	Subunidad de la piridoxal 5'-fosfato sintasa	2,0
<i>TMT1</i>	YER175C	Trans-aconitato metiltransferasa	1,6
<i>ARG5,6</i>	YER069W	N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa y acetilglutamato quinasa	1,5
<b>Miscelánea</b>			
<i>RPS16A</i>	YMR143W	Proteína estructural de la subunidad pequeña (40S) del ribosoma	2,2
<i>COS7</i>	YDL248W	Proteína endosomal involucrada en el recambio de proteínas de membrana plasmática	1,5

Para la validación del análisis transcriptómico se realizaron PCRs cuantitativas en tiempo real, que confirmaron que los 9 genes regulados por Aft1 (*SIT1*, *TIS11*, *FIT3*, *FET3*, *ZRT1*, *FTR1*, *FIT2*, *ARN1* y *ARN2*) se reprimen en presencia de Amino22 (Figura R.14A). Se observó que otros dos genes que pertenecen al regulón de Aft1 y de los cuales poseíamos cebadores diseñados para

qRT-PCR, *CCC2* y *COT1*, también se reprimieron. Asimismo, resultó interesante comprobar que la represión en los 11 genes analizados también ocurre en presencia de casaminoácidos.

Posteriormente se volvieron a hacer qRT-PCRs, esta vez partiendo de muestras crecidas en presencia de sorbitol 1 M (Figura R.14B). También bajo estrés osmótico, el Amino22 y los casaminoácidos provocaron la represión de los genes regulados por Aft1 y, en la mayoría de genes, esta represión fue más aguda que la que tuvo lugar en ausencia de estrés.

Por último, se comprobó si la expresión de los genes relacionados con la homeostasis de hierro varía en medio SD normal y en medio con sorbitol 1 M en ausencia de tratamiento con bioestimulante o casaminoácidos, constatando que prácticamente no existen diferencias entre ambas condiciones (Figura R.14C). Únicamente se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en dos de los genes, *ARN2* y *SIT1*, en los que la expresión relativa fue un 20 % menor bajo estrés osmótico.



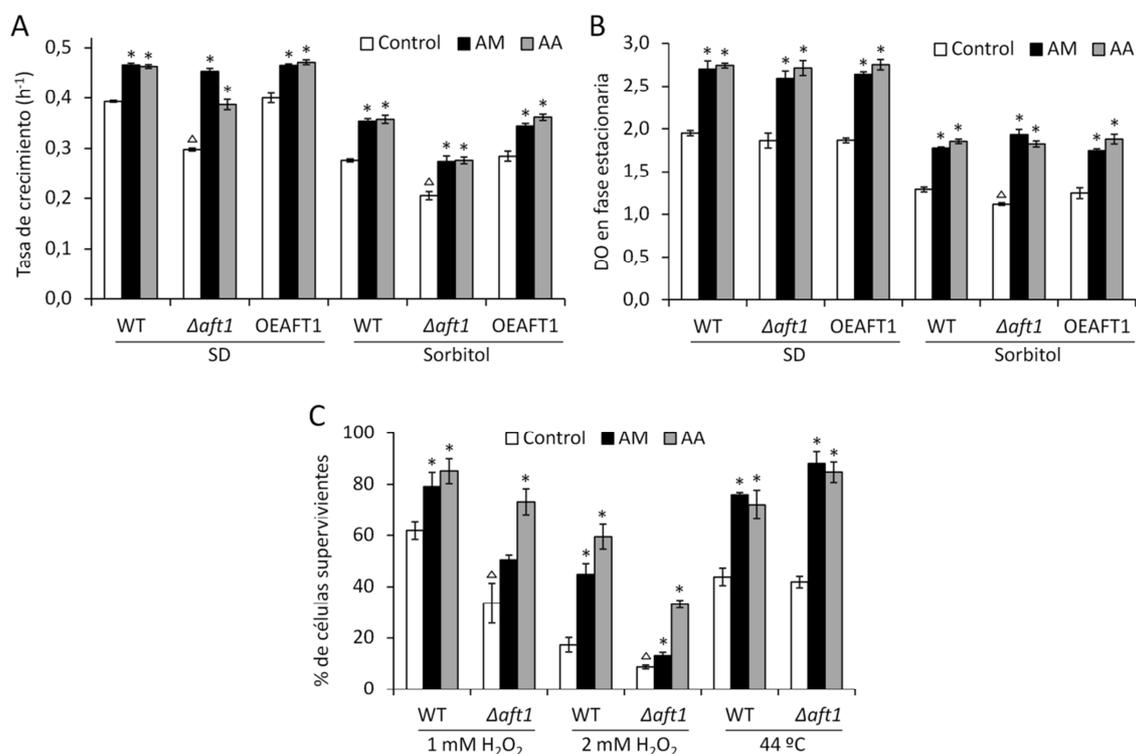
**Figura R.14. Los aminoácidos provocan la represión del regulón de Aft1 en ausencia de estrés y en condiciones de estrés osmótico.** Mediante qRT-PCR se determinó la expresión relativa de 11 genes del regulón de Aft1 en células crecidas hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ) en medio SD normal (A) y en medio SD con sorbitol 1 M (B) en presencia de Amino22 (AM) y casaminoácidos (AA). C) Expresión de los genes de transporte de hierro en células crecidas en medio SD normal y en medio SD con sorbitol 1 M. \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ).

### 3.5. El efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés es independiente del factor de transcripción *AFT1*

Los resultados anteriores ponen en evidencia que el tratamiento con aminoácidos tiene como consecuencia la mejora del crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura y la represión de los genes involucrados en la homeostasis de hierro. No obstante, los datos disponibles no son suficientes para determinar si dicha mejora en presencia de aminoácidos está mediada de

## Resultados

alguna manera por la represión del regulón de Aft1 o si es independiente de ésta. De modo que se comparó el crecimiento de la cepa silvestre con el de un mutante nulo para el gen *AFT1* ( $\Delta aft1$ ) y el de un mutante de sobreexpresión de este gen bajo su propio promotor (OEAF1) y se analizó el efecto de los aminoácidos sobre ambos mutantes (Figura R.15, A y B).



**Figura R.15. El efecto positivo de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés es independiente de *AFT1*.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de la cepa silvestre (WT) y de los mutantes  $\Delta aft1$  y OEAF1 en presencia de Amino22 (AM) y casaminoácidos (AA) en medio SD normal y en medio SD con sorbitol 1 M. C) Células WT y  $\Delta aft1$  crecidas en medio SD en presencia de AM y AA hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ) se incubaron durante 30 min en los mismos medios bien con distintas concentraciones de  $H_2O_2$  o a 44 °C, tras lo cual se determinó la supervivencia. \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ). <sup>Δ</sup>Diferencias significativas respecto al control de la cepa silvestre ( $P < 0,05$ ).

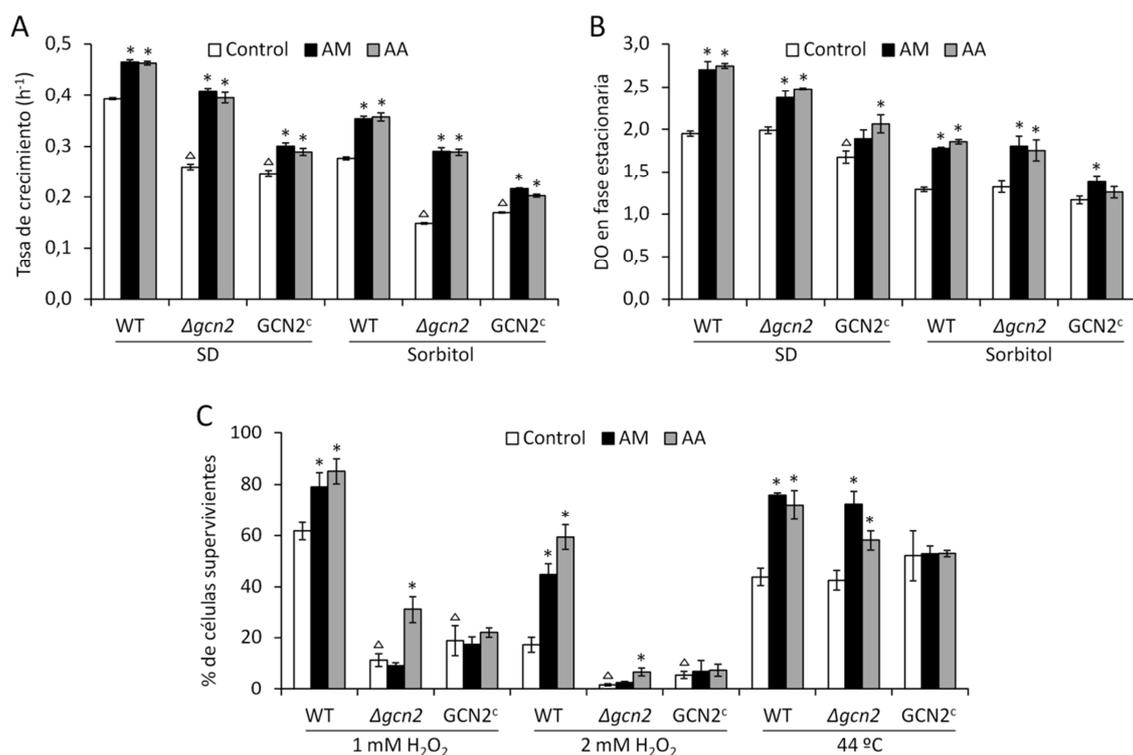
En condiciones control (sin tratamiento), el mutante  $\Delta aft1$  presentó una tasa de crecimiento un 25 % menor que la cepa silvestre, tanto sin estrés y como con estrés osmótico, y un descenso del 13 % en el rendimiento de los cultivos con sorbitol 1 M, mientras que el mutante de sobreexpresión OEAF1 no mostró diferencias significativas respecto a la cepa silvestre en ninguno de los dos parámetros de crecimiento estudiados. Los tratamientos con Amino22 y con casaminoácidos tuvieron un claro efecto positivo sobre ambos mutantes, incrementando la velocidad de crecimiento y el rendimiento de los cultivos respecto a sus controles tanto en ausencia de estrés como con estrés osmótico. También se analizó la supervivencia del mutante  $\Delta aft1$  a  $H_2O_2$  y a choque térmico. Por un lado, la tolerancia del mutante a estrés oxidativo fue menor que la de la cepa silvestre y, por otro, los casaminoácidos mejoraron sensiblemente la supervivencia a ambos estreses (Figura R.15C). El aumento en la supervivencia a  $H_2O_2$  del mutante  $\Delta aft1$  tratado con Amino22 respecto al control fue mucho menor que con casaminoácidos, aunque frente a choque térmico ambos tratamientos produjeron la misma mejora.

Estos resultados indican que la mejora del crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura no tiene su causa en la pérdida de función de *AFT1* y que los aminoácidos mejoran el crecimiento y la tolerancia a estrés independientemente de la presencia o ausencia de este gen.

3.6. El efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés se reduce con la activación constitutiva de la ruta GAAC y depende parcialmente de la ruta TORC1

La regulación de la expresión de los transportadores de hierro no parece ser un factor determinante para desencadenar el efecto positivo de los aminoácidos en las células de la levadura, por lo que sería lógico considerar que dicho efecto pudiera deberse a la mediación de los dos principales mecanismos de regulación de la homeostasis de aminoácidos: la ruta GAAC y la ruta TORC1. Con el objetivo de analizar la implicación de estas rutas en la respuesta al Amino22 y a los casaminoácidos, se investigó su efecto sobre una serie de mutantes. Para el estudio de la ruta GAAC se utilizaron los mutantes  $\Delta gcn2$  y  $GCN2^c$ . El primero es un mutante de pérdida de función de *GCN2*, el cual es incapaz de activar la respuesta a ayuno de aminoácidos mediada por la ruta GAAC, y el segundo un mutante que expresa un alelo dominante de la quinasa *Gcn2* que permite la activación constitutiva de dicha ruta. Los dos mutantes mostraron fenotipos de crecimiento lento, con una tasa de crecimiento inferior a la de la cepa silvestre, sin embargo, las incubaciones con Amino22 y casaminoácidos resultaron aumentar considerablemente la velocidad de crecimiento del mutante  $\Delta gcn2$  hasta alcanzar valores muy similares a los del control de la cepa silvestre en las dos condiciones analizadas (Figura R.16A). En cambio, en el mutante  $GCN2^c$  crecido en presencia de aminoácidos, el incremento relativo a su control fue 3 veces inferior que en el mutante  $\Delta gcn2$  en ausencia de estrés y entre 4 y 5 veces inferior (según se haya tratado con Amino22 o casaminoácidos, respectivamente) en presencia de sorbitol 1 M. En cuanto al rendimiento de los cultivos en fase estacionaria, las células control  $\Delta gcn2$  alcanzaron los mismos niveles que la cepa silvestre (Figura R.16B). Los aminoácidos aumentaron el rendimiento de los cultivos de este mutante, no obstante, en ausencia de estrés, este aumento fue menor que en la cepa silvestre. De nuevo, la respuesta a aminoácidos del mutante  $GCN2^c$  tendió a ser menor proporcionalmente a la del mutante nulo, algo que se aprecia especialmente bajo estrés osmótico. Al examinar la supervivencia de los mutantes a estrés oxidativo y a estrés térmico se observa que ambos son más sensibles que la cepa silvestre a estrés oxidativo, aunque el mutante  $GCN2^c$  tiende a dar una mayor tolerancia (Figura R.16C). Los aminoácidos mejoraron la tolerancia a ambos estreses en el mutante  $\Delta gcn2$ , aunque, a diferencia de los casaminoácidos, el Amino22 no aumentó la supervivencia bajo estrés oxidativo. El mutante  $GCN2^c$  no mostró diferencias significativas en la supervivencia a estos estreses cuando fue tratado con Amino22 o casaminoácidos. El hecho de que los aminoácidos tengan un marcado impacto positivo sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés tanto en la cepa silvestre como en el mutante nulo de *GCN2* indica que la proteína quinasa *Gcn2* no es requerida para su efecto. Sin embargo, dicho efecto se reduce considerablemente en el mutante con *Gcn2* en su forma constitutivamente activa, por lo que la inhibición de *Gcn2* parece necesaria para permitir a la célula aprovechar los aminoácidos.

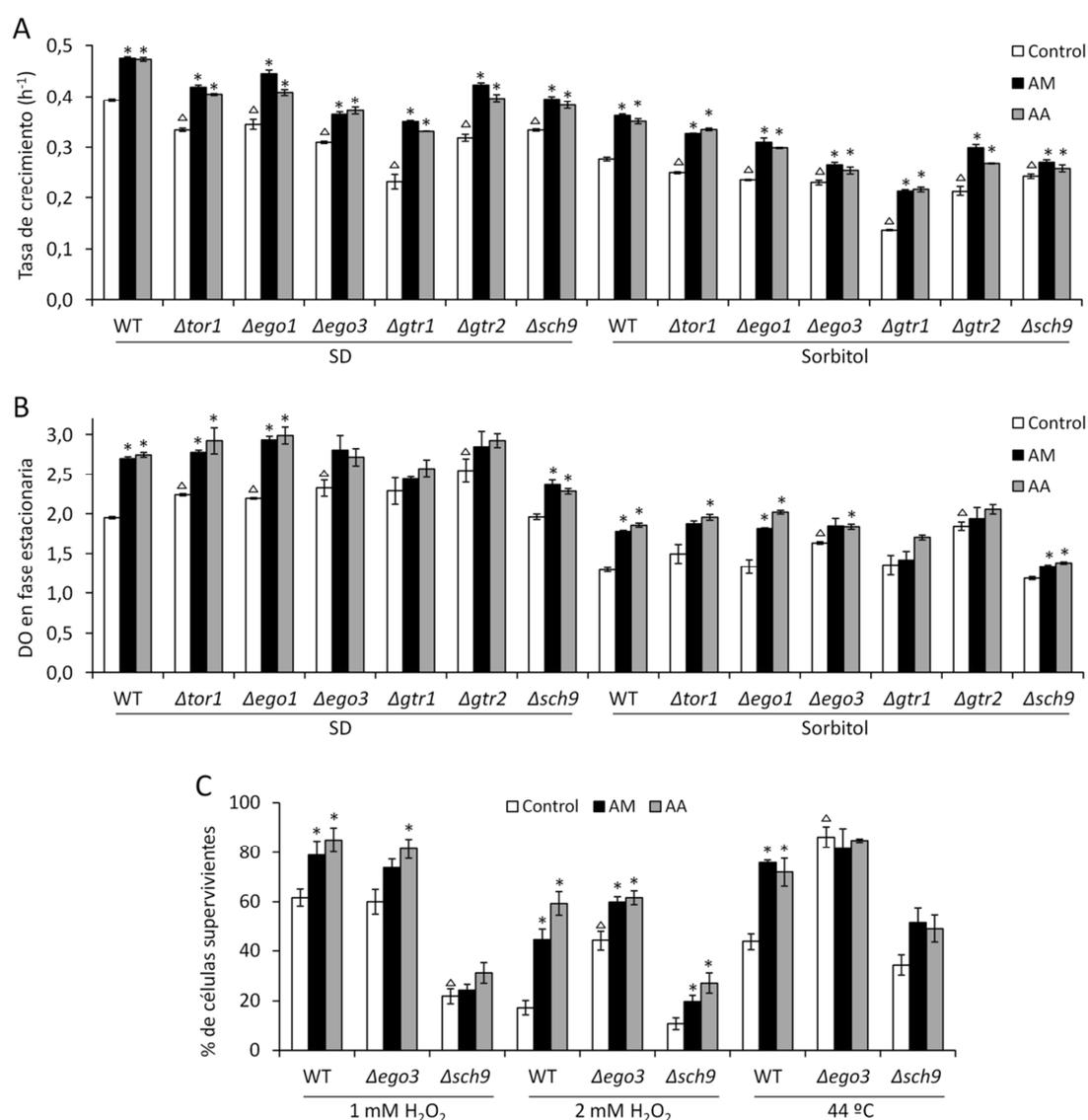
## Resultados



**Figura R.16. El efecto positivo de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés en levadura no requiere Gcn2 pero se reduce cuando Gcn2 está constitutivamente activada.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de la cepa silvestre (WT) y de los mutantes  $\Delta gcn2$  y GCN2<sup>c</sup> en presencia de Amino22 (AM) y casaminoácidos (AA) en medio SD normal y en medio SD con sorbitol 1 M. C) Células crecidas en medio SD en presencia de AM y AA hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ) se incubaron durante 30 min en los mismos medios bien con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o a 44 °C, tras lo cual se determinó la supervivencia. \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ). <sup>Δ</sup>Diferencias significativas respecto al control de la cepa silvestre ( $P < 0,05$ ).

Para estudiar la influencia de la ruta TORC1 en la respuesta de la levadura a los tratamientos con Amino22 y casaminoácidos se usó el mutante  $\Delta tor1$ , que presenta una actividad TORC1 ligeramente reducida pero que no es letal, ya que, como se ha comentado en la introducción, la levadura posee dos genes *TOR* que pueden actuar en el complejo TORC1 (Loewith *et al.*, 2002; Loewith y Hall, 2011). También se utilizaron mutantes ( $\Delta ego1$ ,  $\Delta ego3$ ,  $\Delta gtr1$  y  $\Delta gtr2$ ) para cuatro de los componentes del complejo EGO, ya que la supresión de cualquiera de estos genes provoca una baja actividad TORC1 (Binda *et al.*, 2009). No se incluyó el mutante del gen *EGO2* porque en el momento en el que se realizaron los experimentos no se conocía que formase parte de dicho complejo. Por último, se empleó el mutante de uno de los dos principales efectores de TORC1,  $\Delta sch9$ , el cual ha demostrado tener un fenotipo similar al de las células tratadas con rapamicina (Pedruzzi *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2004). No se pudo usar un mutante de pérdida de función del otro principal efector de TORC1, Tap42, ya que éste no es viable. El primer aspecto destacable del crecimiento de los mutantes mencionados es que todos exhibieron un crecimiento más lento que la cepa silvestre, tanto sin estrés como con estrés osmótico (Figura R.17A). Es sabido que la mutación de *TOR1* tiene un efecto relativamente pequeño sobre el tiempo de generación de *S. cerevisiae* debido a que posee el gen *TOR2* (Helliwell *et al.*, 1994), lo que concordó con la disminución en la tasa de crecimiento del mutante  $\Delta tor1$  (un 15 % sin estrés y un 10 % bajo estrés osmótico). El mutante  $\Delta gtr1$  fue el

que más lento creció (un 40 % más despacio sin estrés y un 50 % bajo estrés osmótico). Tanto el Amino22 como los casaminoácidos aumentaron la velocidad de crecimiento en todas las cepas. El incremento relativo en el mutante  $\Delta sch9$  fue menor que en la cepa silvestre, con y sin estrés, y en el mutante  $\Delta ego3$  fue menor solo bajo estrés osmótico. En el resto de mutantes el incremento relativo fue similar o superior al de la cepa silvestre. Respecto al rendimiento de los cultivos, éste fue mayor en el mutante  $\Delta tor1$  y en los mutantes del complejo EGO que en la cepa silvestre (Figura R.17B). En este caso, los aminoácidos solo produjeron una mejora similar a la que tiene lugar en la cepa silvestre en el mutante  $\Delta ego1$ . En los demás mutantes el aumento relativo en el rendimiento fue menor o inexistente.



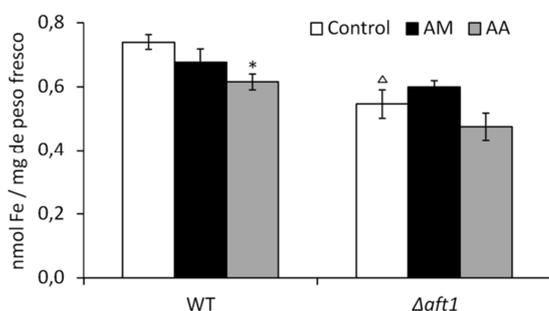
**Figura R.17. El efecto positivo de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés en levadura depende parcialmente de la ruta TORC1.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de la cepa silvestre (WT) y de los mutantes  $\Delta tor1$ ,  $\Delta ego1$ ,  $\Delta ego3$ ,  $\Delta gtr1$ ,  $\Delta gtr2$  y  $\Delta sch9$  en presencia de Amino22 (AM) y casaminoácidos (AA) en medio SD normal y en medio SD con sorbitol 1 M. C) Células  $\Delta ego3$  y  $\Delta sch9$  crecidas en medio SD en presencia de AM y AA hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ) se incubaron durante 30 min en los mismos medios bien con distintas concentraciones de  $H_2O_2$  o a 44 °C, tras lo cual se determinó la supervivencia. \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ).  $\Delta$ Diferencias significativas respecto al control de la cepa silvestre ( $P < 0,05$ ).

## Resultados

Teniendo en cuenta los resultados de la velocidad de crecimiento y el rendimiento en conjunto, fue en los mutantes  $\Delta ego3$  y  $\Delta sch9$  donde más disminuyó el efecto relativo de los aminoácidos, por lo que ambos se escogieron para analizar su tolerancia a estrés oxidativo y a estrés térmico en presencia de aminoácidos. El primero mostró mayor tolerancia que la cepa silvestre a ambos estreses, no obstante, los aminoácidos no mejoraron su supervivencia a choque térmico y el incremento relativo respecto a su control bajo estrés oxidativo fue menor que en la cepa silvestre (Figura R.17C). El segundo mostró una menor supervivencia que la cepa silvestre con 1 mM de  $H_2O_2$ , pero no con 2 mM. Tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tras el choque térmico entre las células  $\Delta sch9$  y las de la cepa silvestre. Los tratamientos con Amino22 y casaminoácidos no mejoraron significativamente la tolerancia a estrés térmico en este mutante, aunque sí se observó una tendencia a que ésta aumentase. En condiciones de estrés oxidativo, se observa que con 2 mM de  $H_2O_2$  la supervivencia de las células  $\Delta sch9$  crecidas con aminoácidos aumentó respecto al control, aunque el incremento relativo fue menor que en la cepa silvestre, mientras que con 1 mM de  $H_2O_2$  los aminoácidos no aumentaron la supervivencia. En conjunto, estos resultados indican que dos componentes de la ruta TORC1, Ego3 y Sch9, intervienen en la respuesta de la levadura a los tratamientos con Amino22 y casaminoácidos.

### 3.7. La ruta GAAC controla la expresión del regulón de hierro

Resultados anteriores sugieren que el mecanismo de acción del Amino22 y los casaminoácidos para favorecer el crecimiento y tolerancia a estrés de *S. cerevisiae* se bloquea con la activación constitutiva de Gcn2 y requiere, al menos en parte, la activación de la ruta TORC1. Sin embargo, se ha visto en el apartado R.3.4 que los aminoácidos tienen otro efecto como es el de la represión de genes relacionados con la homeostasis del hierro. Para abordar esta cuestión, se planteó la posibilidad de que los aminoácidos estuviesen provocando un aumento del hierro intracelular y por ello se estuviesen reprimiendo genes regulados por Aft1, puesto que este factor de transcripción responde a los niveles de hierro celulares. De modo que se midió mediante espectrofotometría de absorción atómica el contenido en hierro total de células de levadura de la cepa silvestre y del mutante  $\Delta aft1$  crecidas en presencia de Amino22 y casaminoácidos. Los resultados se exponen en la Figura R.18.



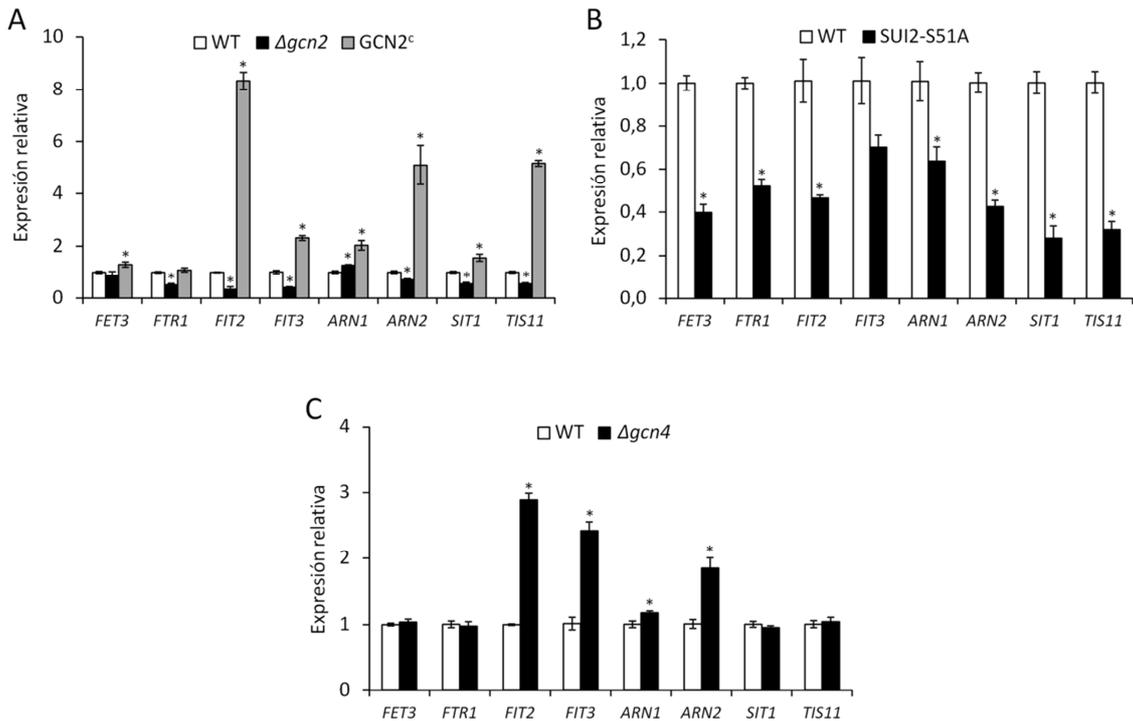
**Figura R.18. La presencia de aminoácidos provoca una disminución en el contenido total de hierro dependiente de AFT1.** Mediante espectrofotometría de absorción atómica se midió la concentración intracelular de hierro en células de la cepa silvestre (WT) y  $\Delta aft1$  cultivadas en medio SD en presencia de Amino22 (AM) y casaminoácidos (AA) hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{560} \approx 0,4$ ). \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ).  $\Delta$ Diferencias significativas respecto al control de la cepa silvestre ( $P < 0,05$ ).

Al contrario de lo que podría esperarse, en las células de la cepa silvestre tratadas con aminoácidos no se observó más cantidad de hierro que en las no tratadas, es más, el contenido

en hierro total en las células crecidas con casaminoácidos fue un 17 % menor que en el control. El tratamiento con Amino22 no provocó diferencias estadísticamente significativas, pero sí se apreció una tendencia hacia una menor cantidad de hierro. El mutante  $\Delta aft1$  mostró un descenso del contenido en hierro respecto a la cepa silvestre, pero éste no varió significativamente cuando fue tratado con aminoácidos. Estos resultados sugieren que en las células de levadura tratadas con aminoácidos se produce un descenso del contenido intracelular de hierro mediado, posiblemente, por Aft1.

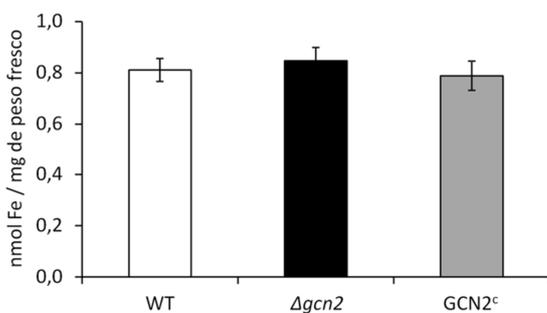
En vista de la relación existente entre la regulación de la homeostasis de aminoácidos y la de hierro, se quiso investigar si la ruta GAAC podría estar implicada. Para ello, se analizó la expresión de 8 genes regulados por Aft1 y reprimidos por aminoácidos (apartado R.3.4) en los mutantes  $\Delta gcn2$  y  $GCN2^c$ . De esos 8 genes, 6 (*FTR1*, *FIT2*, *FIT3*, *ARN2*, *SIT1* y *TIS11*) resultaron estar reprimidos en el mutante de pérdida de función de *GCN2*, mientras que 7 de ellos (*FET3*, *FIT2*, *FIT3*, *ARN1*, *ARN2*, *SIT1* y *TIS11*) se indujeron en células con la forma constitutivamente activa del gen (Figura R.19A). Con el objetivo de comprobar a través de otro mutante que Gcn2 controla la expresión de los genes del regulón de Aft1, se usó una cepa con una mutación en el sitio de fosforilación de Sui2/eIF2 $\alpha$  (S51A). La subunidad eIF2 $\alpha$  de este mutante no puede ser fosforilada por Gcn2 y, por tanto, la cepa no tiene capacidad de activar la respuesta a ayuno de aminoácidos que tiene como consecuencia la derrepresión de la traducción de *GCN4* y la inhibición de la síntesis general de proteínas. Como se esperaba, el mutante SUI2-S51A mostró una marcada represión en los genes estudiados, siendo la expresión de 6 de ellos (*FET3*, *FTR1*, *FIT2*, *ARN2*, *SIT1* y *TIS11*) al menos 2 veces inferior que en la cepa silvestre (Figura R.19B). La expresión de estos genes fue también estudiada en otro mutante de la ruta que carece del factor de transcripción Gcn4, regulado a nivel traduccional por Gcn2 y responsable la biosíntesis y toma de aminoácidos (ver Introducción). En el mutante  $\Delta gcn4$  se indujeron significativamente 4 genes (*FIT2*, *FIT3*, *ARN1* y *ARN2*), aunque solo 3 de ellos más de 1,5 veces (Figura R.19C). Por consiguiente, queda claro que la represión del regulón de Aft1 por aminoácidos depende de la inhibición de la proteína quinasa Gcn2 pero no del factor de transcripción Gcn4. Un posible mecanismo es que Gcn2 activase Aft1 a través de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .

## Resultados



**Figura R.19. La ruta GAAC regula la expresión de los genes involucrados en la homeostasis de hierro.** Mediante qRT-PCR se determinó la expresión relativa de genes del sistema de transporte de hierro de alta afinidad en células de las cepas mutantes (A)  $\Delta gcn2$  y  $GCN2^c$ ,  $SUI2-S51A$  (B) y  $\Delta gcn4$  (C) respecto a sus respectivas cepas silvestres (WT). En el momento de la extracción de las muestras de RNA, las células habían sido crecidas en medio SD hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ). \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ).

Estos resultados refuerzan la idea de que los aminoácidos regulan a nivel transcripcional los genes involucrados en la homeostasis de hierro a través un mecanismo dependiente de la ruta GAAC, lo que explicaría que cuando hay aminoácidos y, por tanto, una baja actividad de la kinasa Gcn2, el regulón de Aft1 se reprima, mientras que cuando hay escasez de aminoácidos y Gcn2 se activa, el regulón se induzca. Como se había hecho anteriormente para los tratamientos con aminoácidos, se quiso comprobar si los cambios de expresión en los genes regulados por Aft1 que se observaron en los mutantes de la ruta GAAC pudieran tener su origen en alteraciones del contenido intracelular de hierro. Tal y como se indica en la Figura R.20, las células de los mutantes  $\Delta gcn2$  y  $GCN2^c$  no mostraron diferencias en la cantidad de hierro total respecto a la cepa silvestre.

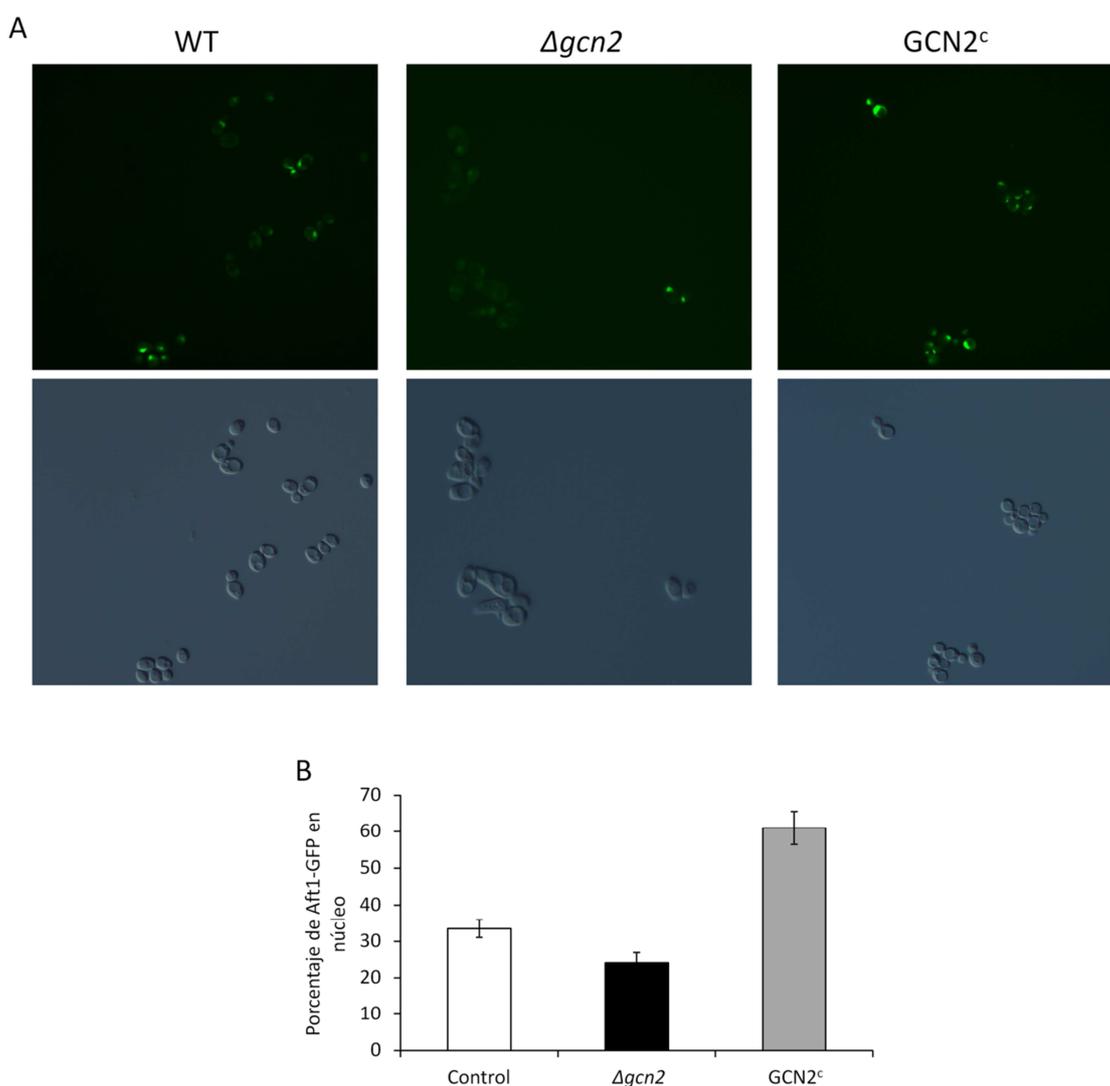


**Figura R.20. Los mutantes de  $GCN2$  no presentan alteraciones en el contenido intracelular de hierro.** Mediante espectrofotometría de absorción atómica se midió la concentración intracelular de hierro en células de la cepa silvestre (WT),  $\Delta gcn2$  y  $GCN2^c$  cultivadas en medio SD hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ).

Aunque probablemente Gcn2 active a Aft1 y por tanto el transporte de hierro, esto sugiere que o bien otros mecanismos homeostáticos mantienen constante el hierro intracelular o bien la expresión de los transportadores de hierro en las condiciones estudiadas no es lo

suficientemente alta en términos absolutos como para que las diferencias de expresión observadas entre cepa silvestre y mutantes conlleven cambios perceptibles en el contenido en hierro total.

Un paso clave para la activación transcripcional mediada por Aft1 es su translocación del citosol al núcleo, por lo que se espera que en células en las que su regulón está inducido, Aft1 se encuentre mayoritariamente en el núcleo, mientras que en células con el regulón reprimido, su localización sea principalmente citoplasmática. Con el objetivo de seguir el movimiento de Aft1 en las cepas mutantes  $\Delta gcn2$ , GCN2<sup>c</sup> y en la cepa silvestre, éstas fueron transformadas con un plásmido que expresa Aft1 marcado con GFP bajo el control de su promotor endógeno. Las células se crecieron en medio pobre en hierro hasta la fase estacionaria (Figura R.21, A y B).

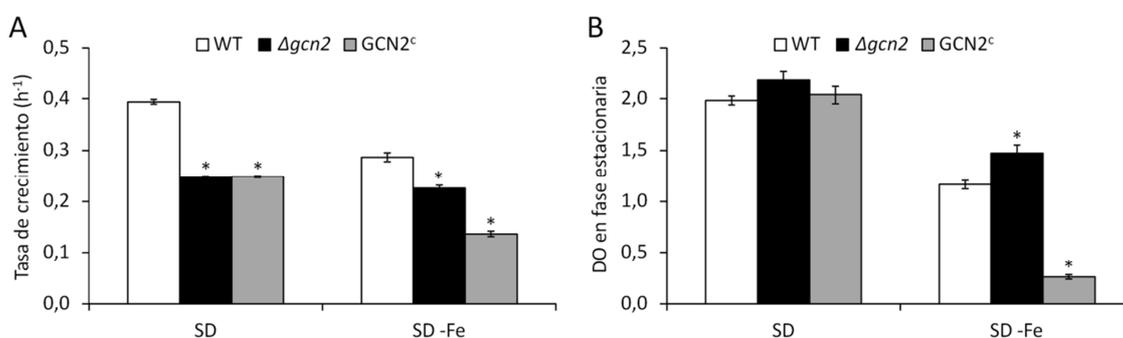


**Figura R.21. La activación de Gcn2 provoca la localización de Aft1 en el núcleo.** A) Células de la cepa silvestre (WT),  $\Delta gcn2$  y GCN2<sup>c</sup> fueron transformadas con un plásmido de alto número de copias que expresa Aft1 marcado con GFP bajo su promotor endógeno. Las células se crecieron hasta la fase estacionaria en medio SD pobre en hierro (SD + 20  $\mu$ M de BPS) y la localización subcelular de Aft1-GFP se determinó mediante microscopía de fluorescencia. B) El porcentaje de células mostrando Aft1-GFP en el núcleo fue cuantificado.

## Resultados

En el mutante  $\Delta gcn2$ , Aft1-GFP tuvo una localización principalmente citosólica, con el 24 % de células mostrando localización nuclear, mientras que en el mutante  $GCN2^c$  Aft1-GFP se detectó en el núcleo de aproximadamente el 61 % de las células. Las células de la cepa silvestre mostraron un comportamiento intermedio, con Aft1-GFP situado en el núcleo del 34 % de las células. Estos datos contribuyen a demostrar que Gcn2 controla el regulón de hierro de una manera dependiente de Aft1.

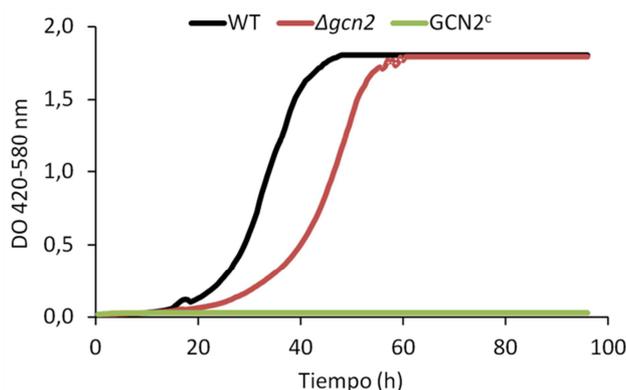
Tal y como se ha comentado en la introducción, el mecanismo por el cual la levadura percibe los niveles de hierro intracelulares está relacionado con la formación de complejos Fe/S, por lo que, aunque no haya cambios en la cantidad de hierro total en las células, variaciones en la síntesis o percepción de dichos complejos en los mutantes de Gcn2 podrían explicar las diferencias en la localización de Aft1 y, por lo tanto, en la expresión del regulón de hierro. De manera que se pensó que si las células del mutante  $GCN2^c$  tienen una deficiencia en la síntesis de los complejos Fe/S, también mostrarían una mayor sensibilidad creciendo en un medio pobre en hierro. De acuerdo con esta hipótesis, el mutante  $\Delta gcn2$  podría tener una mayor tolerancia a la falta de hierro. Efectivamente, tal y como se observa en la Figura R.22A, mientras que en medio pobre en hierro el control de la cepa silvestre sufrió un descenso del 27 % en la tasa de crecimiento respecto al medio SD normal, el descenso en la cepa  $\Delta gcn2$  fue sólo del 9 %. En cambio, la disminución respecto al medio normal en la velocidad de crecimiento del mutante  $GCN2^c$  fue del 45 %. En cuanto al rendimiento de los cultivos en fase estacionaria crecidos en medio SD normal no se observaron diferencias significativas entre los mutantes y la cepa silvestre, sin embargo, en medio con bajo hierro, el rendimiento del mutante  $\Delta gcn2$  fue un 26 % mayor que en la cepa silvestre, mientras que el del mutante  $GCN2^c$  fue un 78 % inferior (Figura R.22B).



**Figura R.22. La pérdida de función de  $GCN2$  proporciona tolerancia a medio pobre en hierro mientras que su activación constitutiva da mayor sensibilidad.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de cultivos de la cepa silvestre (WT) y de los mutantes  $\Delta gcn2$  y  $GCN2^c$  crecidos en medio normal (SD) y medio pobre en hierro (SD -Fe: SD con YNB sin hierro + 5  $\mu$ M BPS). \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ).

Estos datos apoyan la hipótesis antes propuesta de que los mutantes  $\Delta gcn2$  y  $GCN2^c$  presentan fenotipos de crecimiento opuestos en medio pobre en hierro, mostrando el primero una mayor tolerancia y el segundo una mayor sensibilidad. Siguiendo con esta línea de argumentación, el mutante  $GCN2^c$  debería tener dificultades para crecer en un medio de cultivo en el que la levadura se vea “forzada” a activar el metabolismo respiratorio en detrimento del fermentativo, ya que los procesos respiratorios que tienen lugar en las mitocondrias requieren numerosas enzimas que utilizan complejos Fe/S como cofactores. Así

pues, se crecieron los mutantes  $\Delta gcn2$  y  $GCN2^c$  en medio mínimo con galactosa (SGal). En dicho medio, el mutante con la versión constitutivamente activa de  $GCN2$  fue incapaz de crecer (Figura R.23). El mutante nulo, por el contrario, sí creció y alcanzó un rendimiento en la fase estacionaria igual al de la cepa silvestre. Pese a que este mutante tuvo un mayor retraso para iniciar el crecimiento (fase de latencia) y una menor velocidad de crecimiento en la fase exponencial que la cepa silvestre, no se consideró un efecto particular del medio con galactosa ya que estos fenómenos también tuvieron lugar en medio SD (Datos de duración de la fase de latencia en medio SD no mostrados). Para consultar los datos de tasa de crecimiento y rendimiento de los cultivos de los mutantes  $\Delta gcn2$  y  $GCN2^c$  ver Figura R.16).



**Figura R.23. El mutante  $GCN2^c$  es incapaz de crecer en medio con galactosa como fuente de carbono.** Curvas de crecimiento de cultivos de la cepa silvestre (WT) y de los mutantes  $\Delta gcn2$  y  $GCN2^c$  incubados durante 96 horas en medio SGal.

#### 4. Estudio del mecanismo de acción del bioestimulante Fulvato potásico

El Fulvato potásico resultó proteger frente a estreses osmótico, oxidativo y por altas temperaturas, por lo que este bioestimulante también fue elegido para el estudio de su mecanismo de acción, comenzando con un análisis de la expresión global de genes mediante micromatrices de DNA.

##### 4.1. El Fulvato potásico provoca un aumento en el contenido intracelular de hierro y la represión de los genes del regulón de Aft1

El análisis transcriptómico se basó en cuatro experimentos independientes de células crecidas hasta la mitad de la fase exponencial en medio SD y en ausencia de estrés. En el tratamiento con Fulvato potásico se encontraron tan solo 12 genes diferencialmente expresados, todos ellos reprimidos (Tabla R.5). Las anotaciones génicas desconocidas se consultaron en la base de datos SGD, sin embargo, fue sorprendente descubrir que, al igual que ocurrió con el Amino22, 9 de los 12 genes (*TIS11*, *SIT1*, *FET3*, *CCC2*, *FTR1*, *COT1*, *FIT2*, *ARN1* y *ARN2*) están regulados por el factor de transcripción Aft1. También se reprimieron los genes de una subunidad del receptor de la partícula de reconocimiento de señal (SRP, del inglés *Signal Recognition Particle*) y de un componente del complejo GARP (*Golgi-Associated Retrograde Protein*), además, apareció reprimido el RNA mensajero de una ORF que probablemente no codifique ninguna proteína funcional. Al tratarse de una ORF que solapa parcialmente con la del gen *CCC2*, es muy posible que aparezca reprimida si la sonda de las micromatrices

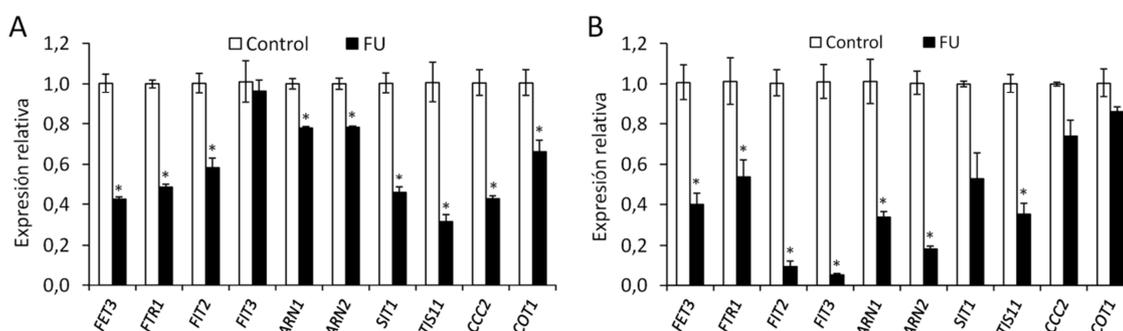
## Resultados

correspondiente a dicha ORF contiene una secuencia de cDNA que también hibride con el mensajero de *CCC2*.

**Tabla R.5. Genes reprimidos en células tratadas con Fulvato potásico (FU) respecto a células sin tratar (control).**

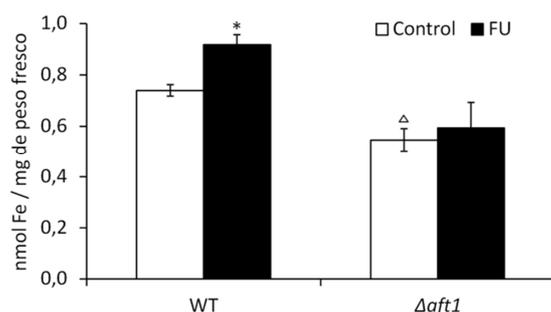
Nombre estándar	Nombre sistemático	Anotación génica	Cociente (control/FU)
<b>Transporte de metales pesados</b>			
<i>TIS11</i>	YLR136C	Proteína de unión a mRNA	3.3
<i>SIT1</i>	YEL065W	Transportador de sideróforos	2.6
<i>FET3</i>	YMR058W	Ferro-O <sub>2</sub> -oxidoreductasa	2.0
<i>CCC2</i>	YDR270W	ATPasa tipo P transportadora de Cu(2+)	1.8
<i>FTR1</i>	YER145C	Permeasa de Fe de alta afinidad	1.8
<i>COT1</i>	YOR316C	Transportador vacuolar de Zn	1.6
<i>FIT2</i>	YOR382W	Manoproteína de la pared celular	1.5
<i>ARN1</i>	YHL040C	Transportador de sideróforos	1.5
<i>ARN2</i>	YHL047C	Transportador de sideróforos	1.5
<b>Miscelánea</b>			
<i>SRP102</i>	YKL154W	Subunidad β del receptor de SRP ( <i>signal recognition particle</i> )	2.6
<i>VPS52</i>	YDR484W	Componente del complejo GARP ( <i>Golgi-associated retrograde protein</i> )	1.6
<b>Desconocida</b>			
-	YDR271C	ORF dudosa. Poco probable que codifique una proteína funcional. Solapa parcialmente con la ORF de <i>CCC2</i>	1.9

El análisis mediante micromatrices se validó realizando qRT-PCRs de los 9 genes del regulón de hierro que habían aparecido reprimidos y de otro gen regulado por Aft1 (*FIT3*). Todos los genes, excepto *FIT3*, mostraron una menor expresión relativa en células tratadas con Fulvato potásico que en células control (Figura R.24A). La represión del regulón de Aft1 también se produjo en un tratamiento con Fulvato potásico bajo condiciones de estrés osmótico y se pudo detectar que la mayoría de genes se reprimen de forma más acentuada que en ausencia de estrés (Figura R.24B).



**Figura R.24. El Fulvato potásico provoca la represión del regulón de Aft1 en ausencia de estrés y en condiciones de estrés osmótico.** Mediante qRT-PCR se determinó la expresión relativa de 10 genes del regulón de Aft1 en células crecidas hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Ab_{560} \approx 0,4$ ) en medio SD normal (A) y en medio SD con sorbitol 1 M (B) en presencia de Fulvato potásico (FU). \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ).

Para averiguar la causa de la represión de los genes del regulón de hierro, se midió su contenido intracelular en células de la cepa silvestre y del mutante  $\Delta aft1$  tratadas con Fulvato potásico. Como se muestra en la Figura R.25, el Fulvato potásico provocó un incremento en el contenido de hierro del 24 % en la cepa silvestre, mientras que en la cepa mutante no se detectaron diferencias significativas. Esto sugiere que el tratamiento con Fulvato potásico aumenta el contenido en hierro total de las células de levadura de una forma dependiente de *AFT1* y es una causa probable de la represión observada en los genes que regulan la homeostasis de hierro.

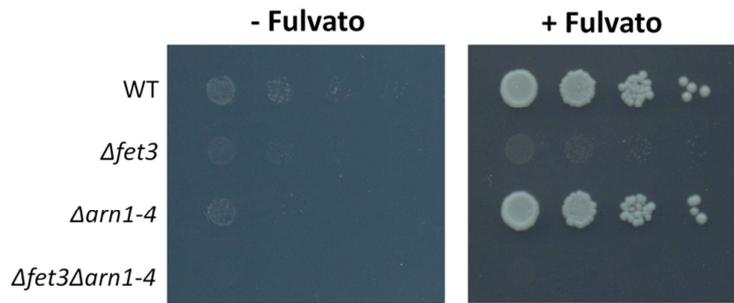


**Figura R.25. El Fulvato potásico provoca un aumento dependiente de *AFT1* en el contenido total de hierro.** Mediante espectrometría de absorción atómica se midió la concentración intracelular de hierro en células de la cepa silvestre (WT) y del mutante  $\Delta aft1$  cultivadas en medio SD en presencia de Fulvato potásico (FU) hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ). \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ).  $\Delta$ Diferencias significativas respecto al control de la cepa silvestre ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2. El uso del Fulvato potásico como fuente de hierro depende de *FET3*.

El hecho de que en el mutante nulo de *AFT1* tratado con Fulvato potásico no se produjese el aumento de contenido en hierro que sí tuvo lugar en la cepa silvestre indica que, probablemente, el hierro fue transportado a través del sistema de transporte de alta afinidad, que como se ha comentado en la introducción, opera a través de dos rutas paralelas. Una de ellas implica un paso de reducción en la cara externa de la membrana plasmática de las células y la otra está mediada por sideróforos. Así que se comprobó si el Fulvato potásico puede funcionar como una fuente de hierro para la levadura y si para ello requeriría la ruta transporte reductiva (dependiente del gen *FET3*) o el sistema de transporte de sideróforos (dependiente de la familia de transportadores *ARN1-4*). Con este objetivo, se utilizaron una serie de cepas del fondo genético YPH499 con mutaciones en cada una de las dos rutas de forma independiente y en ambas a la vez: un mutante simple  $\Delta fet3$ , un cuádruple mutante  $\Delta arn1-4$  y un mutante quíntuple  $\Delta fet3 \Delta arn1-4$ . Bajo ayuno de hierro, no se detectó apenas crecimiento de ninguna de las tres cepas mutantes ni de la cepa silvestre (Figura R.26). En cambio, cuando se añadió Fulvato potásico a medio pobre en hierro, la cepa silvestre y el mutante  $\Delta arn1-4$  pudieron crecer con normalidad, indicando que *S. cerevisiae* puede utilizar el bioestimulante como fuente de hierro y que para su aprovechamiento se requiere el gen *FET3*.

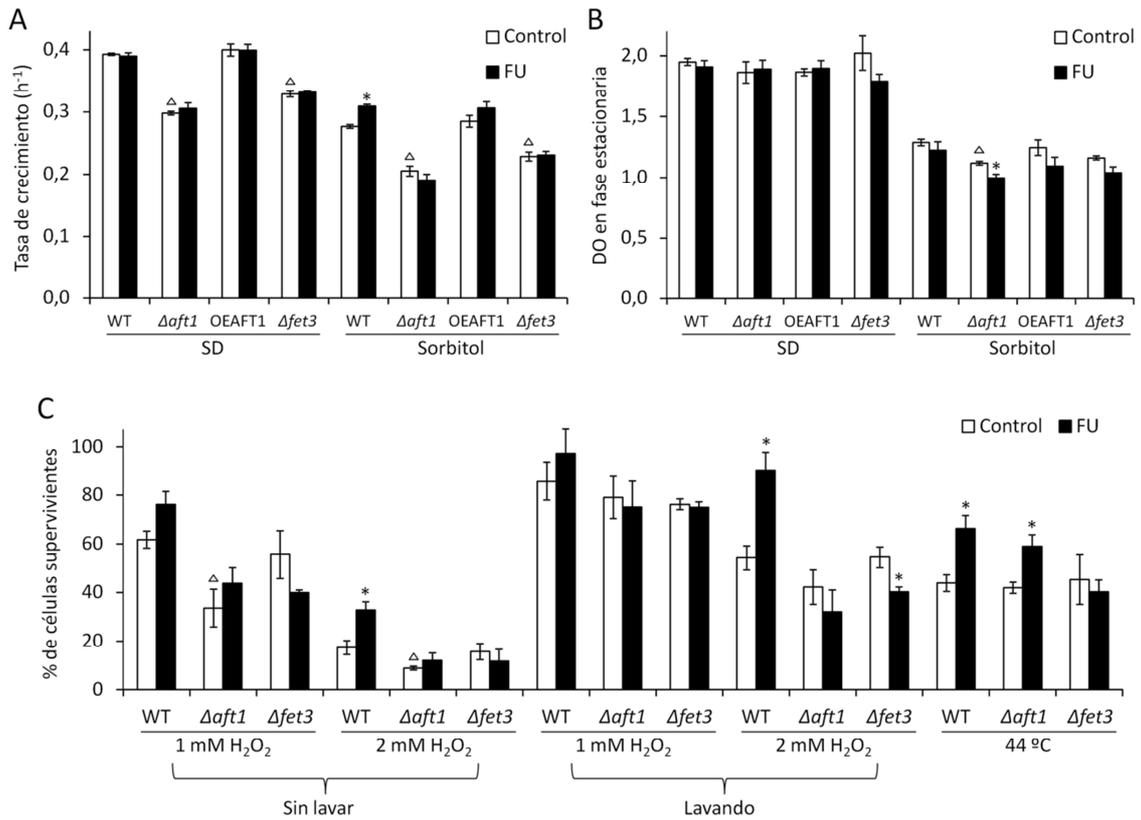
## Resultados



**Figura R.26. Requerimiento de *FET3* para el crecimiento en medio pobre en hierro con Fulvato potásico.** Cepas de los genotipos indicados se replicaron en diluciones seriadas sobre medio SD con YNB sin hierro y 20  $\mu$ M de BPS en ausencia (-Fulvato) o presencia (+Fulvato) de 0.5  $\mu$ l/ml de Fulvato potásico y se incubaron durante 4 días a 28  $^{\circ}$ C.

### 4.3. El incremento de la tolerancia a estrés abiótico en presencia de Fulvato potásico depende de *FET3*

Puesto que la entrada de hierro en presencia de Fulvato potásico dependió del sistema de transporte de alta afinidad y, en concreto, del transportador *FET3* y que la mejora de la tolerancia a estrés correlacionó con un mayor contenido intracelular de hierro en la levadura, se analizó el efecto del bioestimulante sobre los mutantes nulos  $\Delta aft1$  y  $\Delta fet3$  y sobre el mutante de sobreexpresión de *AFT1*. Las características del crecimiento y tolerancia a estrés de los mutantes  $\Delta aft1$  y *OEAFT1* sin tratamiento con el bioestimulante ya se han comentado en el apartado R.3.5. El mutante  $\Delta fet3$  creció más despacio que la cepa silvestre, aunque el rendimiento final de los cultivos en fase estacionaria no cambió significativamente (Figura R.27, A y B). No obstante, el incremento en la tasa de crecimiento que se apreció en la cepa silvestre cuando fue tratada con Fulvato potásico bajo estrés osmótico desapareció en los mutantes  $\Delta aft1$  y  $\Delta fet3$ . En el *OEAFT1* la velocidad de crecimiento con sorbitol tendió a aumentar, aunque no hubieron diferencias significativas. Para analizar la tolerancia a estreses oxidativo y por altas temperaturas en presencia de Fulvato potásico se usaron los mutantes  $\Delta aft1$  y  $\Delta fet3$ . El Fulvato potásico no aumentó la supervivencia a ambos estreses en la cepa  $\Delta fet3$ , a diferencia de lo que ocurrió en la cepa silvestre (Figura R.27C). El bioestimulante tampoco mejoró la tolerancia a estrés oxidativo en el mutante  $\Delta aft1$ , aunque sí a choque térmico.



**Figura R.27. El efecto positivo del Fulvato potásico sobre la tolerancia a estrés depende de *FET3*.** Tasa de crecimiento (A) y densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (B) de la cepa silvestre (WT) y de los mutantes  $\Delta aft1$ , OEAFT1 y  $\Delta fet3$  en presencia de Fulvato potásico (FU) en medio SD normal y en medio SD con sorbitol 1 M. C) Células crecidas en medio SD en presencia de FU hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ) se incubaron con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o a 44 °C durante 30 min. El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue llevado a cabo en el medio de crecimiento original (sin lavar) o en medio fresco sin FU después de haber lavado las células 3 veces con agua MilliQ (lavando). Finalmente se determinó la supervivencia. \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ). <sup>Δ</sup>Diferencias significativas respecto al control de la cepa silvestre ( $P < 0,05$ ).



## DISCUSIÓN



Con el objetivo de facilitar la discusión, se comentan los efectos de los bioestimulantes y sus posibles mecanismos de acción de forma individual. Cabe destacar que todos los bioestimulantes resultaron beneficiosos, en mayor o menor medida, frente a al menos un tipo de estrés abiótico (Tabla R.1). Por consiguiente, su aplicación en la agricultura podría mejorar los rendimientos de los cultivos en determinadas condiciones adversas, teniendo en cuenta la amplia conservación entre *S. cerevisiae* y plantas de los mecanismos generales de respuesta a estrés y, particularmente, de los sistemas homeostáticos involucrados en el efecto de los bioestimulantes estudiados en mayor profundidad: Fulvato potásico y Amino22 (ver apartado I.3). El resto de los bioestimulantes (Extracto de algas, Vinacillas, Fosfito y Ácido húmico) resultaron menos efectivos que los dos anteriores y por tanto su modo de acción no fue objeto de investigación, a pesar de que en la discusión se comentan posibles mecanismos a partir de los resultados de crecimiento y tolerancia a estrés y a la escasa información que se tiene sobre su composición. En cualquier caso, determinar el mecanismo de acción de bioestimulantes que derivan de extracciones complejas y que a menudo son agregados de compuestos de origen orgánico e inorgánico es una tarea realmente complicada, más aún si se tiene en cuenta que, posiblemente, su efecto se deba en muchas ocasiones al resultado de la acción sinérgica de varios de sus componentes.

#### *Extracto de algas*

El único efecto observado sobre la levadura en el tratamiento con Extracto de algas consistió en un ligero aumento de la velocidad de crecimiento bajo condiciones de estrés salino. Dicho aumento resultó más evidente a medida que se incrementó la concentración de NaCl (Figuras R.7A, R.9A y R.10A). Además, fue el único bioestimulante junto al Amino22 que no tuvo efectos inhibitorios en ninguna de las diferentes condiciones de crecimiento estudiadas, ni siquiera con la dosis de empleo más alta (Figuras R.3-8). A priori podría esperarse que el Extracto de algas tuviese una mayor influencia positiva sobre el crecimiento y tolerancia a estrés, tal y como ocurre en plantas. Se han demostrado los beneficios que producen tratamientos con extractos de distintas especies de algas sobre el rendimiento y calidad de las cosechas gracias a su contenido en múltiples compuestos con actividad estimulante del crecimiento y de la protección frente a estrés (Khan *et al.*, 2009). Por ejemplo, los extractos de algas aportan directamente e inducen la producción endógena de hormonas con la capacidad de promover el desarrollo radicular, especialmente compuestos tipo auxina, y de mejorar la floración, el desarrollo del fruto y la tolerancia a estrés, sobre todo compuestos con actividad citoquinina (Khan *et al.*, 2009; Calvo *et al.*, 2014). Las betaínas, presentes en los extractos de algas, están involucradas en la tolerancia a estrés en plantas (Ashraf y Foolad, 2007). Además, éstas parecen favorecer la acumulación de clorofila en las hojas a través de un descenso en la degradación de la misma, lo que correlaciona con mayores rendimientos (Whapham *et al.*, 1993; Blunden *et al.*, 1997). Asimismo, los extractos de algas mejoran la fertilidad del suelo, incrementan su capacidad de retención de la humedad y promueven el crecimiento de microorganismos beneficiosos (Khan *et al.*, 2009; Craigie, 2011). Por lo tanto, es probable que buena parte de los compuestos que contienen beneficien particularmente a los cultivos vegetales pero no a *S. cerevisiae*, lo que justificaría el nulo efecto del Extracto de algas sobre la levadura en ausencia de estrés y bajo condiciones de estrés osmótico, oxidativo y térmico. En cambio, la mejora que produjo el Extracto de algas en el crecimiento con estrés salino sugiere que este bioestimulante contiene compuestos que, bien directamente o bien mediante la

## Discusión

estimulación de rutas de defensa, actúan de forma específica frente a dicho estrés. Aparte del desajuste osmótico y los estreses derivados como la producción de ROS (ver apartado 1.2.3), el estrés salino provoca la acumulación de  $\text{Na}^+$  a niveles tóxicos en las células. Una importante diferencia entre levadura y plantas es que en levadura la toxicidad del  $\text{Cl}^-$  no es significativa, mientras que en plantas puede ser tan importante como la toxicidad del  $\text{Na}^+$  (Serrano y Gaxiola, 1994). Los principales efectos tóxicos del  $\text{Na}^+$  consisten en la disminución de la entrada de cationes esenciales como el  $\text{K}^+$  y la inhibición de la actividad de numerosas enzimas (Mahajan y Tuteja, 2005). La reducción del cociente  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  de la célula en presencia de  $\text{NaCl}$  compromete su viabilidad (Cakmak, 2005; Yenush, 2016). El  $\text{Na}^+$  inhibe la entrada de  $\text{K}^+$  por dos mecanismos: compite con el  $\text{K}^+$  por la entrada a través de sistemas de baja afinidad y depolariza la membrana plasmática, lo cual inhibe la entrada de  $\text{K}^+$  (Blumwald *et al.*, 2000; Hasegawa *et al.*, 2000). Además, altas concentraciones de sal (a partir de 0,4 M) alteran la estructura de las proteínas, mientras que con concentraciones menores (de en torno a 0,1 M) el  $\text{Na}^+$  actúa como inhibidor competitivo en los sitios de unión específicos de las enzimas que emplean cofactores catiónicos como el  $\text{K}^+$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  (Serrano *et al.*, 1999). En el caso de la enzima Hal2 de levadura, el  $\text{K}^+$  contrarresta la inhibición causada por el desplazamiento del  $\text{Mg}^{2+}$  esencial por el  $\text{Na}^+$  (Murguía *et al.*, 1995), en lo que podría ser una característica general en sus dianas de toxicidad (Serrano *et al.*, 1999).

En plantas, se ha descrito el incremento de tolerancia a condiciones de salinidad con tratamientos basados en extractos de algas (Nabati *et al.*, 1994). Asimismo, estos extractos parecen tener capacidad quelante y aumentan la disponibilidad y la toma de nutrientes minerales, entre ellos el K (Khan *et al.*, 2009; Calvo *et al.*, 2014). Beckett y van Staden (1989) mostraron que un extracto de algas aumenta la tolerancia a deficiencia de K en plantas de trigo. Más tarde, en experimentos con plantas de vid, se relacionó el tratamiento con un extracto de algas a una mayor toma de  $\text{K}^+$  unida a un mayor crecimiento y una mayor acumulación de macronutrientes en los órganos vegetales (Mancuso *et al.*, 2006). En este mismo trabajo el extracto de algas aumentó la tolerancia a estrés hídrico. Recientemente, la aplicación de extractos de algas en almendro se ha asociado a una mayor toma de  $\text{K}^+$  y un mayor crecimiento, tanto en condiciones de suficiencia de K y como en su deficiencia (Saa *et al.*, 2015). Además, en plantas y en levadura, el aumento de la toma de  $\text{K}^+$  es una de las respuestas típicas de las células a condiciones de estrés salino y parece correlacionar con la capacidad de tolerancia a dicho estrés (Serrano y Gaxiola, 1994; Serrano *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos en esta investigación, junto con la información aportada por los trabajos publicados en plantas y levadura, sugieren que el bioestimulante Extracto de algas podría estar favoreciendo la toma de  $\text{K}^+$  en las células de levadura, suplementando el medio de cultivo con K o ambas cosas al mismo tiempo. Previamente, la adición de iones  $\text{K}^+$  se ha demostrado beneficiosa para la tolerancia a estrés salino en levadura (Narasimhan *et al.*, 2004). En el tratamiento con Extracto de algas bajo condiciones de estrés salino, una mayor entrada de  $\text{K}^+$  prevendría en cierta medida la entrada de  $\text{Na}^+$  (al reducir la polaridad de la membrana plasmática y competir por el transporte), restauraría parcialmente el cociente  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  y contrarrestaría la inhibición de las enzimas causada por el  $\text{Na}^+$ , incrementando la tolerancia de la levadura al estrés. Además, el  $\text{K}^+$  contribuiría a ajustar el equilibrio osmótico celular (Hasegawa *et al.*, 2000). No obstante, haría falta una investigación más exhaustiva para poder afirmar que la tolerancia a estrés salino observada en el tratamiento con Extracto de

algas se debe efectivamente a una mayor entrada de  $K^+$  en las células. En cualquier caso, este posible mecanismo de tolerancia a NaCl en el tratamiento con Extracto de algas sería extrapolable a células vegetales (Serrano y Gaxiola, 1994), de modo que, aunque los efectos y mecanismos de acción de los extractos de algas frente a estrés salino siguen estando poco caracterizados en plantas, al menos parte de la tolerancia que parecen proporcionar frente a dicho estrés podría explicarse por una mayor entrada de  $K^+$  en los tejidos.

#### *Vinacillas*

El tratamiento con Vinacillas mejoró la tasa de crecimiento bajo condiciones de estrés salino, tanto en medio SD (Figuras R.9A y R.10A) como en las pruebas preliminares en medio YPD (Figura R.1A), y resultó aumentar la supervivencia tras choque térmico (Figura R.9C). Asimismo, produjo una ligera disminución en el rendimiento de los cultivos tanto en ausencia como en presencia de estrés (Figuras R.9B y R.10B). Dicha reducción pareció depender de la dosis de Vinacillas empleada (Figuras R.1B y R.6B). En este caso, al desconocerse completamente la composición del bioestimulante, es especialmente difícil especular sobre el modo en el que éste ejerce sus efectos sobre las células de *S. cerevisiae*. El hecho de que tenga lugar un aumento en la velocidad de crecimiento en presencia de NaCl pero no en la de sorbitol indica que el Vinacillas actúa específicamente frente a la toxicidad del  $Na^+$  y no frente al estrés osmótico. Una posibilidad es que el Vinacillas contenga compuestos capaces de conferir protección a las proteínas de la levadura frente a la desnaturalización que provocan concentraciones salinas superiores a 0,4 M debido a la alteración del equilibrio hidrofóbico-electrostático entre las fuerzas que mantienen las estructuras proteicas (Wyn-Jones y Pollard, 1983). La protección de las proteínas también podría explicar la tolerancia a choque térmico gracias a una disminución en la desnaturalización y agregación de éstas durante el estrés. No obstante, no se pueden descartar otras posibilidades, como que el bioestimulante aporte nutrientes cuya entrada en la célula se inhiba bajo condiciones de estrés (por ejemplo el K durante el estrés salino) o que contenga compuestos que protejan a las membranas frente a choque térmico. Por otro lado, es probable que la menor densidad óptica en la fase estacionaria sea consecuencia de la interferencia de uno o varios componentes del bioestimulante con la respiración mitocondrial, lo que se traduciría en una inhibición del crecimiento tras la diauxia. Tal y como se ha comentado en la introducción, es al llegar a esta fase cuando la levadura, tras agotar la glucosa, cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio para el cual requiere una alta actividad mitocondrial que le permita consumir el etanol producido durante la fase fermentativa. Ciertos componentes del bioestimulante podrían inhibir algunas enzimas o dificultar determinadas reacciones que tienen lugar durante la respiración mitocondrial, disminuyendo su eficiencia y afectando negativamente al rendimiento de los cultivos en la fase estacionaria.

#### *Fosfito*

El Fosfito confirió protección frente a estrés salino, aumentando la velocidad de crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Figuras R.9 y R.10, A y B), y frente a estrés por choque térmico (Figura R.9C). En cambio, inhibió la tasa de crecimiento en ausencia de estrés en medio de cultivo SD (Figura R.9A) y, de forma más fuerte, también la inhibió en medio YPD (Figura R.1A). La inhibición de la velocidad de crecimiento en las células tratadas con Fosfito se pudo

## Discusión

contrarrestar añadiendo un exceso de fosfato al medio de cultivo (Figura R.2), lo que no fue sorprendente puesto que se sabe que el fosfito es un análogo no metabolizable del fosfato que resulta tóxico al impedir la adaptación de la levadura (y de las plantas) al ayuno de fosfato (Carswell *et al.*, 1996; McDonald *et al.*, 2001b; Ticconi *et al.*, 2001). Por otra parte, los efectos positivos del Fosfito sobre la tolerancia a estrés podrían ser debidos al K presente en su composición. Como se explica en el apartado M.2, el compuesto referido aquí como Fosfito es una combinación de fosfito (30 % p/p) y K (20 % p/p). La presencia del Fosfito en el medio de cultivo aportaría  $K^+$ , que, en el caso del estrés salino, contribuiría a mantener un cociente  $K^+/Na^+$  intracelular alto en relación al tratamiento control y contrarrestaría parte de los efectos negativos de la sal. Además, el  $K^+$  ayudaría a mantener un balance osmótico más adecuado, lo que, en presencia de sorbitol, podría compensar la inhibición en la velocidad de crecimiento que causa el Fosfito sin estrés (Figura R.9A). Asimismo, los resultados parecen indicar que una mejora en el aporte de K en condiciones de estrés por choque térmico podría aumentar la tolerancia de los cultivos tratados con Fosfito. Por lo tanto, puesto que no se han demostrado efectos nutricionales ni bioestimulantes previamente en el uso de productos basados en fosfito (Thao y Yamakawa, 2009), lo más probable es que el beneficio del tratamiento con este bioestimulante sobre la tolerancia a estrés se deba a la suplementación con K.

### Ácido húmico

El tratamiento con Ácido húmico inhibió ligeramente la tasa de crecimiento en ausencia de estrés y bajo estrés salino (Figura R.9A). En las pruebas preliminares, la inhibición de la velocidad de crecimiento dependió de la dosis de bioestimulante empleada y también se observó bajo estrés osmótico (Figura R.8A). Además, los cultivos tratados con las dosis altas del bioestimulante (1 y 2  $\mu\text{l/ml}$ ) tuvieron rendimientos en la fase estacionaria sensiblemente inferiores a aquellos tratados con la dosis de uso elegida (0,5  $\mu\text{l/ml}$ ), especialmente en ausencia de estrés y bajo estrés salino (Figura R.8B). Los ácidos húmicos se caracterizan por contener en general compuestos con un elevado peso molecular y unirse a las paredes de las células vegetales (Nardi *et al.*, 2002; 2009). Sus principales beneficios en la agricultura consisten en la mejora de la estructura del suelo y de la disponibilidad de nutrientes y en favorecer el desarrollo radicular (consecuencia de su actividad tipo auxina), lo cual conlleva un mayor crecimiento y rendimiento de los cultivos (Trevisan *et al.*, 2010; Calvo *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha documentado que aplicaciones de ácidos húmicos en cantidades supraóptimas pueden inhibir el crecimiento de las plantas (Vallini *et al.*, 1993; Atiyeh *et al.*, 2002; Asli y Neumann, 2010) y se ha sugerido que podría deberse a que la acumulación de agregados supramoleculares de ácidos húmicos en las paredes celulares de las raíces limita el transporte de agua y provoca una reducción en el crecimiento de la parte aérea (Asli y Neumann, 2010). En levadura, que como las células vegetales tiene pared celular, buena parte de los ácidos húmicos también podrían quedar unidos a la superficie celular, siendo ésta una posible causa de la disminución en el crecimiento con concentraciones elevadas de Ácido húmico. Asimismo, se ha constatado en raíces de arroz que tratamientos con altos niveles de ácidos húmicos elevan la producción de ROS, pudiendo causar la peroxidación de los lípidos y afectar negativamente al crecimiento y desarrollo radicular, mientras que los tratamientos con niveles moderados sí favorecen el crecimiento y no causan la peroxidación de lípidos (Berbara y García, 2014). Por ello un exceso de estas sustancias podría tener efectos negativos también a nivel de estrés oxidativo.

Por otra parte, el Ácido húmico mejoró la tolerancia de las células de levadura a estrés oxidativo y a estrés térmico (Figura R.9C). Pese a producir un claro aumento en la supervivencia al estrés oxidativo causado por el tratamiento con  $H_2O_2$ , se demostró que el Ácido húmico no actúa degradando directamente este compuesto en el medio de cultivo (Figura R.9D). En cambio, el bioestimulante podría ser capaz de eliminar otras ROS o activar sistemas celulares antioxidantes cuando se usa en cantidades moderadas. Por ejemplo, en estudios llevados a cabo en plantas de arroz, los ácidos húmicos resultaron tener efectos positivos frente al estrés oxidativo generado bajo estrés hídrico, reduciendo el contenido en  $H_2O_2$  (García *et al.*, 2012; 2013) y favoreciendo una mayor conservación de la permeabilidad de las membranas (García *et al.*, 2012). El estrés por altas temperaturas también genera estrés oxidativo y, por lo tanto, el ligero aumento en la tolerancia a choque térmico en el tratamiento con Ácido húmico podría tener su causa en una mayor protección frente a ROS. Teniendo en cuenta la capacidad de las sustancias húmicas para quelar iones, no se puede descartar que este bioestimulante favorezca la toma de algún nutriente que sea deficitario bajo situaciones de estrés oxidativo y térmico, como parece ser el caso del Fulvato potásico.

#### Amino22

El tratamiento con este bioestimulante basado en aminoácidos fue el más efectivo en la mejora del crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura. Se observó un considerable incremento tanto en la tasa de crecimiento como en el rendimiento de los cultivos crecidos en ausencia de estrés y bajo estrés osmótico (Figura R.9 A y B). El Amino22 también mejoró el crecimiento bajo estrés salino (NaCl 0,64 M), si bien el aumento en ambos parámetros fue sensiblemente menor que en ausencia de estrés o con sorbitol. Es más, con NaCl 1 M elevó ligeramente la velocidad de crecimiento pero no hubieron diferencias significativas en cuanto al rendimiento de los cultivos en la fase estacionaria (Figura R.10 A y B). Asimismo, el tratamiento con Amino22 supuso un importante incremento en la supervivencia de las células después de ser sometidas a estrés oxidativo y a choque térmico (Figura R.9C), pese a que se constató que el compuesto no tiene capacidad para degradar  $H_2O_2$  (Figura R.9D). Los resultados del tratamiento con Amino22 indican que su efecto positivo sobre el crecimiento no es específico de estrés y que la salinidad reduce considerablemente dicho efecto. Zaborske y colaboradores (2009) demostraron que el NaCl provoca la acumulación de tRNAs descargados y la activación de la quinasa Gcn2 con la consiguiente fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Por lo tanto, el hecho de que la mejora del crecimiento bajo estrés salino en el tratamiento con Amino22 fuese mucho menor que en condiciones normales o bajo estrés osmótico se debe probablemente a la deacilación de tRNAs en presencia de NaCl, lo cual tendría como consecuencia la pérdida de efectividad de la aplicación de aminoácidos. Sin embargo, el origen de la deacilación de los tRNAs bajo estrés salino no está completamente claro. La alta salinidad afecta negativamente a la toma de aminoácidos (Norbeck y Blomberg, 1998; Goosens *et al.*, 2001; Pascual-Ahuir *et al.*, 2001; Uesono y Toh-e, 2002). En este sentido, el balance  $K^+/Na^+$  parece ser crucial y su desajuste en presencia de NaCl alteraría el potencial eléctrico de la membrana plasmática, lo cual perjudicaría al transporte de nutrientes (Narasimhan *et al.*, 2004). Sin embargo, altas concentraciones tanto de  $Na^+$  como de  $K^+$  inhiben por igual la toma de aminoácidos pero solo el  $Na^+$  activa la ruta GAAC (Goosens *et al.*, 2001). Ello unido al hecho de que el NaCl también produce acumulación de tRNAs deacilados en células crecidas con exceso de aminoácidos y en células de cepas protótrofas, capaces de sintetizar todos los

## Discusión

aminoácidos, indica que a la activación de Gcn2 contribuyen otros procesos celulares más allá de la perturbación de la síntesis y del transporte de aminoácidos (Narasimhan *et al.*, 2004; Zaborske *et al.*, 2009). Por ejemplo, la activación de Gcn2 por rapamicina, que también requiere un dominio HisRS funcional (Narasimhan *et al.*, 2004), se debe a la defosforilación de la Ser577 de Gcn2 mediada por TORC1 de forma que aumenta su afinidad por tRNAs descargados (Cherkasova y Hinnebusch, 2003). Esto muestra que la regulación de Gcn2 podría tener lugar a través de rutas de señalización alternativas que actuaran independientemente o en paralelo a la deacilación de tRNAs. No obstante, Hueso y colaboradores (2012) determinaron que bajo estrés por acidificación intracelular se produce la deacilación de tRNA<sup>leu</sup> pero no disminuyen los niveles de leucina, lo que sugiere que la quinasa Gcn2 puede ser activada sin ayuno de aminoácidos en condiciones de estrés que inhiban las enzimas aminoacil-tRNA sintetasas y, en consecuencia, provoquen la acumulación de tRNAs descargados. La deacilación de tRNAs podría ser, por tanto, una señal activada por múltiples estreses, no solo el ayuno de aminoácidos, que permitiese a las células reducir el crecimiento y el gasto energético y reprogramar su metabolismo en situaciones en las que ve comprometida su viabilidad. Por otro lado, el tratamiento con Amino22 apenas tuvo efecto en las pruebas preliminares en medio rico YPD, ya que tan solo mejoró la tasa de crecimiento y el rendimiento bajo estrés salino y ligeramente el rendimiento con estrés osmótico (Figura R.1 A y B). Dado que añadir el bioestimulante no constituye una ventaja en condiciones normales, se deduce que este medio de cultivo contiene aminoácidos en exceso. Sin embargo, el incremento de la tolerancia frente a estrés salino se explicaría porque el aporte adicional de aminoácidos a un medio ya de por sí rico en estos nutrientes podría compensar parcialmente la deacilación de tRNAs causada por el NaCl.

El Amino22 fue objeto de una investigación más intensiva con el propósito de desentrañar su mecanismo de acción. Se sabía que este bioestimulante está basado en una mezcla de aminoácidos obtenida por hidrólisis química, no obstante, se consideró la posibilidad de que otros componentes de origen no proteico presentes en este hidrolizado pudiesen contribuir a su efecto estimulador sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés. Se determinó que la adición de 1 g/l de casaminoácidos tiene el mismo efecto sobre la levadura que el tratamiento con Amino22 (Figura R.11), lo que llevó confirmar que el principio activo del bioestimulante son los aminoácidos. Por esta razón se tomó el tratamiento con 1 g/l de casaminoácidos como un control de composición conocida en sucesivos experimentos. El análisis individual de cada uno de los aminoácidos que componen el hidrolizado de caseína ácida mostró que el incremento que éste produce en la tasa de crecimiento y en el rendimiento de los cultivos en ausencia de estrés (Figura R.12 A y B) y bajo estrés osmótico (Figura R.12 C y D) se debe, probablemente, a un efecto aditivo de los distintos aminoácidos, si bien algunos de ellos parecen tener mayor repercusión que otros a la hora de mejorar los parámetros analizados. En la tabla R.2 se muestra una selección de los aminoácidos que resultaron influir de forma más positiva en el crecimiento de la levadura (con y sin estrés) a partir de la cual se diseñaron combinaciones cuyo efecto fue evaluado. El tratamiento con la combinación de los aminoácidos Glu, Ile, Leu y Phe (C2) no mostró diferencias significativas respecto al tratamiento con el Amino22 y tuvo unos resultados muy similares al tratamiento con casaminoácidos (Figura R.12 E y F). Otras combinaciones a las que a los cuatro aminoácidos recién mencionados se les añadió o bien Arg (C3) o bien Arg y Val (C4) tampoco presentaron

diferencias significativas respecto a la C2. Estos resultados sugieren que los aminoácidos de la C2 son los más relevantes para la mejora del crecimiento observada en las células tratadas con el hidrolizado de caseína ácida. La combinación C1 (que contiene solo Ile, Leu y Phe) incrementó considerablemente el rendimiento de los cultivos tanto en ausencia de estrés como con estrés osmótico (Figura R.12 F), en cambio mejoró poco (no mostró diferencias estadísticamente significativas) la tasa de crecimiento en ambas condiciones (Figura R.12E), lo que apunta a que el Glu tiene una importancia notable en el aumento de la velocidad de crecimiento. Asimismo, el tratamiento con la C2 protegió frente a estrés oxidativo y no mostró diferencias significativas respecto a los tratamientos con Amino22 y los casaminoácidos, a pesar de mostrar una tendencia a una menor supervivencia (Figura R.12G). El Glu es un aminoácido de especial relevancia en levadura y plantas ya que, además de ser parte estructural de las proteínas, constituye una fuente principal de nitrógeno para las células a partir de la cual se sintetiza glutamina, que a su vez es un precursor esencial para la biosíntesis de otros aminoácidos así como de purinas y pirimidinas. Es importante señalar que la actividad del complejo TORC1, que controla el crecimiento en respuesta a nutrientes, es particularmente sensible a Gln (Crespo *et al.*, 2002), que deriva del Glu, y a Leu (Binda *et al.*, 2009; Cohen y Hall, 2009). Además, el Glu forma parte del glutatión, resultando de gran importancia en la defensa frente a ROS (Noctor *et al.*, 2002) y en el metabolismo del hierro (Hider y Kong, 2011). De hecho, el Glu es uno de los principales aminoácidos aplicados sobre los cultivos agrícolas, tanto de forma individual como dentro de mezclas con otros aminoácidos, debido a su capacidad estimuladora del crecimiento y tolerancia a estrés abiótico (Calvo *et al.*, 2014). Por lo tanto, y también teniendo en cuenta que el Glu es el aminoácido más abundante en el hidrolizado de caseína ácida (Tabla A.2, Anexo II), no es de extrañar el impacto de este aminoácido en el crecimiento y tolerancia a estrés apreciado en los experimentos con levadura. Un aspecto a considerar es que la cepa de levadura empleada en los experimentos (BY4741) es auxótrofa para His, Leu y Met y por ello se creyó conveniente evaluar si en el efecto de los tratamientos con Amino22 y casaminoácidos pudiese influir una complementación de las auxotrofías más robusta. Los experimentos con la cepa S288C, que es la originaria silvestre de la BY4741 y que no tiene auxotrofías, muestran que el efecto del Amino22 y de los casaminoácidos sobre la tasa de crecimiento no se puede justificar por una mayor aportación de los requerimientos auxotróficos (Figura R.13A). En cambio, la complementación de las auxotrofías influyó parcialmente en los rendimientos en fase estacionaria (Figura R.13B), probablemente, debido a que los suplementos auxotróficos presentes en el medio de cultivo se van agotando por el crecimiento de la levadura y escasean tras el cambio diáuxico. Por consiguiente, se puede concluir que la existencia de auxotrofías en la cepa de referencia (BY4741) únicamente acrecienta el efecto positivo de los aminoácidos sobre el rendimiento de los cultivos en fase estacionaria. El aporte de requerimientos auxotróficos, concretamente de Leu, también podría explicar por qué la adición de este aminoácido de manera individual resultó mejorar sensiblemente el rendimiento de la levadura (Figura R.12 B y D) y posiblemente tenga una influencia importante en el efecto de las combinaciones de aminoácidos sobre dicho rendimiento (Figura R.12F). La relevancia de los aminoácidos Ile y Phe en la mejora del crecimiento es más difícil de comprender, ya que no son precursores de otros aminoácidos, no obstante podrían ser limitantes para el crecimiento de la levadura bajo las condiciones experimentales empleadas.

## Discusión

Para obtener más información acerca del efecto del Amino22 sobre la levadura, se realizó un estudio de la expresión global de genes utilizando micromatrices de DNA. Este análisis reveló que el tratamiento con el bioestimulante provoca la represión de dos grupos de genes (Tabla R.4): 1) genes relacionados con la homeostasis de hierro y regulados por el factor de transcripción Aft1 y 2) genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y vitaminas regulados por el factor de transcripción Gcn4. Tal y como se ha explicado en la Introducción, la traducción del mRNA de Gcn4 se derreprime en células bajo ayuno de aminoácidos, lo que tiene como consecuencia la inducción de un amplísimo número de genes, incluyendo muchos implicados en la biosíntesis de aminoácidos (Natarajan *et al.*, 2001; Hinnebusch, 2005). Por lo tanto, encontrar genes regulados por Gcn4 reprimidos en las células tratadas con el Amino22 era algo esperado y prueba que la ruta GAAC se encuentra inhibida en estas células. En cambio, la represión del regulón de Aft1 fue sorprendente y algo para lo que no encontramos explicación en un primer momento. Los resultados del análisis transcriptómico fueron validados mediante qRT-PCR y se confirmó que el regulón de hierro se reprime en presencia de aminoácidos, ya sea añadiéndolos con el bioestimulante o con el hidrolizado de caseína ácida (Figura R.14A). La mayoría de los genes regulados por Aft1 mostraron una mayor represión en los tratamientos con aminoácidos bajo estrés osmótico (Figura R.14B), a pesar de que la expresión del regulón no varía prácticamente entre condiciones normales y de estrés en células control (Figura R.14C).

Investigaciones previas han probado que los principales genes que controlan el transporte y la homeostasis de hierro se reprimen en mutantes  $\Delta aft1$  (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004; Courel *et al.*, 2005), así pues, se estudió el crecimiento de este mutante y su respuesta a la incubación con aminoácidos. Las células control del mutante  $\Delta aft1$  mostraron un peor crecimiento tanto sin estrés como con estrés osmótico y una mayor sensibilidad a estrés oxidativo que las células de la cepa silvestre (Figura R.15), por lo que el beneficio del tratamiento con aminoácidos no parece poder explicarse simplemente por una menor expresión del regulón de hierro. Tanto el Amino22 como los casaminoácidos mejoraron sensiblemente el crecimiento y tolerancia a estrés de las células  $\Delta aft1$ , aunque, específicamente frente a estrés oxidativo, el bioestimulante tan solo consiguió mejorar ligeramente la supervivencia teniendo un efecto mucho menor que los casaminoácidos. Esta diferencia puntual podría deberse a la presencia de algún metal o compuesto prooxidante en el Amino22, que dentro de las células contrarrestaría el efecto positivo de los aminoácidos frente al  $H_2O_2$ . Por otro lado, el crecimiento del mutante de sobreexpresión OEAFT1 y su respuesta a los tratamientos con aminoácidos fueron muy similares a los de la cepa silvestre. Estos resultados demuestran que los aminoácidos mejoran el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura a través de rutas independientes del factor de transcripción Aft1 y sugieren que la represión de los genes de hierro es un efecto secundario del tratamiento.

Puesto que las rutas GAAC y TORC1 son los principales sistemas de regulación de la homeostasis de aminoácidos en eucariotas, se consideró probable que el mecanismo de acción del Amino22 estuviese relacionado con ambas. Los dos mutantes de *GCN2* analizados, uno de pérdida de función y otro de expresión constitutiva, mostraron un crecimiento más lento que la cepa silvestre (Figura R.16A). Esto pone de manifiesto la importancia de la quinasa Gcn2 para el crecimiento de *S. cerevisiae* en un medio pobre en nutrientes como el SD: una respuesta adecuada al ayuno de aminoácidos requeriría cierto grado de activación de Gcn2

que permita aumentar la traducción de Gcn4 e inducir las rutas de biosíntesis de aminoácidos, sin embargo, una activación constitutiva inhibiría en exceso la traducción y reduciría el crecimiento. Consecuentemente, la adición de aminoácidos a través de los tratamientos con Amino22 y casaminoácidos tuvo un efecto sensiblemente mayor en el crecimiento del mutante  $\Delta gcn2$  que en el del mutante GCN2<sup>c</sup> (Figura R.16 A y B). Esto sugiere que el efecto de los aminoácidos sobre la levadura no requiere Gcn2, pero se reduce por una actividad constitutivamente alta de la quinasa, por ello se deduce que la inhibición de Gcn2 por aminoácidos es necesaria para aumentar el crecimiento en su presencia. Una aparente contradicción es que si los aminoácidos mejoran el crecimiento, con o sin estrés, por inhibir Gcn2, ¿por qué en presencia de aminoácidos el mutante  $\Delta gcn2$  crece peor que la cepa silvestre? La razón podría ser que Gcn2, además de regular negativamente la síntesis de proteínas, tiene un efecto positivo sobre otros procesos celulares tales como el transporte de leucina (Hueso *et al.*, 2012), los cuales permitirían un crecimiento óptimo y requerirían una cierta actividad Gcn2, aunque una actividad excesiva reduzca el crecimiento. En relación a los estreses oxidativo y térmico, cabe destacar que los mutantes de GCN2 mostraron una alta sensibilidad al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero no a choque térmico (Figura R.16C), sugiriendo un rol específico de Gcn2 en la defensa frente a estrés oxidativo. Los casaminoácidos incrementaron la supervivencia de las células del mutante  $\Delta gcn2$  a ambos estreses, mientras que el Amino22 solo lo hizo a choque térmico. Posiblemente, la incapacidad del Amino22 para proteger frente a estrés oxidativo en el mutante  $\Delta gcn2$  se deba a las mismas razones que en el caso del mutante  $\Delta aft1$  (ver más arriba). Los tratamientos con aminoácidos no afectaron a la supervivencia de las células del mutante GCN2<sup>c</sup>, lo que podría explicarse si una actividad constitutivamente alta de la quinasa también bloquease el efecto de los aminoácidos sobre la tolerancia a estrés.

De acuerdo con lo esperado dada la relevancia de TORC1 en el crecimiento y proliferación celular, las mutaciones en los distintos componentes analizados de la ruta TORC1 disminuyeron la velocidad de crecimiento de la levadura (Figura R.17A). En este aspecto, el mutante más afectado fue el  $\Delta gtr1$ , lo que sugiere que esta GTPasa tiene un papel especialmente importante para la función del complejo TORC1. No obstante, el efecto relativo de los aminoácidos (Amino22 y casaminoácidos) sobre la tasa de crecimiento solo se redujo en el mutante  $\Delta sch9$  (sin estrés y especialmente con sorbitol) y en el mutante  $\Delta ego3$  (solo con sorbitol). El rendimiento en fase estacionaria de los cultivos del mutante  $\Delta tor1$  y de los mutantes del complejo EGO fue mayor que el de la cepa silvestre (Figura R.17B), lo que a priori resulta sorprendente puesto que estos mutantes tienen una actividad TORC1 reducida y por consiguiente una menor capacidad de crecimiento. Este fenómeno podría deberse a que el rendimiento de los cultivos se determina por medidas de densidad óptica y, a igualdad de masa, las células de pequeño tamaño dispersan más la luz que las de tamaños más grandes. La supresión del gen *SCH9* causa una disminución del tamaño celular (Jorgensen *et al.*, 2002; 2004), por lo tanto las células de los mutantes del complejo EGO y de *TOR1* podrían tener también menores tamaños ya que la inhibición del complejo TORC1 reduce la fosforilación y la actividad de Sch9 (Urban *et al.*, 2007). En consecuencia, la misma masa de células de un mutante con tamaño celular reducido daría una mayor densidad óptica en la fase estacionaria que las células de la cepa silvestre. No obstante, el efecto de la reducción de tamaño en los mutantes del complejo EGO y de *TOR1* sería tan solo parcial, ya que la actividad

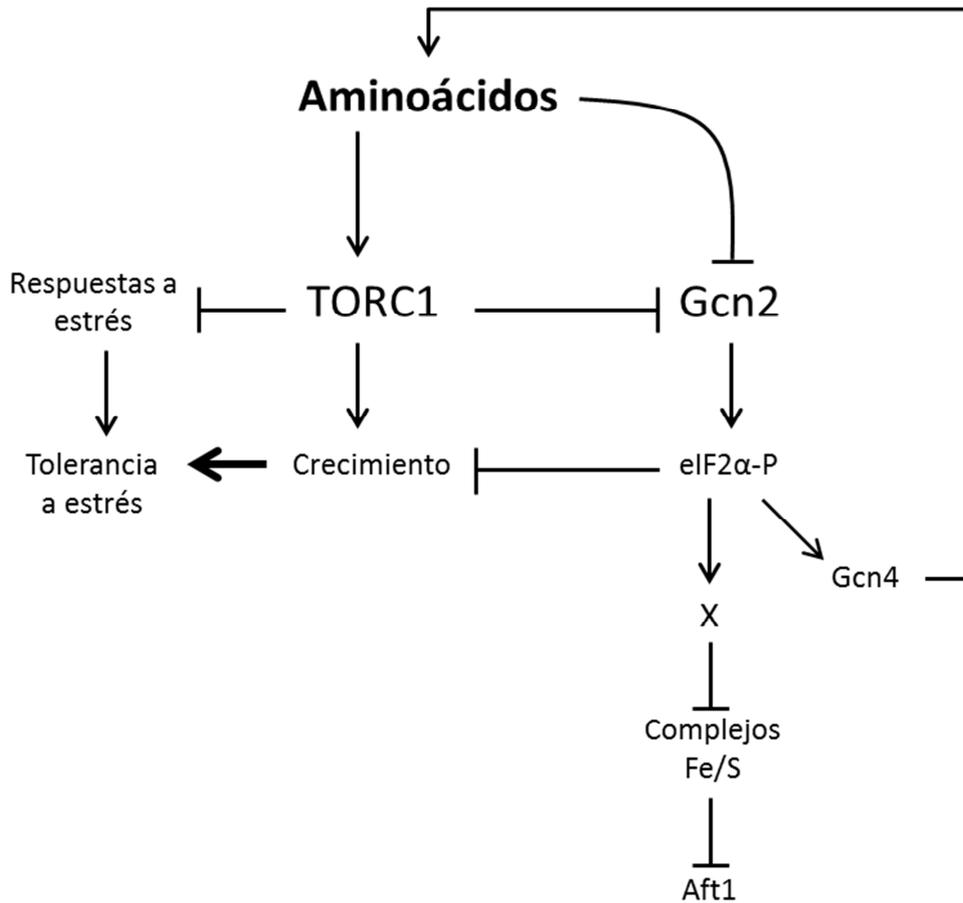
## Discusión

Sch9 no se eliminaría por completo, mientras que en el mutante  $\Delta sch9$  la reducción sería máxima, de acuerdo con la búsqueda sistemática de mutaciones que confieren tamaño reducido llevada a cabo por Jorgensen y colaboradores. A pesar de estar inhibido el crecimiento en todos estos mutantes, el hecho de que Sch9 sea un efector principal de TORC1 de gran importancia en la regulación del crecimiento explicaría que el mutante  $\Delta sch9$  tuviese una densidad óptica similar a la de la cepa silvestre mientras que en el resto de mutantes ésta fuese mayor, ya que el crecimiento se vería más negativamente afectado en las células  $\Delta sch9$ . El efecto relativo de los aminoácidos sobre el rendimiento se redujo o se anuló en todos los mutantes de la ruta TORC1 exceptuando el mutante  $\Delta ego1$ , que experimentó un incremento relativo similar al de la cepa silvestre. Estos resultados coinciden con la idea de que tanto el complejo EGO, aguas arriba, como la quinasa Sch9, aguas abajo, juegan papeles importantes en la regulación del crecimiento celular en respuesta a aminoácidos. Asimismo, que la reducción del efecto de los aminoácidos en los distintos mutantes sea únicamente parcial, evidencia que en la ruta intervienen múltiples actores que afinan la función de TORC1 pero que no resultan esenciales individualmente. Los mutantes  $\Delta ego3$  y  $\Delta sch9$  fueron utilizados en los ensayos de supervivencia a estrés oxidativo y a choque térmico (Figura R.17C). En concordancia con la literatura, en la que se afirma que TORC1 promueve el crecimiento al mismo tiempo que suprime las respuestas a estrés (Loewith y Hall, 2011), el mutante  $\Delta ego3$  mostró mayor tolerancia a ambos estreses que la cepa silvestre. No se observó el mismo comportamiento en el mutante  $\Delta sch9$ , que fue más sensible a la concentración menor de  $H_2O_2$ , aunque su supervivencia no difirió significativamente de la de la cepa silvestre con la concentración alta de  $H_2O_2$  y con choque térmico. Este resultado aparentemente contradictorio podría indicar que el efecto represor que tiene TORC1 sobre las respuestas a estrés dependería de otros efectores como las Tap42-PP2as además de Sch9. El efecto de los aminoácidos sobre la supervivencia a estrés en ambos mutantes se redujo en comparación con la cepa silvestre, sugiriendo que la mejora en la tolerancia a estrés oxidativo y térmico que proporcionan los aminoácidos podría depender parcialmente de la ruta TORC1. Esto también parece contradecirse con el hecho de que la activación de TORC1 inhiba las respuestas a estrés. Cómo los aminoácidos mejoran la tolerancia a estrés oxidativo y a choque térmico no está claro. Es posible que un crecimiento más activo y un mayor vigor de la levadura en presencia de aminoácidos compensen la represión de las respuestas a estrés causada por una mayor actividad TORC1. Es más, los aminoácidos no parecen mejorar la supervivencia a  $H_2O_2$  y a choque térmico induciendo respuestas específicas a estrés si se tiene en cuenta que en células tratadas con Amino22 no se indujo la expresión de genes de defensa (a excepción del gen *HSP12*) (Tabla R.3).

Los resultados obtenidos indican que el bioestimulante Amino22 y los casaminoácidos mejoran el crecimiento y la tolerancia a estrés de la levadura y que esto podría deberse, al menos en parte, a la inhibición parcial de la ruta GAAC y a la activación de la ruta TORC1 (Figura D.1). Sin embargo, ambos tratamientos también reprimen el regulón de hierro, de modo que nos preguntamos a través de qué mecanismo se produce dicha represión y el sentido biológico que pudiera tener. Los datos de obtenidos mediante espectrofotometría de absorción atómica descartaron que la represión del regulón de Aft1 se debiese a una mayor concentración intracelular de hierro en las células tratadas con Amino22 y con casaminoácidos (Figura R.18). Es más, el contenido en hierro de las células crecidas con casaminoácidos descendió respecto a

la cepa silvestre de una forma dependiente de Aft1 y coincidente con la represión de los transportadores de hierro. La supresión de Gcn2 resultó en una menor expresión de la mayoría de los genes regulados por Aft1 que fueron analizados, mientras que la activación constitutiva Gcn2 (GCN2<sup>c</sup>) tuvo el efecto contrario (Figura R.19A). El mutante SUI2-S51A, que es incapaz de inhibir la iniciación de la traducción y derreprimir la traducción de GCN4, mostró una evidente represión en los genes regulados por Aft1 (Figura R.19B), apoyando la idea de que una baja actividad Gcn2 reduce la expresión de los genes de hierro a través de un descenso en el nivel de fosforilación de eIF2. Gcn4 no parece intervenir directamente en esta regulación ni inducir un regulador positivo, ya que si así fuese, sería esperable que su pérdida de función también tuviese reprimido el regulón de Aft1 y por el contrario se indujeron algunos de estos genes (Figura R.19C). A pesar de que no hubieron diferencias entre los mutantes de Gcn2 y la cepa silvestre en cuanto al contenido total de hierro (Figura R.20), en las células del mutante de activación constitutiva de Gcn2 la localización de Aft1-GFP fue principalmente nuclear, mientras que en la cepa silvestre y en el mutante de pérdida de función fue mayoritariamente citosólica, detectándose una mayor acumulación Aft1-GFP en los núcleos de las células de la cepa silvestre que en los del mutante  $\Delta gcn2$  (Figura R.21). Nuestros resultados sugieren que la activación de Gcn2 induce, a través de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  pero no de la derrepresión de Gcn4, la localización del factor de transcripción Aft1 en el núcleo, donde activa la expresión del regulón de hierro. Por lo tanto, la inhibición de Gcn2 causaría el efecto opuesto. Esto también explicaría por qué en el mutante  $\Delta gcn4$ , que tiene ayuno de aminoácidos, se inducen algunos transportadores de hierro. Puesto que los complejos Fe/S son la señal que regula la unión de Aft1 a su regulón (Ueta *et al.*, 2012; Mühlhoff *et al.*, 2015), este trabajo ilustra la probable conexión entre la ruta GAAC y los procesos de síntesis y/o percepción de dichos complejos. Los ensayos de crecimiento de la levadura realizados en medio con bajo hierro y en medio SGal apuntan a que la inhibición de la ruta GAAC podría favorecer la síntesis de complejos Fe/S (Figuras R.22 y R.23). Posiblemente, la sensibilidad del mutante GCN2<sup>c</sup> a la falta de hierro y su imposibilidad de crecer en galactosa tengan origen en un defecto mitocondrial en la formación de complejos Fe/S provocado por un alto nivel de fosforilación de eIF2 $\alpha$ , mientras que la tolerancia del mutante  $\Delta gcn2$  al crecimiento en medio pobre en hierro se debería justamente a la ausencia de fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Aunque no tenemos evidencias que nos permitan explicar cómo el estado de fosforilación de eIF2 $\alpha$  influiría en la síntesis de los complejos Fe/S, una posible explicación sería que un aumento de eIF2 $\alpha$ -P derreprimiese la traducción de una proteína desconocida que actuase como regulador negativo de la formación de complejos Fe/S. Existen, de hecho, indicios de que Gcn2 podría estimular la traducción selectiva de otros mRNAs además del de GCN4 (ver apartado I.4.2).

Finalmente, proponemos el modelo expuesto en la Figura D.1 para explicar los efectos de los aminoácidos (y por lo tanto del Amino22) sobre la levadura. Experimentos adicionales, como el análisis de la actividad de alguna enzima que contenga complejos Fe/S (p.ej. la aconitasa o la isopropilmalato isomerasa), hacen falta para demostrar que las células de *S. cerevisiae* controlan la síntesis de estos complejos mediante la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .



**Figura D.1. Modelo para el mecanismo de acción de los aminoácidos en levadura.** La presencia de aminoácidos activa la ruta TORC1 estimulando el crecimiento. La enzima Gcn2 permanece inhibida por la baja concentración de tRNAs descargados y por lo tanto eIF2 $\alpha$  se mantiene defosforilado permitiendo la traducción y el crecimiento. Asimismo, el complejo TORC1 activo regula negativamente la actividad de la quinasa Gcn2 a través de sus efectores Tap42-PPAs y Sch9. Un mayor vigor y un crecimiento más activo por la activación de TORC1 y la inhibición de Gcn2 en presencia de aminoácidos proporcionarían una mayor supervivencia a las células frente a estreses como el oxidativo o el choque térmico, compensando la inhibición de las respuestas a estrés que provoca la activación de TORC1. En las células con ayuno de aminoácidos, Gcn2 se activa y fosforila a eIF2 $\alpha$ , inhibiendo la síntesis de proteínas y el crecimiento e induciendo selectivamente la traducción de Gcn4, lo que estimula la síntesis y la toma de aminoácidos. La fosforilación de eIF2 $\alpha$  también activaría a Aft1, posiblemente mediante el aumento de la traducción de un regulador negativo desconocido implicado en la formación de complejos Fe/S.

El sentido biológico de esta regulación podría estar relacionado con la optimización del uso y la obtención de hierro y con la ralentización del metabolismo y del crecimiento en un contexto de escasez de nutrientes. Las enzimas aconitasa (Aco1), glutamato sintasa (Glt1), sulfito reductasa (Met5), dihidroxiácido deshidratasa (Ilv3), isopropilmalato isomerasa (Leu1) y homoaconitasa (Lys4) intervienen en las rutas de biosíntesis de varios aminoácidos y contienen complejos Fe/S (Lill y Mühlenhoff, 2008). Por consiguiente, la falta de hierro podría perjudicar la biosíntesis de aminoácidos y activar la ruta GAAC (Philpott *et al.*, 2012). De hecho, en células con ayuno de hierro se inducen numerosos transcritos relacionados con la biosíntesis y transporte de aminoácidos, lo que justificaría el mantenimiento de unos niveles de aminoácidos similares a los de las células crecidas en condiciones normales (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2010). Además, sería ventajoso que la activación de esta ruta indujese los transportadores de hierro para permitir la formación de nuevos complejos Fe/S y preservar el funcionamiento

de los procesos celulares que requieren hierro, entre ellos la biosíntesis de determinados aminoácidos, pudiendo así inhibir Gcn2 y estimular el crecimiento. Como se ha comentado en la introducción, en células de mamíferos existen cuatro quinasas de eIF2 $\alpha$ , dos de las cuales, GCN2 y HRI, responden a ayuno de aminoácidos y a deficiencia de hierro, respectivamente. En levadura, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  también podría ser un mecanismo de respuesta a la falta de hierro, si bien en este caso la señal que activaría Gcn2 sería la acumulación de tRNAs descargados como consecuencia de una menor biosíntesis de determinados aminoácidos.

#### *Fulvato potásico*

El Fulvato potásico mejoró la tolerancia a estrés osmótico al aumentar la velocidad de crecimiento de la levadura en presencia de sorbitol (Figura R.9A). En las pruebas preliminares en medio SD (Figura R.4A) y en medio YPD (Figura R.1A), el Fulvato potásico también pareció afectar positivamente a la tasa de crecimiento bajo estrés salino. En cambio, los rendimientos en la fase estacionaria fueron menores en los cultivos tratados con las dosis altas de bioestimulante que en los cultivos control, tanto en ausencia como en presencia de estrés (Figuras R.1B y R.4B). La dosis de uso seleccionada (0,5  $\mu$ l/ml) no produjo descensos estadísticamente significativos en los rendimientos de los cultivos crecidos bajo las distintas condiciones analizadas a excepción de en aquellos crecidos con NaCl 1 M (Figura R.10B). La tendencia a disminuir el rendimiento en la fase estacionaria con elevadas concentraciones de Fulvato potásico podría indicar la interferencia de determinados compuestos del bioestimulante con los procesos respiratorios de la mitocondria. De hecho, los ácidos fúlvicos tienen la capacidad de atravesar membranas biológicas y penetrar en las células gracias a su relativamente pequeño tamaño molecular (Nardi *et al.*, 2002; Calvo *et al.*, 2014) y se ha llegado a describir en algunos casos que pueden desajustar la fosforilación oxidativa en células vegetales, aunque no está claro si ello ocurre a través de una interferencia directa o indirecta con la mitocondria (Nardi *et al.*, 2002). No obstante, la dosis más elevada de Fulvato potásico (2  $\mu$ l/ml) también pareció inhibir la velocidad de crecimiento en ausencia de estrés y en algunas condiciones de estrés osmótico (Figuras R.1A y R.4A), por lo que no es descartable que los ácidos fúlvicos puedan afectar a otros procesos celulares o que parte de ellos se quede adherido a la superficie celular (como parece ocurrir con los ácidos húmicos), de forma que inhiban el crecimiento cuando se aplican elevados niveles de bioestimulante.

Asimismo, el Fulvato potásico incrementó la tolerancia a estrés oxidativo y a choque térmico (Figura R.9C). Se evaluó la capacidad del Fulvato potásico para degradar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el objetivo de determinar si su efecto frente a estrés oxidativo se pudo deber a una eliminación del agente oxidante en el medio de cultivo. Además, dado que el resto de estreses estudiados (salino, osmótico y choque térmico) generan estrés oxidativo (Mittler, 2002), una degradación directa de ROS podría constituir, en parte o en su totalidad, el mecanismo de acción del bioestimulante frente a los distintos tipos de estrés abiótico. A diferencia del Ácido húmico, el Fulvato potásico mostró capacidad de eliminar parcialmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en el medio de cultivo (Figura R.9D). Posteriormente, se repitió el ensayo de supervivencia a estrés oxidativo con cultivos crecidos en presencia de Fulvato potásico después de haber sido lavados con agua y resuspendidos en medio de cultivo fresco sin bioestimulante. Las células tratadas previamente con Fulvato potásico mostraron una mayor supervivencia al estrés oxidativo que las células no tratadas (Figura R.9E), lo que demuestra que el efecto del bioestimulante no se

## Discusión

se explica por una degradación de  $H_2O_2$  fuera de las células. Sin embargo, no se puede descartar que el Fulvato potásico destruyese  $H_2O_2$  en el interior de éstas, ya que los ácidos fúlvicos son capaces de atravesar paredes y membranas celulares, como se ha comentado con anterioridad.

Con el propósito de obtener información sobre las rutas celulares potencialmente afectadas por el Fulvato potásico, y que presumiblemente también podrían estar relacionadas con la defensa frente a estrés abiótico, se estudió su efecto sobre la expresión global de genes empleando micromatrices de DNA. Este abordaje reveló que el efecto del tratamiento con Fulvato potásico sobre la expresión génica es sutil, reprimiendo entre 1,5 y 3,3 veces un total de 12 genes y no induciendo ninguno (Tabla R.5). No obstante, entre los reprimidos se encontraron ampliamente sobrerrepresentados genes involucrados en la homeostasis de hierro y en su sistema de transporte de alta afinidad, lo cual apunta a una regulación específica en las células tratadas con el bioestimulante. Experimentos de qRT-PCR validaron los resultados del análisis transcriptómico con micromatrices y confirmaron que el regulón de Aft1 se reprime en presencia de Fulvato potásico (Figura R.24A). Además, la represión en el tratamiento con el bioestimulante también se produjo bajo condiciones de estrés osmótico, mostrando algunos de los genes una represión sensiblemente más fuerte que en ausencia de estrés (Figura R.24B). Puesto que el nivel de expresión del regulón de Aft1 depende de la cantidad de hierro intracelular (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995; 1996), se podía esperar que su represión en las células crecidas con Fulvato potásico se debiese a un mayor contenido en hierro. Efectivamente, el contenido total en hierro fue mayor en las células tratadas con el bioestimulante que en las células control (Figura R.25). En cambio, no se observaron diferencias en el mutante  $\Delta aft1$ . Estos resultados demuestran que el Fulvato potásico favorece una mayor adquisición de hierro férrico por parte de la levadura mediante un mecanismo dependiente de Aft1. Es sabido que los ácidos fúlvicos forman complejos con iones metálicos como el  $Fe^{3+}$  (Schnitzer y Ghosh, 1982; Esteves da Silva *et al.*, 1998), incrementando su solubilidad y su disponibilidad para las plantas y favoreciendo por lo tanto una mayor absorción del metal (Pandeya *et al.*, 1998; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004a; Bocanegra *et al.*, 2006). Esto también ocurriría en levadura: el Fulvato potásico proporcionaría hierro en una forma disponible para su adquisición por parte de las células de *S. cerevisiae*. El hecho de que el aumento del contenido en hierro total en presencia del bioestimulante dependiera de Aft1, también indica que la entrada del metal se produjo a través del sistema de transporte de alta afinidad, el cual, como se explica más extensamente en el apartado I.5.1, opera mediante dos rutas: la denominada ruta reductora, dependiente del complejo Fet3/Ftr1, y la ruta mediada por sideróforos, dependiente de los transportadores Arn1-4. Cabría considerar la posibilidad de que los ácidos fúlvicos, además de poseer la capacidad de formar complejos con el hierro, contuviesen sideróforos secretados por microorganismos con los que pudieran haber estado en contacto en función del entorno del suelo del que se hayan obtenido. Por lo tanto, se quiso determinar el modo en el que el hierro del Fulvato potásico entra en las células a través del sistema de transporte de alta afinidad. Los experimentos de crecimiento en placa con los mutantes del fondo genético YPH499 demostraron que, efectivamente, la levadura usa el Fulvato potásico como fuente de hierro y que para ello requiere la oxidasa multicobre codificada por el gen *FET3* (Figura R.26). El mutante  $\Delta fet3$  fue incapaz de crecer en medio de cultivo pobre en hierro y con Fulvato potásico, por lo tanto el

bioestimulante carece de sideróforos transportables por las proteínas Arn1-4. Los datos obtenidos sugieren que el  $\text{Fe}^{3+}$  del Fulvato potásico actuaría como sustrato de las reductasas de la membrana plasmática para posteriormente ser reoxidado e internalizado por el complejo Fet3/Ftr1.

Finalmente, se investigó una posible relación entre la toma del hierro del Fulvato potásico y la tolerancia a estrés abiótico. Para ello se analizó el crecimiento y la tolerancia a estrés de los mutantes  $\Delta aft1$ , OEAFT1 y  $\Delta fet3$  (Figura R.27 A, B y C). A diferencia de las células de la cepa silvestre, las del mutante  $\Delta fet3$  no vieron mejorada su tolerancia a estreses osmótico, oxidativo y térmico al ser tratadas con Fulvato potásico, mientras que en el mutante  $\Delta aft1$  el bioestimulante tampoco protegió frente a estreses osmótico y oxidativo pero sí frente a choque térmico. Esto demuestra que la tolerancia frente a los distintos estreses abióticos proporcionada por el tratamiento con Fulvato potásico está relacionada con el sistema de transporte de hierro de alta afinidad y que, más concretamente, depende del producto del gen *FET3*. Este hecho descarta que otros nutrientes que pudiera contener el bioestimulante, como el potasio (no hay que olvidar que el nombre del producto es Fulvato potásico), influyan de manera significativa en este caso sobre la tolerancia a estrés de la levadura. Por otra parte, la tasa de crecimiento del mutante de OEAFT1 crecido con estrés osmótico no se incrementó de manera significativa en presencia del bioestimulante, pese a que sí se observó una tendencia a que ésta aumentase. Posiblemente, la sobreexpresión del factor de transcripción Aft1 provoque, a través de una mayor expresión de los transportadores del sistema de alta afinidad, una acumulación de una cantidad de hierro superior a los niveles óptimos, impidiendo así mejorar significativamente la velocidad de crecimiento como ocurre en la cepa silvestre.

En conjunto, los resultados sugieren la existencia de una conexión entre un mayor contenido en hierro en las células de levadura tratadas con Fulvato potásico y la tolerancia a estrés. Al parecer, determinados estreses abióticos (osmótico, oxidativo y térmico) producirían una deficiencia de hierro en las células que podría ser compensada por la adición de Fulvato potásico. En la introducción (apartado I.5) se ha comentado la importancia del hierro como nutriente esencial al actuar como cofactor en numerosas enzimas con funciones fundamentales para las células eucariotas. Entre los cofactores proteicos basados en hierro destacan por su relevancia tanto a nivel cuantitativo como cualitativo los complejos Fe/S (Beinert *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2005). El mayor contenido en hierro en las células tratadas con Fulvato potásico puede explicar la represión del regulón de Aft1, ya que la interacción del factor de transcripción con sus genes diana es regulada por los niveles de hierro intracelular a través de complejos Fe/S (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002; Ueta *et al.*, 2012). Estos complejos son una diana principal del estrés oxidativo (Imlay, 2006), por lo que la producción excesiva de ROS bajo condiciones de estrés abiótico puede provocar la oxidación de los complejos Fe/S causando la pérdida de función de enzimas importantes para multitud de procesos celulares. El tratamiento con Fulvato potásico mejoraría la disponibilidad de hierro favoreciendo la reposición de proteínas con complejos Fe/S que hubiesen sido dañadas por el estrés oxidativo originado por los estreses abióticos principales. Asimismo, estos resultados sugieren que el bioestimulante no solo mejora la adquisición de hierro, sino que lo hace de forma que un mayor contenido en hierro intracelular no resulta tóxico para las células. Una posibilidad, dada la capacidad de los ácidos fúlvicos para atravesar paredes y membranas y quelar iones

## Discusión

metálicos, es que el Fulvato potásico penetre en las células de levadura y forme complejos con el hierro, impidiendo su participación en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss pero permitiendo su utilización para la síntesis de enzimas que requieren complejos Fe/S u otros cofactores basados en hierro. Asimismo, puesto que el bioestimulante tiene la capacidad de degradar  $H_2O_2$ , la presencia de Fulvato potásico en el interior de las células podría favorecer la eliminación de ROS y atenuar el estrés oxidativo. Si el Fulvato potásico no previniese la formación (a través de la quelación del hierro) o favoreciese la degradación de ROS, cabría esperar que un aumento en el hierro intracelular libre agravase los efectos negativos de los distintos estreses, especialmente del oxidativo.

El mecanismo de acción del Fulvato potásico propuesto en esta tesis para la levadura *S. cerevisiae* podría ser extrapolable a plantas. Éstas han desarrollado dos mecanismos distintos para tomar el hierro insoluble del suelo, por ello se distingue entre estrategia I y estrategia II, muy similares a las rutas reductiva y mediada por sideróforos de levadura, respectivamente. Las plantas dicotiledóneas y las monocotiledóneas no gramíneas siguen la estrategia I (Römheld, 1987), que se caracteriza por una acidificación del pH del suelo causada por la expulsión de protones a la rizosfera a través de  $H^+$ -ATPasas de la membrana plasmática de las células de la raíz, favoreciendo así la solubilización del hierro férrico (Santi *et al.*, 2005; Santi y Schmidt, 2008). Después de la acidificación, el hierro férrico es reducido a la forma ferrosa por la enzima FRO2 en la superficie radicular (Robinson *et al.*, 1999) y los iones ferrosos son transportados a través de la membrana plasmática de las células por el transportador IRT1 (Eide *et al.*, 1996), que es el principal transportador de hierro en las raíces de las plantas (Henriques *et al.*, 2002; Varotto *et al.*, 2002; Vert *et al.*, 2002). Por otro lado, las gramíneas (monocotiledóneas herbáceas) usan la estrategia II (Takagi *et al.*, 1984). Estas plantas secretan fitosideróforos que unen hierro férrico formando complejos altamente estables los cuales son internalizados a través de transportadores específicos de la familia Yellow Stripe (YS) en la membrana plasmática de la raíz (Curie *et al.*, 2009). Se ha documentado que el arroz es capaz de usar ambas estrategias y tomar hierro ferroso (ya que al crecer bajo el agua, donde la concentración de oxígeno es baja y se favorece la forma ferrosa del hierro, la posibilidad del uso de la estrategia I es una ventaja). No obstante, parece que la actividad reductasa en la superficie de las raíces del arroz no es inducible por deficiencia de hierro (Ishimaru *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007). Chen y colaboradores demostraron en 2004 (a) que los ácidos fúlvicos son capaces de mejorar la adquisición de hierro tanto en plantas que siguen la estrategia I como en plantas que siguen la estrategia II. Además, las sustancias húmicas de bajo peso molecular pueden ser transferidas desde las raíces a la parte aérea (Nardi *et al.*, 2002; 2009; Calvo *et al.*, 2014).

Hasta ahora, se ha atribuido a los ácidos fúlvicos la capacidad de mantener el hierro en formas solubles para su adquisición por las plantas bajo situaciones de deficiencia, sin embargo, son escasos los estudios que relacionan la utilización de estas sustancias con la defensa frente a estrés abiótico (Calvo *et al.*, 2014). Algunos trabajos han señalado que podrían proteger frente a sequía (Xudan, 1986; Anjum *et al.*, 2011) y mejorar las defensas antioxidantes en condiciones de estrés por metales pesados (Ali *et al.*, 2015). Esta investigación refuerza la idea de que uno de los principales efectos positivos de la aplicación de los ácidos fúlvicos en la agricultura es el aumento en la disponibilidad de hierro y demuestra que estos compuestos confieren

tolerancia frente a estrés abiótico en levadura mediante un mecanismo basado en una mayor acumulación de hierro sin producir daño oxidativo extra.



## CONCLUSIONES



- Todos los bioestimulantes analizados tienen, en mayor o menor grado, efectos positivos sobre la tolerancia frente a al menos uno de los tipos de estrés abiótico estudiados.
- El tratamiento con Extracto de algas mejora ligeramente la velocidad de crecimiento de la levadura en condiciones de estrés salino.
- El Vinacillas aumenta la velocidad de crecimiento bajo estrés salino y la supervivencia a choque térmico. Sin embargo, este bioestimulante provoca la disminución del rendimiento de los cultivos de una forma dosis-dependiente tanto en presencia como en ausencia de estrés, lo que sugiere que éste afecta negativamente a la respiración mitocondrial.
- El Fosfito confiere protección frente a estrés salino, aumentando la velocidad de crecimiento y el rendimiento de los cultivos, y frente a choque térmico. Los efectos positivos del Fosfito sobre la tolerancia a estrés se deben, probablemente, al potasio presente en su composición. La inhibición de la velocidad de crecimiento causada por el Fosfito en ausencia de estrés se puede explicar por la represión de la respuesta a deficiencia de fosfato que tiene lugar en presencia de este compuesto cuando las concentraciones de fosfato en el medio son subóptimas.
- El Ácido húmico mejora la supervivencia a estrés oxidativo y a choque térmico. Respecto al estrés oxidativo, se demostró que este bioestimulante no actúa degradando peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo. El Ácido húmico inhibe tanto la velocidad de crecimiento como el rendimiento de los cultivos de una forma dosis-dependiente.
- El tratamiento con Amino22 es el más efectivo en la mejora del crecimiento y tolerancia a estrés. Este bioestimulante incrementa considerablemente la velocidad de crecimiento y el rendimiento de los cultivos tanto en ausencia de estrés como bajo estrés osmótico. El Amino22 también mejora el crecimiento bajo estrés salino, si bien su efecto se reduce sensiblemente en comparación con las otras dos condiciones de crecimiento estudiadas. Estos resultados indican que el efecto positivo del bioestimulante no es específico de estrés y se reduce notablemente en condiciones de salinidad. Asimismo, el Amino22 aumenta la supervivencia de las células frente a estrés oxidativo, a pesar de no tener capacidad de degradación de peróxido de hidrógeno, y a choque térmico.
- La adición de 1 g/l de peptona de caseína ácida reproduce el efecto del Amino22 sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura, lo que confirma que el principio activo del bioestimulante son los aminoácidos.
- Probablemente, la mejora en el crecimiento y en la tolerancia a estrés que proporciona la peptona de caseína ácida se debe al efecto aditivo de los distintos aminoácidos que contiene, no obstante, los aminoácidos Glu, Ile, Leu y Phe parecen

## Conclusiones

tener una mayor influencia ya que su adición conjunta (respetando las proporciones en las que se encuentran en el hidrolizado) tiene unos resultados muy similares a la de los casaminoácidos.

- El estudio de la expresión global de genes mediante micromatrices de DNA reveló que el tratamiento con Amino22 provoca la represión de dos grupos de genes: 1) genes relacionados con la homeostasis de hierro y regulados por el factor de transcripción Aft1 y 2) genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y vitaminas regulados por el factor de transcripción Gcn4. La represión transcripcional de los genes regulados por Aft1 en tratamientos con aminoácidos se acrecienta bajo estrés osmótico.
- Los aminoácidos mejoran el crecimiento y la tolerancia a estrés a través de rutas independientes al factor de transcripción Aft1 y, por lo tanto, la represión de su regulación es un efecto secundario del tratamiento.
- El efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento de la levadura no requiere la quinasa Gcn2, pero se reduce por una actividad constitutivamente alta de la misma, lo que sugiere que la inhibición de Gcn2 es necesaria para la mejora del crecimiento en presencia de aminoácidos. Por otra parte, la reducción parcial del efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento en varios mutantes de miembros del complejo EGO y en el mutante de la quinasa Sch9 indica que la activación de la ruta TORC1 tiene un papel relevante en la respuesta a aminoácidos.
- En el presente estudio se profundiza en la relación entre la homeostasis de aminoácidos y la de hierro en *S. cerevisiae* y se propone un modelo de regulación según el cual la activación de la ruta GAAC induciría la localización nuclear de Aft1 y la consiguiente expresión de sus genes diana, mientras que la inhibición de dicha ruta por la presencia de aminoácidos tendría el efecto contrario. La actividad de Aft1 sería controlada a través del estado de fosforilación de eIF2 $\alpha$  e, hipotéticamente, implicaría la regulación de la formación de complejos Fe/S.
- El Fulvato potásico es el segundo bioestimulante más efectivo en la mejora de la tolerancia a estrés de la levadura, ya que aumenta la velocidad de crecimiento bajo estrés osmótico y la supervivencia a estrés oxidativo y a choque térmico. No obstante, dosis altas del bioestimulante tienden a inhibir el crecimiento.
- Los análisis de expresión mediante micromatrices y qRT-PCR indican que el tratamiento con Fulvato potásico reprime el regulón de Aft1 y que dicha represión tiende a ser mayor bajo estrés osmótico.
- El tratamiento con Fulvato potásico provoca un aumento en el contenido intracelular de hierro, cuya entrada depende de la oxidoreductasa codificada por el gen *FET3*. Puesto que la tolerancia a estrés abiótico que proporciona el Fulvato potásico también depende de *FET3*, se deduce que el mecanismo de acción de este bioestimulante se basa en un incremento de la acumulación intracelular de hierro sin producir daño

oxidativo extra. La capacidad del Fulvato potásico para degradar peróxido de hidrógeno o para formar complejos con metales como el hierro podría evitar que un mayor contenido en hierro resulte tóxico para las células.



## BIBLIOGRAFÍA



- Albrigo LG. 1999. Effects of foliar applications of urea or Nutriphite on flowering and yields of Valencia orange trees. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **112**: 1-4.
- Ali S, Bharwana SA, Rizwan M, Farid M, Kanwal S, Ali Q, Ibrahim M, Gill RA, Khan MD. 2015. Fulvic acid mediates chromium (Cr) tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) through lowering of Cr uptake and improved antioxidant defense system. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 10601-9.
- Amarowicz R, Shahidi F. 1997. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. *Food Chem.* **58**: 355-9.
- Anjum SA, Wang L, Farooq M, Xue L, Ali S. 2011. Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions. *J. Agron. Crop. Sci.* **197**: 409-17.
- Ashraf M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**: 17-42.
- Ashraf M, Foolad MR. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* **59**: 206-16.
- Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM, Kaplan J. 1994. The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**: 403-10.
- Asli S, Neumann PM. 2010. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant Soil* **336**: 313-322.
- Atiyeh RM, Lee S, Edwards CA, Arancon NQ, Metzger JD. 2002. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresour Technol.* **84**: 7-14.
- Baigorri R, Fuentes M, González-Gaitano G, García-Mina JM, Almendros G, González-Vila FJ. 2009. Complementary multianalytical approach to study the distinctive structural features of the main humic fractions in solution: gray humic acid, brown humic acid, and fulvic acid. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 3266-72.
- Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN. 1996. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Biol. Cell* **7**: 25-42.
- Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, Chen WW, Ottina KA, Grabiner BC, Spear ED, Carter SL, Meyerson M, Sabatini DM. 2013. A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* **340**: 1100-6.
- Beckett RP, van Staden J. 1989. The effect of seaweed concentrate on the growth and yield of potassium stressed wheat. *Plant Soil* **116**: 29-36.
- Beinert H, Holm RH, Münck E. 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**: 653-9.
- Barbara RLL, García AC. 2014. Humic substances and plant defense metabolism. En: Ahmad P, Wani MR (Eds.), *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment: volume 1*. Springer Science+Business Media, New York, USA. Págs. 297-319.

## Bibliografía

Berset C, Trachsel H, Altmann M. 1998. The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4264-9.

Binda M, Péli-Gulli MP, Bonfils G, Panchaud N, Urban J, Sturgill TW, Loewith R, De Virgilio C. 2009. The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Mol. Cell* **35**: 563-73.

Bishov SJ, Henick AS. 1972. Antioxidant effect of protein hydrolyzates in a freeze-dried model system. *J. Food Sci.* **37**: 873-5.

Blaiseau PL, Lesuisse E, Camadro JM. 2001. Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**: 34221-6.

Blumwald E, Aharon GS, Apse MP. 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1465**: 140-51.

Blunden G, Jenkins T, Liu Y. 1997. Enhanced leaf chlorophyll levels in plants treated with seaweed extract. *J. Appl. Phycol.* **8**: 535-43.

Bocanegra MP, Lobartini JC, Orioli GA. 2006. Plant uptake of iron chelated by humic acids of different molecular weights. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **37**: 1-2.

Borlaug NE, Dowsell CR. 1994. Feeding a human population that increasingly crowds a fragile planet. 15<sup>th</sup> World Congress of Soil Science, 10-16 Julio, 1994, Acapulco, Mexico. Supplement to Transactions, 10 p. International Society of Soil Science and Mexican Society of Soil Science.

Botstein D, Fink GR. 2011. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* **189**: 695-704.

Boyer JS. 1982. Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-8.

Brown P, Saa S. 2015. Biostimulants in agriculture. *Front. Plant Sci.* **6**: 671.

Cakmak I. 2005. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **168**: 521-30.

Calvo P, Nelson L, Kloepper JW. 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* **383**: 3-41.

Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL, Façanha AR. 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.* **130**: 1951-7.

Canellas LP, Teixeira Junior LRL, Dobbss LB, Silva CA, Medici LO, Zandonadi DB, Façanha AR. 2008. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Ann. Appl. Biol.* **153**: 157-66.

Carrasco-Castilla J, Hernández-Álvarez AJ, Jiménez-Martínez C, Jacinto-Hernández C, Alaiz M, Girón-Calle J, Vioque J, Dávila-Ortiz G. 2012. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chem.* **135**: 1789-95.

- Carswell C, Grant BR, Theodorou ME, Harris J, Niere JO, Plaxton WC. 1996. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiol.* **110**: 105-10.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agric. Food Chem.* **46**: 49-53.
- Chen OS, Kaplan J. 2000. *CCC1* suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *J. Biol. Chem.* **275**: 7626-32.
- Chen Y, Clapp CE, Magen H. 2004a. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: the role of organo-iron complexes. *Soil Sci. Plant Nutr.* **50**: 1089-95.
- Chen OS, Crisp RJ, Valachovic M, Bard M, Winge DR, Kaplan J. 2004b. Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**: 29513-8.
- Cheng L, Wang F, Shou H, Huang F, Zheng L, He F, Li J, Zhao FJ, Ueno D, Ma JF, Wu P. 2007. Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice. *Plant Physiol.* **145**: 1647-1657.
- Cherkasova VA, Hinnebusch AG. 2003. Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2. *Genes Dev.* **17**: 859-72.
- Clapp CE, Chen Y, Hayes MHB, Cheng HH. 2001. Plant growth promoting activity of humic substances. En: Swift RS, Sparks KM (eds.). *Understanding and managing organic matter in soils, sediments, and waters*. International Humic Science Society, Madison, USA. Págs. 243-255.
- Cohen A, Hall MN. 2009. An amino acid shuffle activates mTORC1. *Cell* **136**: 399-400.
- Conklin DS, McMaster JA, Culbertson MR, Kung C. 1992. *COT1*, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **12**: 3678-88.
- Cook M, Tyers M. 2007. Size control goes global. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**: 341-50.
- Cosentino GP, Schmelzle T, Haghighat A, Helliwell SB, Hall MN, Sonenberg N. 2000. Eap1p, a novel eukaryotic translation initiation factor 4E-associated protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **20**: 4604-13.
- Courel M, Lallet S, Camadro JM, Blaiseau PL. 2005. Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. *Mol. Cell Biol.* **25**: 6760-71.
- Craigie JS. 2011. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.* **23**: 371-93.
- Crespo JL, Hall MN. 2002. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 579-91.

## Bibliografía

- Crespo JL, Powers T, Fowler B, Hall MN. 2002. The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6784-9.
- Crisp RJ, Pollington A, Galea C, Jaron S, Yamaguchi-Iwai Y, Kaplan J. 2003. Inhibition of heme biosynthesis prevents transcription of iron uptake genes in yeast. *J. Biol. Chem.* **278**: 45499-506.
- Cuartero J, Bolarín MC, Asíns MJ, Moreno V. 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *J. Exp. Bot.* **57**: 1045-58.
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S. 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann. Bot.* **103**: 1-11.
- Curti B, Vanoni MA, Verzotti E, Zanetti G. 1996. Glutamate synthase: a complex iron-sulphur flavoprotein. *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 95-9.
- Dalton LE, Healey E, Irving J, Marciniak SJ. 2012. Phosphoproteins in stress-induced disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **106**: 189-221.
- Dawes IW. 2004. Stress responses. En: Dickinson JR, Schweizer M (Eds.). *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. Págs. 376-438.
- De Freitas J, Wintz H, Kim JH, Poynton H, Fox T, Vulpe C. 2003. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals* **16**: 185-97.
- Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M, Bedu M, Robaglia C, Meyer C. 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* **8**: 864-70.
- Dever TE, Dar AC, Sicheri F. The eIF2 $\alpha$  Kinases. 2007. En: Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB, (Eds.). *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Págs. 319-44.
- Di Como CJ, Arndt KT. 1996. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.* **10**: 1904-16.
- Dix DR, Bridgham JT, Broderius MA, Byersdorfer CA, Eide DJ. 1994. The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**: 26092-9.
- Dix D, Bridgham J, Broderius M, Eide D. 1997. Characterization of the *FET4* protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron. *J. Biol. Chem.* **272**: 11770-7.
- Dlouhy AC, Outten CE. 2013. The iron metallome in eukaryotic organisms. *Met. Ions Life Sci.* **12**: 241-78.

- Dong J, Qiu H, Garcia-Barrio M, Anderson J, Hinnebusch AG. 2000. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol. Cell* **6**: 269-79.
- Dubouloz F, Deloche O, Wanke V, Cameroni E, De Virgilio C. 2005. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol. Cell* **19**: 15-26.
- Dumlao DS, Hertz N, Clarke S. 2008. Secreted 3-isopropylmalate methyl ester signals invasive growth during amino acid starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **47**: 698-709.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5624-28.
- Elkins KM, Nelson DJ. 2002. Spectroscopic approaches to the study of the interaction of aluminium with humic substances. *Coord. Chem. Rev.* **228**: 205-25.
- Ellenberger TE, Brandl CJ, Struhl K, Harrison SC. 1992. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* **71**: 1223-37.
- Eltschinger S, Loewith R. 2015. TOR Complexes and the maintenance of cellular homeostasis. *Trends Cell Biol.* **26**: 148-59.
- Esteves da Silva JCG, Machado AASC, Oliveira CJS. 1998. Effect of pH on complexation of Fe(III) with fulvic acids. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**: 1268-73.
- FAO. 2009. La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050. Foro de expertos de alto nivel - Como alimentar al mundo en 2050. Roma, Italia.
- Fischer RA, Byerlee DR. 1991. Trends of wheat production in the warmer areas: major issues and economic considerations. En: Saunders DA (ed.). *Wheat for nontraditional, warm areas*. CIMMYT, Mexico, DF. Págs. 3-27.
- Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH. 1993. The inactivation of Fe-S cluster containing hydrolyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* **268**: 22369-76.
- Flowers TJ. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* **55**: 307-19.
- Forsburg SL. 2001. The art and design of genetic screens: yeast. *Nat. Rev. Genet.* **2**: 659-68.
- Förster H, Adaskaveg JE, Kim DH, Stanghellini ME. 1998. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of peppers to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Dis.* **82**: 1165-70.
- Fox TC, Guerinot ML. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 669-96.
- Frías I, Caldeira MT, Pérez-Castiñeira JR, Navarro-Aviñó JP, Culiañez-Maciá FA, Kuppinger O, Stransky H, Pagés M, Hager A, Serrano R. 1996. A major isoform of the maize plasma

## Bibliografía

membrane H<sup>+</sup>-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* **8**: 1533-44.

Garber Morales J, Holmes-Hampton GP, Miao R, Guo Y, Münck E, Lindahl PA. 2010. Biophysical characterization of iron in mitochondria isolated from respiring and fermenting yeast. *Biochemistry* **49**: 5436-44.

García AC, Berbara RLL, Farías LP, Izquierdo FG, Hernández OL, Campos RH, Castro RN. 2012. Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. *Afr. J. Biotechnol.* **11**: 3125-34.

Garcia AC, Santos LA, Izquierdo FG, Rumjanek VM, Castro RN, dos Santos FS, de Souza LGA, Berbara RLL. 2013. Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *J. Geochem. Explor.* **136**: 48-54.

Garcia-Barrio M, Dong J, Ufano S, Hinnebusch AG. 2000. Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2alpha kinase GCN2 is required for GCN2 activation. *EMBO J.* **19**: 1887-99.

Gaubitz C, Oliveira TM, Prouteau M, Leitner A, Karuppasamy M, Konstantinidou G, Rispal D, Eltschinger S, Robinson GC, Thore S, Aebersold R, Schaffitzel C, Loewith R. 2015. Molecular basis of the rapamycin insensitivity of target of rapamycin complex 2. *Mol. Cell* **58**: 977-88.

Giri J. 2011. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal. Behav.* **6**: 1746-51.

Goffeau A, Barrel BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. 1996. Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546-67.

Goossens A, Dever TE, Pascual-Ahuir A, Serrano R. 2001. The protein kinase Gcn2p mediates sodium toxicity in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**: 30753-60.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 463-99.

Haurie V, Boucherie H, Sogliocco F. 2003. The Snf1 protein kinase controls the induction of genes of the iron uptake pathway at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**: 45391-6.

Hayes MHB. 1997. Emerging concepts of the composition and structure of humic substances. En: Hayes MHB, Wilson WS (eds.). *Humic substances in soils, peats and waters – Health and environmental aspects*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. Págs. 3-30.

Heitman J, Movva NR, Hall MN. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905-9.

Helliwell SB, Wagner P, Kunz J, Deuter-Reinhard M, Henriquez R, Hall MN. 1994. TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* **5**: 105-18.

- Henriques R, Jasik J, Klein M, Martinoia E, Feller U, Schell J, Pais MS, Koncz C. 2002. Knock-out of Arabidopsis metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant Mol. Biol.* **50**: 587-97.
- Hider RC, Kong XL. 2011. Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. *Biometals* **24**: 1179-87.
- Hill DE, Hope IA, Macke JP, Struhl K. 1986. Saturation mutagenesis of the yeast *his3* regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. *Science* **234**: 451-7.
- Hinnebusch AG. 1996. Translational control of *GCN4*: gene-specific regulation by phosphorylation of eIF2. En: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N (Eds.). *Translational Control*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. Págs. 199-244.
- Hinnebusch AG. 2000. Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. En: Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB (Eds.). *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. Págs. 185-243.
- Hinnebusch AG. 2005. Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 407-50.
- Hinnebusch AG, Natarajan K. 2002. Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot. Cell* **1**: 22-32.
- Hoerberichts FA, Perez-Valle J, Montesinos C, Mulet JM, Planes MD, Hueso G, Yenush L, Sharma SC, Serrano R. 2010. The role of K(+) and H(+) transport systems during glucose- and H(2)O(2)-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **27**: 713-25.
- Hoffmann B, Uzarska MA, Berndt C, Godoy JR, Haunhorst P, Lillig CH, Lill R, Mühlhoff U. 2011. The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group. *Antioxid. Redox Signal.* **15**: 19-30.
- Holmes DS, Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-7.
- Hueso G, Aparicio-Sanchis R, Montesinos C, Lorenz S, Murguía JR, Serrano R. 2012. A novel role for protein kinase Gcn2 in yeast tolerance to intracellular acid stress. *Biochem. J.* **441**: 255-64.
- Imlay JA. 2006. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol. Microbiol.* **59**: 1073-82.
- IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri RK, Meyer LA (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland. 151 págs.
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. 2006. Rice plants take up iron as an Fe<sup>3+</sup>-phytosiderophore and as Fe<sup>2+</sup>. *Plant J.* **45**: 335-46.

## Bibliografía

Jackson TJ, Burgess T, Colquhoun I, Hardy GES. 2000. Action of fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Path.* **49**: 147-54.

Jacobsen T, Adams RM. 1958. Salt and silt in ancient Mesopotamian agriculture: progressive changes in soil salinity and sedimentation contributed to the breakup of past civilizations. *Science* **128**: 1251-8.

Jao CL, Ko WC. 2002. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisch. Sci.* **68**: 430-5.

Jeong J, Guerinot ML. 2009. Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* **14**: 280-5.

Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. 2005. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* **74**: 247-81.

Jorgensen P, Nishikawa JL, Breikreutz BJ, Tyers M. 2002. Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* **297**: 395-400.

Jorgensen P, Rupes I, Sharom JR, Schnepfer L, Broach JR, Tyers M. 2004. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev.* **18**: 2491-505.

Kaplan CD, Kaplan J. 2009. Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chem. Rev.* **109**: 4536-52.

Karel M, Tannenbaum SR, Wallace DH, Maloney H. 1966. Autoxidation of methyl linoleate in freeze-dried model systems. III. Effects of added amino acids. *J Food Sci.* **31**: 892-6.

Kerr RA. 1998. Sea-floor dust shows drought felled Akkadian empire. *Science* **279**: 325-6.

Keyer K, Imlay JA. 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 13635-40.

Khan W, Rayirath UP, Subramanian S, Jithesh MN, Rayorath P, Hodges DM, Critchley AT, Craigie JS, Norrie J, Prithiviraj B. 2009. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *J. Plant Growth Regul.* **28**: 386-99.

Kim D, Yukl ET, Moëne-Loccoz P, Montellano PR. 2006. Fungal heme oxygenases: Functional expression and characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida albicans*. *Biochemistry* **45**: 14772-80.

Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* **10**: 935-45.

Kim J, Guan KL. 2011. Amino acid signaling in TOR activation. *Annu. Rev. Biochem.* **80**: 1001-32.

Knicker H, Almendros G, González-Vila FJ, Lüdemann HD, Martin F. 1995. <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR analysis of some fungal melanins in comparison with soil organic matter. *Org. Geochem.* **23**: 1023-8.

- Kogan K, Spear ED, Kaiser CA, Fass D. 2010. Structural conservation of components in the amino acid sensing branch of the TOR pathway in yeast and mammals. *J. Mol. Biol.* **402**: 388-98.
- Koyro HW, Ahmad P, Geissler N. 2012. Abiotic stress responses in plants: an overview. En: Ahmad P, Prasad MNV (eds.). *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change*. Springer, New York, USA. Págs. 1-28.
- Krishnamoorthy T, Pavitt GD, Zhang F, Dever TE, Hinnebusch AG. 2001. Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol. Cell Biol.* **21**: 5018-30.
- Kumánovics A, Chen OS, Li L, Bagley D, Adkins EM, Lin H, Dingra NN, Outten CE, Keller G, Winge D, Ward DM, Kaplan J. 2008. Identification of *FRA1* and *FRA2* as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J. Biol. Chem.* **283**: 10276-86.
- Kwast KE, Burke PV, Poyton RO. 1998. Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.* **201**: 1177-95.
- Kwon NH, Kang T, Lee JY, Kim HH, Kim HR, Hong J, Oh YS, Han JM, Ku MJ, Lee SY, Kim S. 2011. Dual role of methionyl-tRNA synthetase in the regulation of translation and tumor suppressor activity of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**: 19635-40.
- Lageix S, Lanet E, Pouch-Pélissier MN, Espagnol MC, Robaglia C, Deragon JM, Pélissier T. 2008. *Arabidopsis* eIF2 $\alpha$  kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding. *BMC Plant Biol.* **8**: 134.
- Lanz ND, Booker SJ. 2012. Identification and function of auxiliary iron-sulfur clusters in radical SAM enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**: 1196-212.
- Lesuisse E, Blaiseau PL, Dancis A, Camadro JM. 2001. Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **147**: 289-98.
- Lesuisse E, Labbe P. 1989. Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 257-63.
- Leymonie JP. 2007. Phosphites and phosphates: when distributors and growers alike could get confused. New Ag International. Disponible en la URL: [http://www.spectrumanalytic.com/support/library/pdf/Phosphites\\_and\\_Phosphates\\_WheW\\_distributors\\_and\\_growers\\_alike\\_could\\_get\\_confused.pdf](http://www.spectrumanalytic.com/support/library/pdf/Phosphites_and_Phosphates_WheW_distributors_and_growers_alike_could_get_confused.pdf) (consultada en noviembre de 2015).
- Li H, Mapolelo DT, Dingra NN, Keller G, Riggs-Gelasco PJ, Winge DR, Johnson MK, Outten CE. 2011a. Histidine 103 in Fra2 is an iron-sulfur cluster ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 complex and is required for in vivo iron signaling in yeast. *J. Biol. Chem.* **286**: 867-76.

## Bibliografía

- Li H, Mapolelo DT, Dingra NN, Naik SG, Lees NS, Hoffman BM, Riggs-Gelasco PJ, Huynh BH, Johnson MK, Outten CE. 2009a. The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry* **48**: 9569-81.
- Li J, Liu J, Wang X, Zhao L, Chen Q, Zhao WM. 2009b. A waterbath method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Analy. Bioch.* **384**: 189-90.
- Li L, Bagley D, Ward DM, Kaplan J. 2008. Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Mol. Cell Biol.* **28**: 1326-37.
- Li L, Chen OS, McVey Ward D, Kaplan J. 2001. CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**: 29515-9.
- Li L, Jia X, Ward DM, Kaplan J. 2011b. Yap5 protein-regulated transcription of the *TYW1* gene protects yeast from high iron toxicity. *J. Biol. Chem.* **286**: 38488-97.
- Li L, Kaplan J. 1998. Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J. Biol. Chem.* **273**: 22181-7.
- Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Mühlenhoff U. 2012. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**: 1491-508.
- Lill R, Kispal G. 2000. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends. Biochem. Sci.* **25**: 352-6.
- Lill R, Mühlenhoff U. 2008. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 669-700.
- Lill R, Srinivasan V, Mühlenhoff U. 2014. The role of mitochondria in cytosolic-nuclear iron-sulfur protein biogenesis and in cellular iron regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* **22**: 111-9.
- Loewith R, Hall MN. 2011. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* **189**: 1177-201.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* **10**: 457-68.
- Loneragan JF. 1997. Plant nutrition in the 20<sup>th</sup> and perspectives for the 21<sup>st</sup> century. *Plant Soil* **196**: 163-74.
- Lovatt CJ. 1990a. Foliar phosphorus fertilization of citrus by foliar application of phosphite. En: Citrus Research Advisory Committee (Ed.). *Summary of citrus research*. University of California, Riverside, USA. Págs. 25-26.

- Lovatt CJ. 1990b. A definitive test to determine whether phosphite fertilization can replace phosphate fertilization to supply P in the metabolism of 'Hass' on 'Duke 7'. *California Avocado Society Yearbook* **74**: 61-4.
- Lovatt CJ. 1999. Timing citrus and avocado foliar nutrient applications to increase fruit set and size. *HortTechnology* **9**: 607-12.
- Lyons TJ, Eide DJ. 2007. Transport and storage of metal ions in biology. En: Bertini I, Gray HB, Stiefel EI, Valentine JS (Eds.). *Biological Inorganic Chemistry*. University Science Books, Sausalito, CA, USA. Págs. 57-77.
- MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**: 2845-55.
- Mahajan S, Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **444**: 139-58.
- Mancuso S, Azzarello E, Mugnai S, Briand X. 2006. Marine bioactive substances (IPA extract) improve ion fluxes and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *Adv. Hortic. Sci.* **20**: 156-61.
- Marcuse R. 1960. Antioxidative effect of amino-acids. *Nature* **186**: 886-7.
- Marcuse R. 1962. The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **39**: 97-103.
- Marquet A, Bui BT, Florentin D. 2001. Biosynthesis of biotin and lipoic acid. *Vitam. Horm.* **61**: 51-101.
- Martins LJ, Jensen LT, Simon JR, Keller GL, Winge DR. 1998. Metalloregulation of *FRE1* and *FRE2* homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 23716-21.
- McDonald AE, Grant BR, Plaxton WC. 2001a. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *J. Plant Nutr.* **24**: 1505-19.
- McDonald AE, Niere JO, Plaxton WC. 2001b. Phosphite disrupts the acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to phosphate starvation. *Can. J. Microbiol.* **47**: 969-78.
- Menacho-Marquez M, Perez-Valle J, Ariño J, Gadea J, Murguía JR. 2007. Gcn2p regulates a G1/S cell cycle checkpoint in response to DNA damage. *Cell Cycle* **6**: 2302-5.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**: 405-10.
- MMA. 2005. Plan Nacional de Adaptación al Cambio Climático. Primer programa de trabajo. Marco para la coordinación entre administraciones públicas para las actividades de evaluación de impactos, vulnerabilidad y adaptación al cambio climático. Oficina Española de Cambio Climático. S. G. para la prevención de la contaminación y del cambio climático. Ministerio de Medio Ambiente, España.

## Bibliografía

Molin M, Yang J, Hanzén S, Toledano MB, Labarre J, Nyström T. 2011. Life span extension and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance elicited by caloric restriction require the peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **43**: 823-33.

Morales J, Manso JA, Cid A, Mejuto JC. 2012. Degradation of carbofuran and carbofuran-derivatives in presence of humic substances under basic conditions. *Chemosphere* **89**: 1267-71.

Mortimer RK, Johnston JR. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**: 35-43.

Mühlenhoff U, Hoffmann B, Richter N, Rietzschel N, Spantgar F, Stehling O, Uzarska MA, Lill R. 2015. Compartmentalization of iron between mitochondria and the cytosol and its regulation. *Eur. J. Cell Biol.* **94**: 292-308.

Mühlenhoff U, Molik S, Godoy JR, Uzarska MA, Richter N, Seubert A, Zhang Y, Stubbe J, Pierrel F, Herrero E, Lillig CH, Lill R. 2010. Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab.* **12**: 373-85.

Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* **25**: 239-50.

Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 651-81.

Murguía JR, Bellés JM, Serrano R. 1995. A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science*. **267**: 232-4.

Murguía JR, Serrano R. 2012. New functions of protein kinase Gcn2 in yeast and mammals. *IUBMB Life*. **64**: 971-4.

Nabati DA, Schmidt RE, Parrish DJ. 1994. Alleviation of Salinity Stress in Kentucky Bluegrass by Plant Growth Regulators and Iron. *Crop Sci.* **34**: 198-202.

Narasimhan J, Staschke KA, Wek RC. 2004. Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. *J. Biol. Chem.* **279**: 22820-32.

Nardi S, Carletti P, Pizzeghello D, Muscolo A. 2009. Biological activities of humic substances. En: Senesi N, Xing B, Huang PM (Eds.), *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. Wiley, Hoboken, USA. Págs. 305-339.

Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, Vianello A. 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.* **34**: 1527-36.

Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ. 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell Biol.* **21**: 4347-68.

Neidhardt FC, Ingraham J., Schaechter M. 1990. *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 520 págs.

Neilands JB. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**: 26723-6.

- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* **53**: 1237-47.
- Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Valadier MH, Roux Y, Foyer CH. 1997. The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplar. Possible implications for glutathione production during stress. *Physiol. Plant.* **100**: 255-63.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J. Exp. Bot.* **53**: 1283-304.
- Norbeck J, Blomberg A. 1998. Amino acid uptake is strongly affected during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.7 M NaCl medium. *FEMS Microbiol. Lett.* **158**: 121-6.
- Ojeda L, Keller G, Muhlenhoff U, Rutherford JC, Lill R, Winge DR. 2006. Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**: 17661-9.
- Owens S. 2001. Salt of the earth. Genetic engineering may help to reclaim agricultural land lost due to salinisation. *EMBO rep.* **2**: 877-9.
- Ozer A, Bruick RK. 2007. Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? *Nat. Chem. Biol.* **3**: 144-53.
- Pandeya SB, Singh AK, Dhar P. 1998. Influence of fulvic acid on transport of iron in soils and uptake by paddy seedlings. *Plant Soil* **198**: 117-25.
- Paoli M, Marles-Wright J, Smith A. 2002. Structure-function relationships in heme-proteins. *DNA Cell Biol.* **21**: 271-80.
- Park M. 2001. The fertilizer industry. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.
- Pascual-Ahuir A, Proft M. 2007. The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmostress-responsive genes. *EMBO J.* **26**: 3098-108.
- Pascual-Ahuir A, Serrano R, Proft M. 2001. The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **21**: 16-25.
- Pearce LR, Komander D, Alessi DR. 2010. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 9-22.
- Pedruzzi I, Dubouloz F, Camerani E, Wanke V, Roosen J, Winderickx J, De Virgilio C. 2003. TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol. Cell* **12**: 1607-13.
- Péli-Gulli MP, Sardu A, Panchaud N, Raucci S, De Virgilio C. 2015. Amino Acids Stimulate TORC1 through Lst4-Lst7, a GTPase-Activating Protein Complex for the Rag Family GTPase Gtr2. *Cell Rep.* **13**: 1-7.

## Bibliografía

- Peña-Castillo L, Hughes TR. 2007. Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics* **176**: 7-14.
- Peña-Ramos EA, Xiong YL. 2002. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *J. Food Sci.* **67**: 2952-56.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: e45.
- Philpott CC. 2006. Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 636-45.
- Philpott CC, Leidgens S, Frey AG. 2012. Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**: 1509-20.
- Philpott CC, Protchenko O. 2008. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **7**: 20-7.
- Piccolo A, Celano G, Pietramellara G. 1993. Effects of fractions of coal-derived humic substances on seed germination and growth of seedlings (*Lactuca sativa* and *Lycopersicum esculentum*). *Biol. Fertil. Soils* **16**: 11-5
- Piccolo A, Nardi S, Concheri G. 1996. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere* **33**: 595-602.
- Pinton R, Cesco S, Iacoletti G, Astolfi S, Varanini Z. 1999a. Modulation of NO<sub>3</sub> uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase. *Plant Soil* **215**: 155-61.
- Pinton R, Cesco S, Santi S, Agnolon F, Varanini Z. 1999b. Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. *Plant Soil* **210**: 145-57.
- Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P. 2007. *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, 2<sup>a</sup> edición. CRC Press, Madison, USA. 447 págs.
- Portillo F, Serrano R. 1989. Growth control strength and active site of yeast plasma membrane ATPase studied by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **186**: 501-7.
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E, Ariño J. 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* **275**: 17249-55.
- Powers T. 2007. TOR signaling and S6 kinase 1: Yeast catches up. *Cell Metab.* **6**: 1-2.
- Powis K, Zhang T, Panchaud N, Wang R, De Virgilio C, Ding J. 2015. Crystal structure of the Ego1-Ego2-Ego3 complex and its role in promoting Rag GTPase-dependent TORC1 signaling. *Cell Res.* **25**: 1043-59.
- Protchenko O, Ferea T, Rashford J, Tiedeman J, Brown PO, Botstein D, Philpott CC. 2001. Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 49244-50.

- Protchenko O, Philpott CC. 2003. Regulation of intracellular heme levels by *HMX1*, a homologue of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**: 36582-7.
- Puga MI, Mateos I, Charukesi R, Wang Z, Franco-Zorrilla JM, de Lorenzo L, Irigoyen ML, Masiero S, Bustos R, Rodriguez J, Leyva A, Rubio V, Sommer H, Paz-Ares J. 2014. SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**: 14947-52.
- Puig S, Askeland E, Thiele DJ. 2005. Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* **120**: 99-110.
- Puig S, Vergara SV, Thiele DJ. 2008. Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. *Cell Metab.* **7**: 555-64.
- Qiu H, Dong J, Hu C, Francklyn CS, Hinnebusch AG. 2001. The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation. *EMBO J.* **20**: 1425-38.
- Qiu H, Garcia-Barrio MT, Hinnebusch AG. 1998. Dimerization by translation initiation factor 2 kinase GCN2 is mediated by interactions in the C-terminal ribosome-binding region and the protein kinase domain. *Mol. Cell Biol.* **18**: 2697-711.
- Qiu H, Hu C, Dong J, Hinnebusch AG. 2002. Mutations that bypass tRNA binding activate the intrinsically defective kinase domain in GCN2. *Genes Dev.* **16**: 1271-80.
- Quaggiotti S, Ruperti B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S. 2004. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* **55**: 803-13.
- Raguzzi F, Lesuisse E, Crichton RR. 1988. Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **231**: 253-8.
- Ramirez M, Wek RC, Hinnebusch AG. 1991. Ribosome association of GCN2 protein kinase, a translational activator of the *GCN4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **11**: 3027-36.
- Raught B, Gringras AC. 2007. Signalling to translation initiation. En: Mathews M, Sonenberg N y Hershey JWB (Eds.). *Translational control in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. Págs. 369-400.
- Rees EM, Thiele DJ. 2007. Identification of a vacuole-associated metalloreductase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. *J. Biol. Chem.* **282**: 21629-38.
- Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S, Logan D, Mattoo A, Selvaraj G, Datla R. 2012. Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 4850-74.
- Rickard DA. 2000. Review of phosphorus acid and its salts as fertilizer materials. *J. Plant Nutr.* **23**: 161-80.

## Bibliografía

Rietzschel N, Pierik AJ, Bill E, Lill R, Mühlenhoff U. 2015. The basic leucine zipper stress response regulator Yap5 senses high-iron conditions by coordination of [2Fe-2S] clusters. *Mol. Cell Biol.* **35**: 370-8.

Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML. 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694-97.

Rolfes RJ, Hinnebusch AG. 1993. Translation of the yeast transcriptional activator *GCN4* is stimulated by purine limitation: implications for activation of the protein kinase GCN2. *Mol. Cell Biol.* **13**: 5099-111.

Romano PR, Garcia-Barrio MT, Zhang X, Wang Q, Taylor DR, Zhang F, Herring C, Mathews MB, Qin J, Hinnebusch AG. 1998. Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Mol. Cell Biol.* **18**: 2282-97.

Römheld V. 1987. Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiol. Plant* **70**: 231-34.

Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* **15**: 2122-33.

Rutherford JC, Jaron S, Ray E, Brown PO, Winge DR. 2001. A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 14322-7.

Rutherford JC, Jaron S, Winge DR. 2003. Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J. Biol. Chem.* **278**: 27636-43.

Rutherford JC, Ojeda L, Balk J, Mühlenhoff U, Lill R, Winge DR. 2005. Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**: 10135-40.

Saa S, Olivos-Del Rio A, Castro S, Brown PH. 2015. Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* [Mill.] D. A. Webb). *Front. Plant Sci.* **6**:87.

Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 3661-67.

Sánchez-Sánchez A, Sánchez-Andreu J, Juárez M, Jordá J, Bermúdez D. 2002. Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate FeEDDHA in lemon trees. *J. Plant Nutr.* **25**: 2433-42.

Santi S, Cesco S, Varanini Z, Pinton R. 2005. Two plasma membrane H(+)-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 287-292.

Santi S, Schmidt W. 2008. Laser microdissection-assisted analysis of the functional fate of iron deficiency-induced root hairs in cucumber. *J. Exp. Bot.* **59**: 697-704.

- Sarkar B. 1987. Metal protein interactions. *Prog. Food Nutr. Sci.* **11**: 363-400.
- Sattlegger E, Hinnebusch AG. 2005. Polyribosome binding by GCN1 is required for full activation of eukaryotic translation initiation factor 2{alpha} kinase GCN2 during amino acid starvation. *J. Biol. Chem.* **280**: 16514-21.
- Schmidt W, Cesco S, Santi S, Pinton R, Varanini Z. 2005. Water-extractable humic substances as nutrient acquisition signals for root hairs development in *Arabidopsis*. En: Hartmann A, Schmid M, Wenzel W, Hinnsinger P (Eds.). *Rizosphere 2004 – Perspectives and challenges*. GSF-Berich, Neuherberg. Pág. 71.
- Schnitzer M, Ghosh K. 1982. Characteristics of water-soluble fulvic acid –copper and fulvic acid – iron complexes. *Soil Sci.* **134**: 354-63.
- Schnitzer M, Schulten HR. 1998. New ideas on the chemical make-up of soil humic and fulvic acids. En: Huang PM (Ed.). *Future prospects for soil chemistry*. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA. Págs. 155-78.
- Schroetter S, Angeles-Wedler D, Kreuzig R, Schnug E. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschung Völkenrode* **56**: 87-99.
- Serrano R. 1985. Plasma membrane ATPase of plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Serrano R, Gaxiola R. 1994. Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**: 121-38.
- Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink GR. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* **319**: 689-93.
- Serrano R, Mulet JM, Rios G, Marquez JA, de Larrinoa IF, Leube MP, Mendizabal I, Pascual-Ahuir A, Proft M, Ros R, Montesinos C. 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.* **50**: 1023-36.
- Shakoury-Elizeh M, Protchenko O, Berger A, Cox J, Gable K, Dunn TM, Prinz WA, Bard M, Philpott CC. 2010. Metabolic response to iron deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **285**: 14823-33.
- Shakoury-Elizeh M, Tedeman J, Rashford J, Ferea T, Demeter J, Garcia E, Rolfes R, Brown PO, Botstein D, Philpott CC. 2004. Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **15**: 1233-43.
- Sherman F. 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **350**: 3-41.
- Shertz CA, Bastidas RJ, Li W, Heitman J, Cardenas ME. 2010. Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. *BMC Genomics* **11**: 510.
- Simpson AJ, Kingery WL, Hayes MH, Spraul M, Humpfer E, Dvortsak P, Kerssebaum R, Godejohann M, Hofmann M. 2002. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* **89**: 84-8.

## Bibliografía

Singh A, Kaur N, Kosman DJ. 2007. The metalloreductase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *J. Biol. Chem.* **282**: 28619-26.

Smallwood MF, Calvert CM, Bowles DJ, eds. 1999. *Plant responses to environmental stress*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. 224 págs.

Smillie R, Grant BR, Guest D. 1989. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology* **79**: 921-6.

Smirnoff N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 214-9.

Smirnoff N, Cumbes QJ. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem.* **28**: 1057-60.

Sormani R, Yao L, Menand B, Ennar N, Lecampion C, Meyer C, Robaglia C. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol.* **7**: 26.

Spizzo T, Byersdorfer C, Duesterhoeft S, Eide D. 1997. The yeast *FET5* gene encodes a *FET3*-related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Mol. Gen. Genet.* **256**: 547-56.

Srinivasan C, Liba A, Imlay JA, Valentine JS, Gralla EB. 2000. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J. Biol. Chem.* **275**: 29187-92.

Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD, Dancis A. 1996. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**: 1552-7.

Stehling O, Lill R. 2013. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**: 1-17.

Stevenson FJ. 1991. Organic matter-micronutrient reactions in soil. En: Mortvedt JJ, Cox FR, Shuman LM, Welch RM (Eds.), *Micronutrients in agriculture*. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA. Págs. 145-186.

Stevenson FJ. 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. Wiley, New York, USA. 512 págs.

Stewart WM, Dibb DW, Johnston AE, Smyth TJ. 2005. The contribution of commercial fertilizer nutrients to food production. *Agron. J.* **97**: 1-6.

Struhl K. 1989. Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 1051-77.

Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N. 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 5105-10.

Szabados L, Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **15**: 89-97.

Taiz L, Zeiger E. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer. Sunderland, MA, USA.

- Takagi S, Nomoto K, Takemoto T. 1984. Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J. Plant Nutr.* **7**: 469-77.
- Tan KH, Binger A. 1986. Effect of humic acid on aluminium toxicity in corn plants. *Soil Sci.* **14**: 20-5.
- Teste MA, Duquenne M, François JM, Parrou JL. 2009. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol. Biol.* **10**: 99.
- Thao HTB, Yamakawa T. 2009. Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator? *Soil Sci. Plant Nutr.* **55**: 228-34.
- Ticconi CA, Delatorre CA, Abel S. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**: 963-72.
- Trevisan S, Francioso O, Quaggiotti S, Nardi S. 2010. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. *Plant Signal. Behav.* **5**: 635-43.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 5116-21.
- Tvegård T, Soltani H, Skjølberg HC, Krohn M, Nilssen EA, Kearsy SE, Grallert B, Boye E. 2007. A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition. *Genes Dev.* **21**: 649-54.
- Uesono Y, Toh-E A. 2002. Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *J. Biol. Chem.* **277**: 13848-55.
- Ueta R, Fujiwara N, Iwai K, Yamaguchi-Iwai Y. 2007. Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **18**: 2980-90.
- Ueta R, Fujiwara N, Iwai K, Yamaguchi-Iwai Y. 2012. Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression. *Mol. Cell Biol.* **32**: 4998-5008.
- Ueta R, Fukunaka A, Yamaguchi-Iwai Y. 2003. Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**: 50120-7.
- Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN, Loewith R. 2007. Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **26**: 663-74.
- Urbanowski JL, Piper RC. 1999. The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J. Biol. Chem.* **274**: 38061-70.
- Vallini G, Pera A, Avio L, Valdrighi M, Giovannetti M. 1993. Influence of humic acids on laurel growth, associated rhizospheric microorganisms, and mycorrhizal fungi. *Biol. Fertil. Soils* **16**: 1-4.

## Bibliografía

- Varotto C, Maiwald D, Pesaresi P, Jahns P, Salamini F, Leister D. 2002. The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **31**: 589-99.
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C. 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223-33.
- Vinocur B, Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 123-32.
- Wagner I, Musso H. 1983. New naturally occurring amino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **22**: 816-28.
- Wang F, Schubert F, Rinneberg H. 1995. A fluorometric rate assay of hydrogen peroxide using immobilized peroxidase with a fibre-optic detector. *Sens. Act. B: Chem.* **28**: 3-7.
- Wang S, Mulligan CN. 2009. Enhanced mobilization of arsenic and heavy metals from mine tailings by humic acid. *Chemosphere* **74**: 274-9.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14.
- Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. 2001. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: Physiological and molecular considerations. *Acta Hort.* **560**: 285-92.
- Warringer J, Blomberg A. 2003. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20**: 53-67.
- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **34**: 7-11.
- Wek RC, Ramirez M, Jackson BM, Hinnebusch AG. 1990. Identification of positive-acting domains in GCN2 protein kinase required for translational activation of *GCN4* expression. *Mol. Cell Biol.* **10**: 2820-31.
- Wek RC, Staschke KA, Narasimhan J. 2004. En: Winderickx J, Taylor PM (Eds.), *Nutrient-induced Responses in Eukaryotic Cells*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. Págs. 171-199.
- Wek SA, Zhu S, Wek RC. 1995. The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell Biol.* **15**: 4497-506.
- Weng LP, van Riemsdijk WH, Koopal LK, Hiemstra T. 2006. Adsorption of humic substances on goethite: comparison between humic acids and fulvic acids. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 7494-500.
- Whapham CA, Blunden G, Jenkins T, Hankins SD. 1993. Significance of betaines in the increased chlorophyll content of plants treated with seaweed extract. *J. Appl. Phycol.* **5**: 231-234.

- White AK, Metcalf WW. 2007. Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 379-400.
- Wilson WA, Roach PJ. 2002. Nutrient-regulated protein kinases in budding yeast. *Cell* **111**: 155-8.
- Winston F, Chumley F, Fink GR. 1983. Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. *Methods Enzymol.* **101**: 211-28.
- Wolf AV, Brown MG, Prentiss PG. 1980. Concentrative properties of aqueous solutions: conversion tables. En: Weast RC, Astle MJ (Eds.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Págs. 227-79.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-84.
- Wyn-Jones RG, Pollard A. 1983. Proteins, enzymes and inorganic ions. En: Läuchli A, Bielecki RL (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*. Vol. 15B. Springer-Verlag, Berlin. Págs. 528-562.
- Xudan X. 1986. The effect of foliar application of fulvic acid on water use, nutrient uptake and yield in wheat. *Aust. J. Agric. Res.* **37**: 343-50.
- Yamaguchi N. 1971. Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils. Part I. Oxidation of methionine during course of autoxidation of linoleic acid. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **18**: 313-18.
- Yamaguchi-Iwai Y, Dancis A, Klausner RD. 1995. AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**: 1231-9.
- Yamaguchi-Iwai Y, Stearman R, Dancis A, Klausner RD. 1996. Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J.* **15**: 3377-84.
- Yamaguchi-Iwai Y, Ueta R, Fukunaka A, Sasaki R. 2002. Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**: 18914-8.
- Yang R, Wek SA, Wek RC. 2000. Glucose limitation induces GCN4 translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol. Cell Biol.* **20**: 2706-17.
- Yenush L. 2016. Potassium and sodium transport in yeast. *Adv. Exp. Med. Biol.* **892**: 187-228.
- Yun CW, Bauler M, Moore RE, Klebba PE, Philpott CC. 2001. The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 10218-23.
- Yun CW, Ferea T, Rashford J, Ardon O, Brown PO, Botstein D, Kaplan J, Philpott CC. 2000a. Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. *J. Biol. Chem.* **275**: 10709-15.

## Bibliografia

- Yun CW, Tiedeman JS, Moore RE, Philpott CC. 2000b. Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J. Biol. Chem.* **275**: 16354-9.
- Zaborske JM, Narasimhan J, Jiang L, Wek SA, Dittmar KA, Freimoser F, Pan T, Wek RC. 2009. Genome-wide analysis of tRNA charging and activation of the eIF2 kinase Gcn2p. *J. Biol. Chem.* **284**: 25254-67.
- Zandonadi DB, Canellas LP, Façanha AR. 2007. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta* **225**: 1583-95.
- Zhang C. 2014. Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. *Protein Cell* **5**: 750-60.
- Zhang T, Péli-Gulli MP, Yang H, De Virgilio C, Ding J. 2012. Ego3 functions as a homodimer to mediate the interaction between Gtr1-Gtr2 and Ego1 in the ego complex to activate TORC1. *Structure* **20**: 2151-60.
- Zhao H, Eide D. 1996. The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 2454-8.
- Zhu JK. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**: 66-71.
- Zhu S, Wek RC. 1998. Ribosome-binding domain of eukaryotic initiation factor-2 kinase GCN2 facilitates translation control. *J. Biol. Chem.* **273**: 1808-14.
- Ziechmann W. 1994. *Humic substances*. Mannheim: Wissenschaftsverlag.

**ANEXOS**



## Anexo I

Tabla A.1. Cebadores utilizados para las reacciones de qRT-PCR.

Cebador	Secuencia 5' -> 3'
FET3for	TTCAGCATGCCTTCATTCTAC
FET3rev	TTCGGTCGCATCTTCCATATC
FTR1for	GAGACAACTGTTTGCCAAGATG
FTR1rev	CGAGGAATGACTGGTAGTTTGC
FIT2for	CACCGCTGACCCTATCATTAG
FIT2rev	CAGAGGTGGTATCTGGTCCTC
FIT3for	CTGCTACCTCTTCTGCTTCAAC
FIT3rev	AGCACCGGTGTAAGTAGATAATTC
SIT1for	CGGTATCATTGGCTCTTTGTG
SIT1rev	GAGGTTACTACCGCCATTCTTG
ARN1for	GATGGTGGCTATGGGTTTATTG
ARN1rev	CAGAGACGGTAACTGGGTAAGTG
ARN2for	CATATGGACGCAGTCATTGTACC
ARN2rev	CTTCAACCATCGCAGACCTAAC
TIS11for	ACGGACTCGGCGAATTAAG
TIS11rev	CTGCCATAAGGACAATAACCTAGT
ZRT1for	CTGGGAAGTGTGGTGATGAG
ZRT1rev	GGGAATTCAATGGCTGACAATC
CCC2for	GAATTTGTTCTGGGCACTTG
CCC2rev	CGAGCATTGGAGGAAGAGTTAT
COT1for	CAACTAGATATCAGCCCGGAAC
COT1rev	CGGCTCTTTCGGTTGAAGTA
UBC6for	CGGCAAATACAGGTGATGAAAC
UBC6rev	TTCAGCGCGTATTCTGTCTTC



## Anexo II

Tabla A.2. Composición aminoacídica de la peptona de caseína ácida (Laboratorios Conda).

Aminoácido	g/100g
Ácido aspártico	5,30
Ácido glutámico	13,70
Alanina	1,70
Arginina	2,00
Cistina	0,20
Fenilalanina	2,00
Glicina	1,00
Histidina	1,40
Isoleucina	2,90
Leucina	5,00
Lisina	4,60
Metionina	1,50
Prolina	5,80
Serina	2,80
Tirosina	1,70
Treonina	2,00
Triptófano	< 1,00
Valina	3,60