

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología



**La tolerancia a litio del mutante *cat2* de
Arabidopsis revela una estrecha relación entre
estrés oxidativo y etileno.**

Memoria del trabajo de Tesis Doctoral presentada por

Eduardo Bueso Ródenas

para optar al título de

Doctor en Biotecnología

Director:

Dr. Ramón Serrano Salom

Valencia, 2008

Agradecimientos

Todos los que me conocéis, sabéis que no soy muy bueno con las palabras, pero en esta ocasión voy a hacer un gran esfuerzo para expresar todo lo que tengo dentro. Es una tarea pendiente que tengo.

También tengo que decir que soy una persona que mira más el presente y al futuro, y puede ser que menosprecie un poco el pasado y a la gente que ya no está cerca de mí. Pero pensando en las cosas y la gente del pasado, me doy cuenta de que han sido muy importantes para mí, porque han moldeado una persona esencialmente feliz. La cosa más importante para mí. Gracias por haberos cruzado por el camino de mi vida. Hay mucha gente a la que agradezco y le tengo mucho cariño, pero no quiero hacer de esto una simple lista. Así que ya sabéis que aunque no os mencione, tenéis toda mi ayuda y mi apoyo en lo que queráis. Intentaré no defraudaros.

Parece mentira que hayan pasado más de 5 años desde que fui con mi compañera y amiga **Sonia** al laboratorio de **Ramón** y **Mariche** a pedirles si podíamos hacer el trabajo final de carrera. Ya en ese momento me di cuenta de la calidad humana que atesoran. Nos cogieron a los dos y sin embargo sólo quedaba sitio para uno en el laboratorio.

Me pongo a pensar todo lo que he vivido este tiempo y sé que soy afortunado. Hay personas que viven muchas menos experiencias en toda su vida. Sin exagerar, ha sido la mejor etapa de mi vida y no creo que ninguna venidera sea capaz de superarla, espero que sí de igualarla. Lo he tenido todo: el trabajado soñado, he conocido muchísima gente interesante sin alejarme de casa y de todo lo que quiero.

El futuro que me espera parece que va a ser divertido, por no decir complicado. Mi familia en Gandia, mi casa en Valencia y yo a saber dónde. Voy a ser ambicioso, porque yo creo que vidas no hay más que una. Quiero continuar construyendo mi familia y seguir trabajando en lo que me gusta. Por el libro que me estoy leyendo, sé que en el siglo XII ya había personas con los mismos problemas y ambiciones que al final lo conseguían. No voy a ser yo menos. El futuro dirá.

En primer lugar estoy agradecido a los jefes. A **Ramón** y a **Mariche** por su ayuda en todos los ámbitos. Por su consejo y dirección en los temas científicos, por su ayuda en el tema económico, por su comprensión, por su generosidad

y sobretodo por la felicidad que desprenden y contagian a todas las personas que les rodean.

Un apoyo fundamental al inicio del tfc, cuando estaba más perdido que un hijo p el día del padre (con perdón), fue el del **Pedro Serra**, ese hippie melenudo que me enseñó cómo moverme por un laboratorio. También mención especial quiero darle al locuaz **Jacobo** por recomendarme el labo.

A los mejores compañeros de trabajo que uno puede llegar a tener. A mi peculiar primer jefe **Krzysztof**, a **Santi** el indomable lobo estepario, incombustible en el trabajo y en el ocio, casi todo lo he aprendido de ti. A **Guillem**, por ser el más cercano durante casi toda la tesis, por tus gradillas, por tus bolis jeje...a **Regina** la chica más enamorada que conozco, por el entusiasmo que desprendes en todo lo que haces, a **Rosa**, la que más me ha aguantado durante la escritura de la tesis. Al montañero macarroni **Gaetano**, seguro que cuando seas doctor la autoridad te tendrá más respeto, a **Frank**, a **JM**, a **Bea**, a **Ana**, a **Nacho**. Y por último a **Balta**, que no recuerdo muy bien la época en que coincidimos en el labo, pero si el hecho de que nos hayamos hecho tan amigos a partir de esto.

A los del labo 2.08. A la pareja de expedición **Jorge y Fernando**, a la simpática **Mar**, al más vasco de los vascos **Joserra**, y al bombón de **Jessi**. A los ya doctores. A **Mauri**, a **Carlos** el papafritaguachinley por recoger siempre el jabón de la ducha, a **Steph** la francesa más valenciana, por intentar siempre mantener el orden del viejo labo 3. A **Lynne**, siempre dispuesta a responder todas las preguntas, ¡¡¡Qué buena vas a ser de profe!!!.

Una de mis grandes ayudas ha sido el grupo de **Pedro** y todos sus componentes: **Miguel, Ángela, Pedro, Silvia, Américo y Julia**. Os estoy muy agradecido a todos vosotros, nunca me dijisteis no y nunca me pusisteis mala cara. Se agradece un montón.

Al equipo de fútbol del IBMCP, cuánto hecho de menos esos gritos, que tanto estrés descargaban. Me acuerdo mucho de vosotros: **Emilio, Brande, Alberto, Capa, Andrés**... También a mis amigos de otros laboratorios, **Vasi, Jordi, Jorge, Pedro, Diego, Aurora, Astrid, a los fichajes (Barto, Pablo, Carol), Ale**...al americano más pasional **Douglas** y a su fiel compañero **Vito**.

También a los que pasaron poco tiempo en el labo pero el suficiente para recordarlos toda la vida. Mis favoritos: **Kasia**, la mejor anfitriona; trata de arrancarlo **Guido**; **SpiderHuw, Silvia, Samuela** y su peculiar idioma y a mi intento de amiga **Andrea**.

Un apartado especial requieren mis 3 alumnos, a **Juanvi**, al **Alumno** (aquel muchacho tímido que empezó las prácticas y acabo liándola en la boda), cuánto te echamos de menos. Y a **Rosi**, la rumbera. Espero que te vaya bien la vida, que te lo mereces. ¡¡¡Cuánto me habéis ayudado!!!

A todos los responsables de los servicios del IBMCP, en especial a **MD**, a **Eugenio**, a todos los del invernadero, a **Santiago Roures**, a **Ramón** y a **Alexis**, a **Ana Mira**. Todos vosotros habéis ayudado.

A mi viejo **ACER**, recién nacido empezó conmigo el proyecto y ha sabido morir justo en el momento adecuado, después de escribir la tesis. Ha muerto como un bravo guerrero.

A lo más importante de mi vida mis **amigos** y mi **familia**. Todos vosotros me habéis influenciado en desarrollarme como la persona que soy. En especial a mis **padres**, a mi **hermano**, a mis **suegros** y a mi **cuñada**.

Por último se lo agradezco a la persona que comparte la misma vía de la vida que yo, a mi reciente mujer **Carmen**, y al garbancito que lleva dentro. Por su apoyo, confianza, complicidad, amor, alegría...haces que cada día valga la pena.

Con el fin de investigar los efectos en la homeostasis de iones de un aumento en la concentración celular de peróxido de hidrógeno, se aisló un mutante de inserción de T-DNA en el gen CATALASA 2 de *Arabidopsis*. El mutante *cat2-1* presenta una reducción del 80% de la catalasa de hoja en comparación con genotipos silvestres y acumula más peróxido de hidrógeno en condiciones sin estrés. Además de presentar un tamaño reducido, un color verde más pálido y gran reducción en el número de raíces secundarias, el mutante *cat2-1* presenta una marcada sensibilidad a peróxido de hidrógeno, cloruro sódico, norespermidina, alta intensidad lumínica y estrés por frío.

Por otra parte, el mutante *cat2-1* presenta una tolerancia parcial cuando es crecido en medios con cloruro de litio en comparación con el genotipo silvestre. Este novedoso fenotipo no puede ser explicado por cambios en el transporte de este catión. Realmente, la toma de litio y de otros cationes tóxicos como sodio y norespermidina es mayor en el mutante *cat2-1*, mientras que los niveles de potasio de la planta son inferiores. La tolerancia a litio de este mutante parece ser resultado de una insensibilidad a la inhibitoria respuesta de etileno producida por el catión y a su reducida capacidad de producción de etileno. De acuerdo con esto, la inducción por etileno de genes de respuesta tales como PR4 y EBP/ERF72 es menor en el mutante *cat2-1*. Mutantes insensibles a etileno como *etr1-1* y *ein3-3* son tolerantes a litio y la inhibición de la biosíntesis de etileno con 2-aminoisobutirato protege contra la toxicidad del litio. Análisis de la expresión génica con micromatrices indican que la expresión de genes relacionados al transporte de cationes y a la síntesis y percepción de etileno no están alterados en el mutante *cat2-1*, lo que nos hace suponer que el peróxido de hidrógeno modula estos procesos a nivel de proteína. Todos estos resultados descubren una estrecha relación entre estrés oxidativo, la homeostasis de cationes y el etileno.

Amb la intenció de investigar els efectes de un increment en el H₂O₂ cel·lular en la homeostasi hem utilitzat un mutant de *Arabidopsis* de inserció de T-DNA del gen de la catalasa 2. Aquest mutant (*cat2-1*) exhibeix un 20% de activitat catalasa respecte als controls silvestres i a més té una major acumulació de H₂O₂ que el control silvestre en condicions normals. Altres fenotipus són la reduïda grandària, menor intensitat de color i una severa reducció en arrels secundàries. El mutant *cat2-1* exhibeix una major sensibilitat a H₂O₂, NaCl, norspermidina, alta intensitat de llum i estrès per congelació. Per altra banda, la germinació del mutant *cat2-1* es més tolerant a liti que la del control silvestre. Aquest nou fenotipus no es pot explicar per canvis en el transport de liti. Realment, la pressa de liti (i d'altres cations tòxics com el sodi i la norespermidina) és incrementada en el mutant *cat2-1*, però els nivells de potassi son menors. La tolerància a liti d'aquest mutant pareix ser la resultant de la insensibilitat al efecte inhibitori de l'etilè induït per aquest catió i la capacitat reduïda per a la producció de etilè. D'acord amb aixó, la inducció per etilè del gens PR4 i EBP/ERF72 es menor en *cat2-1*. El mutants insensibles a etilè com *etr1-1* i *ein3-3* son més tolerants a liti i la inhibició de la biosíntesis de l'etilè amb 2-aminoisobutirat protegeix front a la toxicitat del liti. L'anàlisi amb micromatrius de la expressió gènica indica que la expressió del gens relacionats amb el transport de cations i la síntesi i la percepció de l'etilè no son alterats en el mutant *cat2-1*, suggerint que el H₂O₂ modula aquestos processos a nivell de proteïna. Els resultats descobreixen una estreta relació entre estrès oxidatiu, homeostasi catiònica i etilè.

ABSTRACT

In order to investigate the effects of a permanent increase in cellular H₂O₂ on cation homeostasis we have utilized a T-DNA insertion mutant of the Arabidopsis CATALASE 2 gene. This mutant (*cat2-1*) exhibits 20% of wild type leaf catalase activity and accumulates more H₂O₂ than wild type under normal conditions. In addition to reduced size, pale green color and great reduction in secondary roots, the *cat2-1* mutant exhibited increased sensitivity to H₂O₂, NaCl, norspermidine, high light and cold stress. On the other hand, the germination of the *cat2-1* mutant is more tolerant to lithium than that of wild type. This novel phenotype cannot be explained by changes in lithium transport. Actually, the uptake of lithium (and of other toxic cations such as sodium and norspermidine) is increased in the *cat2-1* mutant while K⁺ levels were decreased. Lithium tolerance of this mutant seems to result both from insensitivity to the inhibitory ethylene induced by this cation and from reduced capability for ethylene production. Accordingly, induction by ethylene of responsive genes such as *etr1-1* and *ein3-3* are lithium tolerant and inhibition of ethylene biosynthesis with 2-aminoisobutyrate protects against lithium toxicity. Microarray analysis of gene expression indicates that the expression of genes related to cation transport and ethylene synthesis and perception was not altered in the *cat2-1* mutant, suggesting that H₂O₂ modulates these processes at the protein level. These results uncover a cross-talk between oxidative stress, cation homeostasis and ethylene.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Especies reactivas del oxígeno (ROS)	3
1.1.1 Producción de ROS	3
1.1.2 Compuestos no enzimáticos utilizados en la eliminación de ROS.....	6
1.1.3 Mecanismos enzimáticos de eliminación de ROS.....	6
1.2 Catalasa. Generalidades	8
1.3 Función señalizadora de las ROS	11
1.3.1 Histidinas kinasas como receptores de las ROS.....	11
1.3.2 Activación por ROS de proteínas kinasas activadas por mitógenos	12
1.3.3 Inhibición de proteínas fosfatasa mediante ROS	13
1.3.4 Activación de factores de transcripción mediante ROS	13
1.3.5 Expresión génica mediada por ROS.....	15
1.4 Peróxido de hidrógeno	17
1.4.1 Procesos biológicos mediados por peróxido de hidrógeno	18
1.5 Transporte iónico en membranas vegetales	21
1.5.1 Transporte de sodio en plantas	23
1.5.2 Transporte de potasio en plantas	27
1.6 Dianas de toxicidad conocidas del litio	33
1.7 Etileno, una hormona gaseosa	36
1.7.1 Biosíntesis del etileno.....	36
1.7.2 Regulación de las ACC sintasas	37
1.7.3 Etileno. Señalización	39
1.7.4 Regulación transcripcional mediante etileno.....	41
1.7.5 Regulación postraduccional de la señalización por etileno	42
1.8 Ácido abscísico. Hormona del estrés abiótico	42
1.8.1 Percepción del ABA	42
1.8.2 Regulación del ABA mediante metabolismo, conjugación y transporte.....	44
1.8.3 ABA: un modelo.....	45
1.9 <i>Arabidopsis</i> como sistema modelo	46

2. OBJETIVOS	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1 Material biológico	55
3.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	56
3.1.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
3.1.4 Vectores de clonación y transformación	56
3.2 Manipulación y crecimiento de <i>Arabidopsis</i>	59
3.2.1 Medios para el crecimiento de <i>Arabidopsis</i>	59
3.3 Manipulación y crecimiento de <i>E.coli</i>	60
3.3.1 Preparación de células competentes	60
3.3.2 Transformación de células competentes	61
3.4 Manipulación de <i>A. Tumefaciens</i>	61
3.4.1 Preparación de células competentes	62
3.4.2 Transformación de células competentes	62
3.5 Medios para el crecimiento de bacterias	62
3.6 Extracción de DNA genómico de <i>Arabidopsis</i>	63
3.7 Minipreparaciones de plásmidos	64
3.8 Purificación de plásmidos de <i>E.coli</i> a gran escala por lisis alcalina	65
3.9 Electroforesis de DNA	67
3.9.1 Preparación de gel preparativo	69
3.9.2 Preparación de agarosa-TBE	69
3.10 Southern Blot	69
3.11 Preparación de sondas radiactivas de DNA	71
3.12 Extracción de RNA de plantas	72
3.13 Northern Blot	73
3.14 Reacción en cadena de la DNA polimerasa	75
3.15 RT-PCR cuantitativa	76
3.16 Expresión génica mediante micromatrices de oligos	77
3.17 Transformación de <i>Arabidopsis</i> mediante <i>A. Tumefaciens</i>	80
3.18 Construcción de plantas transgénicas	81
3.19 Medida de actividad catalasa	81
3.20 Detección de peróxido de hidrógeno	82

3.21 Medida de la producción de etileno	82
3.22 Crecimiento en atmósfera de etileno	83
3.23 Ensayos de toma y acumulación de cationes	83
3.24 Medida de cationes y norspermidina	83
3.24.1 Cationes	83
3.24.2 Norespermidina	84
4. RESULTADOS	85
4.1 Aislamiento del mutante <i>cat2</i> de <i>Arabidopsis</i>	87
4.1.1 Diseño de cebadores	88
4.1.2 Identificación de homocigotos para la mutación de <i>cat2</i> por PCR	89
4.1.3 Identificación de homocigotos para la mutación <i>cat2-1</i> por Southern Blot	91
4.2 Análisis de expresión del gen <i>CAT2</i> en el mutante <i>cat2-1</i>	92
4.3 Caracterización bioquímica del mutante <i>cat2-1</i>	92
4.3.1 Medida de actividad catalasa.....	93
4.3.2 Detección de peróxido de hidrógeno	94
4.4 Complementación del mutante <i>cat2-1</i>	94
4.5 Caracterización fenotípica del mutante <i>cat2-1</i>	94
4.5.1 Alteraciones morfológicas.....	96
4.5.2 Sensibilidad a estreses abióticos.....	100
4.6 <i>cat2-1</i> presenta una alteración de la homeostasis de iones	100
4.6.1 Toma de iones.....	100
4.6.2 Acumulación.....	103
4.7 Fenotipos asociados al cambio de homeostasis iónica	105
4.7.1 Sensibilidad a norespermidina.....	105
4.7.2 Tolerancia a cloruro de litio	105
4.8 Resultados explicativos de la tolerancia al litio en <i>cat2-1</i>	106
4.8.1 Producción de etileno	106
4.8.2 Insensibilidad a etileno	107
4.9 La toxicidad del litio está mediada por etileno	111
4.11 Sensibilidad a estrés oxidativo de mutantes insensibles a etileno	113
4.10 Sensibilidad a ABA y papel en el cierre de estomas	114
4.12 Sobreexpresión del gen <i>CAT2</i>	116

4.13 Análisis transcriptómico en el mutante <i>cat2-1</i>	117
5. DISCUSIÓN	123
5.1 Aislamiento del mutante <i>cat2</i> de <i>Arabidopsis</i>	126
5.2 Caracterización bioquímica del mutante <i>cat2-1</i>	127
5.3 Complementación del mutante <i>cat2-1</i>	128
5.4 Caracterización fenotípica del mutante <i>cat2-1</i>	128
5.4.1 Alteraciones morfológicas.....	128
5.4.2 Sensibilidad a estreses abióticos.....	129
5.5 <i>cat2-1</i> presenta una alteración de la homeostasis de iones	130
5.6 Resultados explicativos de la tolerancia al litio en <i>cat2-1</i>	131
5.7 La toxicidad del litio está mediada por etileno	133
5.8 Sensibilidad a ABA y papel en el cierre de stomas	133
5.9 Análisis transcriptómico en el mutante <i>cat2-1</i>	134
5.10 Mecanismos de insensibilidad a etileno del mutante <i>cat2-1</i>	135
6. CONCLUSIONES	137
7. BIBLIOGRAFÍA	143
8. ANEXOS	159
8.1 Cebadores	161

INTRODUCCIÓN

1.1 Especies reactivas del oxígeno (ROS).

La evolución de los procesos metabólicos aeróbicos tales como la respiración y la fotosíntesis inevitablemente conduce a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas. La principal característica que tienen todas las ROS es su capacidad para producir daño oxidativo a proteínas, DNA y lípidos, y por ello, se explica la evolución de las complejas redes de mecanismos detoxificadores de las plantas tanto a nivel enzimático como no enzimático. Sin embargo, van en aumento las evidencias de que las ROS también tienen una función como moléculas señalizadoras en plantas, regulando procesos de desarrollo y de defensa frente a patógenos (Apel y Hirt, 2004).

En la presente tesis se realizará un estudio de las especies reactivas del oxígeno tanto en su componente oxidativa y daño celular como en su componente señalizadora, regulando ciertos procesos biológicos.

1.1.1 Producción de ROS.

Durante el desarrollo del metabolismo aeróbico se producen ROS de forma continua en diferentes compartimentos celulares. En condiciones fisiológicas normales son eliminadas por diferentes componentes de la defensa antioxidante. Este equilibrio entre la producción y la eliminación puede ser perturbado por un gran número de factores ambientales. Como resultado de estas perturbaciones, los niveles intracelulares de las ROS pueden aumentar de forma significativa. Además, estos niveles pueden ser aumentados por la propia planta a través de varias oxidasas y peroxidasas (Bolwell *et al.*, 2002). A este rápido incremento de la concentración de ROS se le llama explosión oxidativa. Las condiciones adversas que propician estas condiciones pueden tener origen biótico, es decir, producidas por otros organismos, o abiótico, debidas a cambios físicos o químicos del ambiente no favorables para la planta. Esta tesis se centrará exclusivamente en las causas de origen abiótico.

Producción abiótica de ROS.

Los principales factores abióticos de estrés que pueden romper el equilibrio entre la producción y eliminación de ROS en la planta son la alta intensidad de luz, los cambios drásticos de temperatura, el estrés mecánico y los metales pesados (Elstner, 1991).

En **cloroplastos** los dos principales procesos involucrados en la producción de ROS durante la fotosíntesis son la fotorreducción directa del oxígeno molecular a radical superóxido a través de los componentes del flujo electrónico asociados al fotosistema I (PSI) en la denominada reacción de Mehler (Mehler, 1951) y las reacciones ligadas al ciclo de fotorrespiración.

En las plantas expuestas a altas intensidades de luz que exceden la capacidad de asimilación de CO₂, se produce una sobrerreducción de la cadena de transporte electrónico que conduce a la inactivación del fotosistema II (PSII) y en consecuencia a una inhibición de la fotosíntesis. Las plantas usan dos estrategias para protegerse de esta fotoinhibición: a) Disipan térmicamente el exceso de energía en el complejo antena del PSII; b) El PSII transfiere electrones a diferentes aceptores dentro del cloroplasto.

En el caso de las plantas C₃, cuando la temperatura aumenta o la disponibilidad de CO₂ es limitada, se produce una oxigenación de la ribulosa 1,5-bisfosfato a través de la enzima Rubisco. Este proceso constituye la principal salida de electrones en la prevención de la fotoinhibición. Tras la reacción de oxigenación se libera glicolato que es translocado de cloroplastos a peroxisomas, donde es oxidado por la glicolato oxidasa produciéndose la liberación más importante de peróxido de hidrógeno durante la fotosíntesis.

Por otra parte, los radicales superóxido generados por la reducción del oxígeno molecular en el PSI son rápidamente transformados dentro del cloroplasto a peróxido de hidrógeno a través de la CuZn-superóxido dismutasa. También es destacable la fotorreducción del oxígeno molecular a agua oxigenada en condiciones de alta intensidad lumínica mediante la ascorbato peroxidasa Mehler (Asada, 1999).

Todos estos datos indican el papel crucial del oxígeno como aceptor electrónico involucrado en la fotoprotección (Apel y Hirt, 2004).

En células de mamíferos, las **mitocondrias** son la mayor fuente de ROS. Sin embargo la producción de éstas es muy baja en las de vegetales. Una de las razones por las cuales la producción es tan limitada, podría ser la presencia de la enzima oxidasa alternativa (AOX). La alternativa oxidasa alivia al complejo citocromo bc₁ del exceso de electrones y de esa forma puede ayudar a reducir la producción de ROS. Todo esto, está apoyado por los estudios realizados en los cuales se ha comprobado que el agua oxigenada induce la expresión de AOX, su sobreexpresión reduce la producción de ROS y líneas transgénicas antisentido con expresión reducida de AOX acumulan 5 veces más ROS que los controles (Maxwell, 1999).

Por otra parte, en las células vegetales como en otros organismos eucariotas, la mayor producción de peróxido de hidrógeno se realiza en los **peroxisomas** (del Río *et al.*, 2006). Recientemente se ha demostrado que en los peroximas también se producen radicales superóxido y el óxido nítrico. Entre los principales procesos metabólicos responsables de la producción de peróxido de hidrógeno en peroxisomas podemos encontrar la oxidación del glicolato, la β -oxidación de ácidos grasos y la reacción enzimática de las flavin oxidasas (Baker y Graham, 2002).

Por último los homólogos en plantas de las **NADPH oxidasas** denominadas **Rboh** han sido relacionadas con la producción de ROS en respuesta a patógenos, pero tras el descubrimiento de nuevos genes de NADPH oxidasas animales y nuevas funciones de los genes de planta *Rboh* se dislumbran nuevas funciones para los ROS producidos por NADPH oxidasas en la biología celular eucariota incluyendo papeles en la defensa, el desarrollo, la biosíntesis de hormonas y las transducción de señales en plantas (Sagi y Fluhr, 2006).

Las principales vías de producción de ROS en cloroplastos y peroxisomas tras estrés con alta intensidad de luz quedan representadas en la figura 1.1.

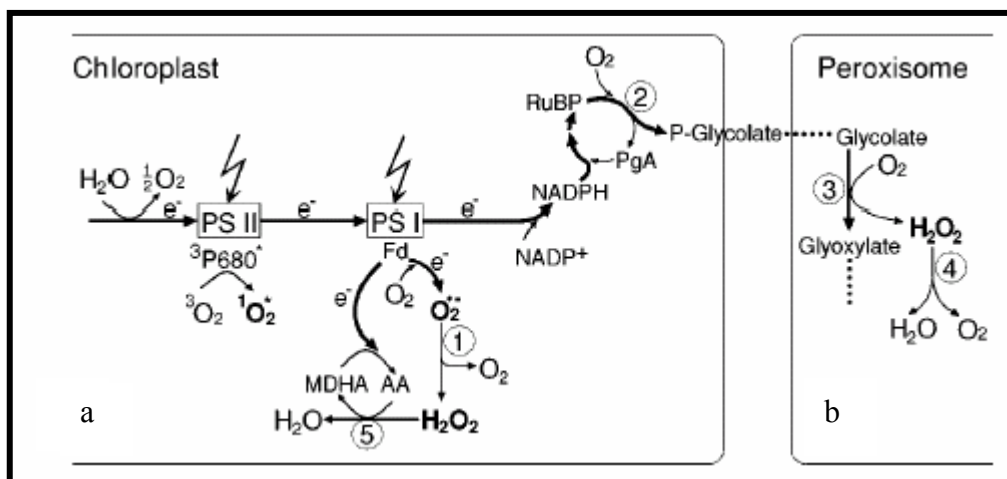


Figura 1.1. Principales vías de producción de ROS en cloroplastos y peroxisomas tras estrés con alta intensidad de luz. a) reducción del oxígeno molecular mediante el PSI, generando superóxido y agua oxigenada. b) reacción de oxigenación de la Rubisco y fotorrespiración que conduce a la producción de peróxido de hidrógeno dentro del peroxisoma. Las enzimas que aparecen 1) superóxido dismutasa 2) Rubisco 3) glicolato oxidasa 4) catalasa y 5) ascorbato peroxidasa. Apel y Hirt 2004.

1.1.2 Compuestos no enzimáticos utilizados en la eliminación de ROS.

Los principales antioxidantes no enzimáticos de las plantas son el ascorbato y el glutatión. Otros menos estudiados son los tocoferoles, flavonoides y carotenoides. Por ejemplo se sabe que mutantes con reducidos niveles de ácido ascórbico (Conklin *et al.*, 1996) y glutatión reducido (GSH) (Creissen *et al.*, 1999), resultan hipersensibles a estrés.

Las ROS transforman el glutatión de su forma reducida GSH a su forma oxidada GSSG, y al ascorbato lo oxidan a monodehidroascorbato (MDA) y dehidroascorbato (DHA). A través del ciclo ascorbato-glutatión GSSG, MDA y DHA vuelven a reducirse a GSH y ascorbato para reducir nuevos ROS (Noctor y Foyer, 1998). Las células vegetales necesitan altos niveles de ascorbato y GSH para la eliminación de las ROS, y por ello la producción de estos componentes es finamente regulada por la célula (Creissen *et al.*, 1999).

Poco se conoce sobre flavonoides y carotenoides, aunque se han realizado algunos estudios como la sobreexpresión en *Arabidopsis* de la β -caroteno hidroxilasa que hace aumentar la xantofila de cloroplastos permitiendo la tolerancia a estrés oxidativo por alta intensidad de luz (Davison *et al.*, 2002).

1.1.3 Mecanismos enzimáticos de eliminación de ROS.

Los mecanismos de detoxificación enzimáticos de ROS en plantas incluyen la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión peroxidasa (GPX), la catalasa (CAT) y la extensa clase III de peroxidasas (Apel y Hirt, 2004).

La SOD actúa en la primera línea de defensa contra las ROS, dismutando el superóxido a peróxido de hidrógeno. A continuación actúan la GPX, la APX y la catalasa detoxificando el peróxido de hidrógeno. La principal diferencia entre la catalasa y las otras dos enzimas, es que la APX y la GPX requieren un sistema de regeneración de ascorbato y de GSH respectivamente. Esto lo consiguen gracias al ciclo de ascorbato-glutatión (Apel y Hirt, 2004). En la figura 1.2 se esquematizan las principales reacciones detoxificadoras.

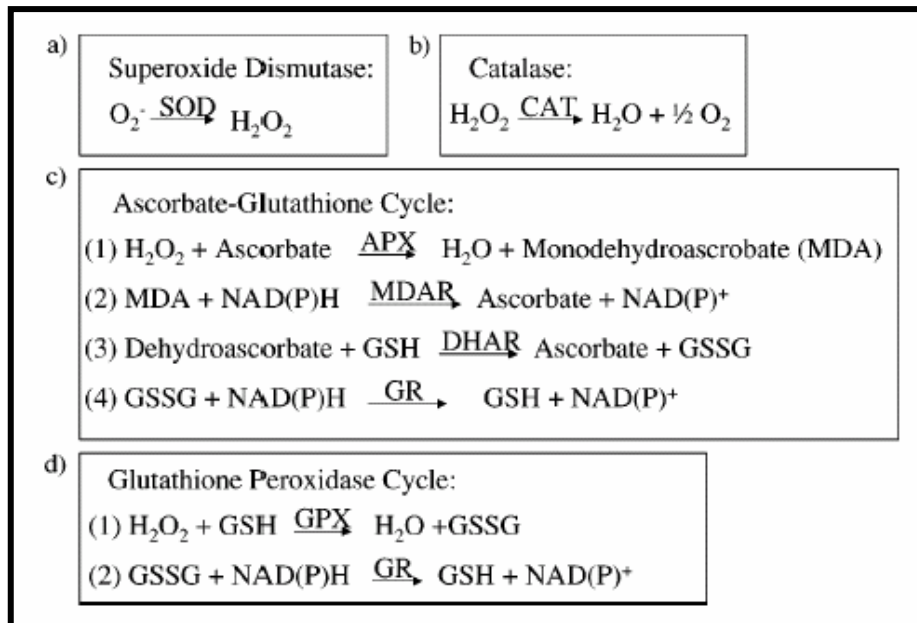


Figura 1.2. Principales reacciones enzimáticas involucradas en la eliminación de ROS. a) Superóxido dismutasa (SOD), b) catalasa (CAT), c) ciclo ascorbato-glutati6n (1) ascorbato peroxidasa (APX), (2) monodehidroascorbato reductasa (MDAR), (3) dehidroascorbato reductasa (DHAR), (4) glutati6n reductasa (GR), d) ciclo glutati6n-peroxidasa (1) glutati6n peroxidasa (GPX) y (2) glutati6n reductasa (GR) (Apel y Hirt, 2004).

Por otra parte las plantas contienen 2 clases de hemo-peroxidasas:

- 1) Peroxidasa intracelulares relacionadas con peroxidasa de bacterias (clase I) (Jespersen *et al.*, 1997).
- 2) Peroxidasa específcas de secreci6n (clase III), siendo la m1s estudiada de esta clase la peroxidasa HRPC de r1bano (Duroux *et al.*, 2003).

El mecanismo catalítico de las peroxidasa ha sido bien estudiado (Smith y Veitch, 1998) e incluye la reducci6n de per6xido de hidr6geno a agua, seguido por la consiguiente oxidaci6n de mol6culas peque1as.

Las peroxidasa de clase III en Arabidopsis incluyen 73 genes y realizan numerosas funciones como la lignificaci6n, la suberizaci6n y el catabolismo de auxinas (Hiraga *et al.*, 2001). Adem1s los genes codificantes de peroxidasa responden a se1ales de naturaleza tanto bi6tica como abi6tica y se cree que juegan un importante papel en todos estos procesos (Hiraga *et al.*, 2001).

1.2 Catalasa. Generalidades.

Los experimentos realizados en esta tesis abordan la influencia de las especies reactivas en *Arabidopsis*, utilizando como modelo un mutante deficiente en el gen de la catalasa *CAT2*. Este gen es el de mayor importancia dentro de los genes que codifican catalasas en *Arabidopsis*, con lo que es claro que el mutante tendrá mayores dificultades en la eliminación de especies reactivas de oxígeno que un genotipo silvestre. En las siguientes líneas se resumen las principales características de esta enzima fundamental.

La catalasa ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ oxidoreductasa; EC 1.11.1.6) es una proteína ferroporfírica tetramérica que cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Una curiosidad es el hecho de que no se haya encontrado ningún organismo multicelular que no posea algún tipo de actividad catalasa (Scandalios, 1987). La catalasa es una de las defensas celulares antioxidantes contra las denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS) (Beyer y Fridovich, 1987). Aunque todos los organismos aeróbicos necesitan un sistema de defensa para la eliminación de radicales reactivos derivados del oxígeno (generados en la cadena de transporte de electrones y en la β -oxidación de ácidos grasos), esta necesidad puede ser aún mayor en el caso de las plantas. Por ejemplo, las plantas de semilla oleaginosa como *Arabidopsis*, almacenan la mayoría de sus reservas energéticas y de carbono en forma de lípidos que durante la germinación son convertidos en carbohidratos. Este proceso comienza con la hidrólisis de los triglicéridos almacenados, seguido de la β -oxidación de ácidos grasos en unos peroxisomas especializados denominados glioxisomas (Olsen y Harada, 1995). Por ello la catalasa glioxisomal juega un importante papel en la eliminación del peróxido de hidrógeno generado durante la β -oxidación. Otra de las funciones más importantes que tiene la catalasa es, tras el desarrollo de la capacidad fotosintética de la planta, la degradación del peróxido de hidrógeno producido en la fotorrespiración tras la oxidación del glicolato por la glicolato oxidasa (Olsen y Harada, 1995).

La familia multigénica de catalasas en *Arabidopsis*.

La familia multigénica en *Arabidopsis* incluye tres genes que codifican subunidades individuales que se asocian para formar al menos 6 isozimas. *CAT1* y *CAT3* se encuentran situados en el primer cromosoma, mientras que *CAT2* se localiza en el cuarto. Las secuencias nucleotídicas de los tres genes son idénticas de un 70 a un

72%. Las secuencias de aminoácidos de las tres subunidades de catalasa son idénticas de un 75 a un 84% y considerando sustituciones conservativas son similares de un 87 a un 94% (McClung, 1997).

Localización de la expresión en *Arabidopsis*.

Los distintos isoenzimas, así como los distintos mensajeros de la catalasa tienen un patrón de expresión específico según el órgano de la planta. Por ejemplo, se pueden detectar 6 isozimas en inflorescencias y hojas, mientras sólo dos se observan en raíz (figura 1.3.).

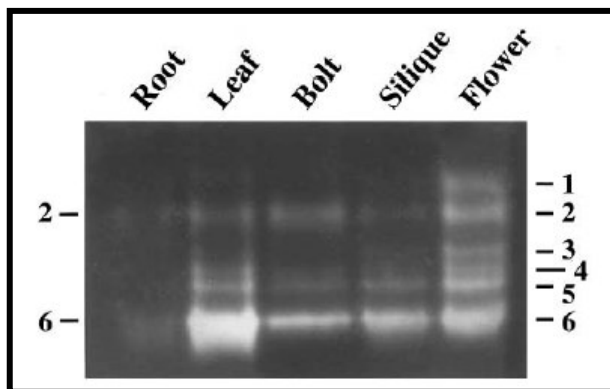


Figura 1.3. Análisis del patrón isoenzimático de la catalasa en diferentes órganos (raíz, hoja, escapo floral, silicua, flor) en plantas de 5 semanas de *Arabidopsis*. Las líneas horizontales indican los seis isozimas de catalasa. (McClung, 1997)

Además los 3 mensajeros tienen una alta expresión en inflorescencia, mientras que en hojas la expresión de *CAT2* y *CAT3* es mayor. En la figura 1.4 se puede observar como varía la expresión en los distintos órganos.

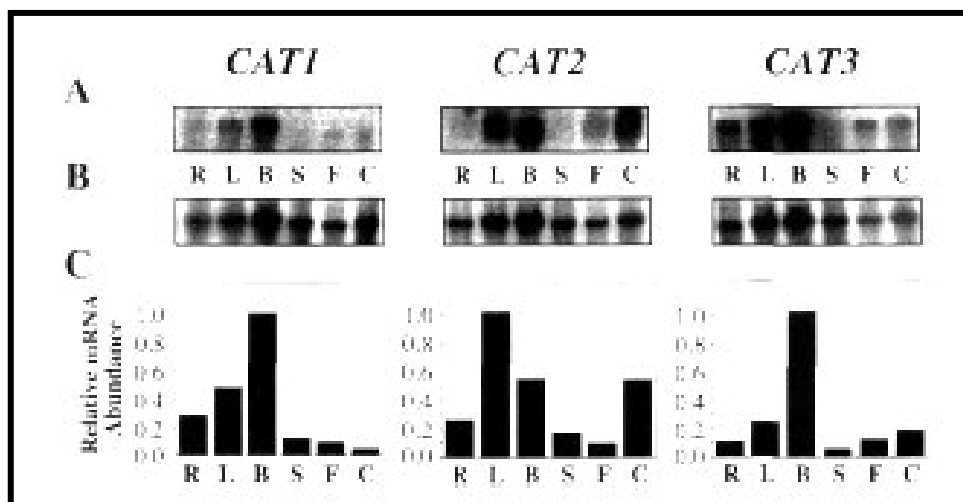


Figura 1.4. Acumulación específica de los mensajeros de la catalasa en *Arabidopsis*. A) Análisis Northern específico de tejido de distintos órgano (por orden raíz, hoja, escapo floral, silicua, flor, hojas caulinares) utilizando las sondas de *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*. B) Control de carga C) Cuantificación relativa de los distintos mensajeros. (Frugoli *et al.*, 1996)

Por otra parte se han realizado otros estudios de la expresión de *CAT2* a lo largo del ciclo vital de la planta. Se detecta un máximo de expresión un día después de la siembra. Esto es consistente con el papel de la catalasa como detoxificadora del peróxido de hidrógeno generado durante la β -oxidación de ácidos grasos. También se detecta un segundo máximo, de menor amplitud que el anterior, 6 días después de la siembra y que se asocia con el desarrollo de la capacidad fotosintética de la planta y comienzo de la fotorrespiración. Este máximo, en consonancia con lo expuesto, es dependiente de luz y no se expresa en plántulas etioladas. A partir de este momento, se producen profundas oscilaciones con una periodicidad circadiana de 24 horas y dependiente nuevamente de la luz, ya que no se presenta en plántulas etioladas (Zhong *et al.*, 1994).

Localización subcelular en *Arabidopsis*.

Tanto *CAT2* como *CAT3* poseen señales de localización peroxisomal en el extremo carboxi-terminal (Ser/Glu/Cys)-(Lys/Arg/His)-Leu. En cambio, en *CAT1* esta secuencia está sustituida por Thr-Arg-Leu. Esta sustitución en principio es conservativa pero en experimentos de luciferasa y esa secuencia de localización, no se llega a observar la señal en dicho orgánulo, lo que indica que *CAT1*, podría ser una catalasa no peroxisomal, como ocurre en el caso de la catalasa mitocondrial de maíz *Cat3* (Gietl, 1996).

Respuesta a luz en *Arabidopsis*.

Los mensajeros tanto de *CAT1* como de *CAT2* se inducen en condiciones de luz, aunque la inducción es mucho mayor en el caso de *CAT2*. Por el contrario el mensajero de *CAT3* muestra una rápida represión al iluminar plantas etioladas (Zhong *et al.*, 1994).

Regulación por ritmos circadianos en *Arabidopsis*.

Tanto *CAT2* como *CAT3* se encuentran regulados por ritmos circadianos, no así en el caso de *CAT1*. Lo más interesante es que las fases de máxima expresión más que distintas, se solapan, es decir cuando la expresión de *CAT2* es máxima, la expresión de *CAT3* es mínima. La mayor expresión de *CAT2* ocurre por la mañana, haciendo consistente su papel fotorrespiratorio. En cambio, la máxima expresión de *CAT3* ocurre por la noche, siendo toda una incógnita el significado de este hecho (McClung, 1997).

Respuesta a temperatura en *Arabidopsis*.

La expresión de *CAT2* aumenta considerablemente con el aumento de temperatura (37 °C) y con tratamientos de frío (0 °C), sin embargo la expresión de *CAT3* no está afectada por los cambios de temperatura (Zhong, 1996).

Relaciones con la resistencia sistémica adquirida (SAR).

Se ha comprobado que elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno pueden conferir resistencia a enfermedades y que esta resistencia puede ser eliminada con la adición exógena de catalasa (Wu *et al.*, 1995). Por ejemplo, existe un modelo que propone que el ácido salicílico (SA) se une e inactiva la catalasa, aumentando el nivel de peróxido de hidrógeno y otras ROS, disparando la SAR. Este modelo está apoyado con el hecho de que análogos de SA inducen la expresión de los genes PR, marcadores de la SAR, y además poseen la cualidad de inhibir *in vitro* la actividad catalasa (Conrath *et al.*, 1995).

1.3 Función señalizadora de las ROS.**1.3.1 Histidina kinasas como receptores de las ROS.**

Tanto en procariotas como en hongos los sistemas de dos componentes funcionan como sensores redox (Apel y Hirt, 2004). En procariotas, los sistemas de señalización de dos componentes consisten en una proteína kinasa localizada en la membrana que percibe una señal, tras ésta se produce una autofosforilación del residuo conservado de histidina (figura 1.5.). A continuación, el grupo fosfato se transfiere al residuo conservado del aspártico en el dominio denominado “modulador de respuesta”. Entonces, se produce un cambio conformacional en este dominio alterando su afinidad de unión al DNA y activando la expresión de genes específicos a través de cascadas MAPKs (Mitogen Activated protein Kinases). En contraposición a los animales, que carecen de estas kinasas, el genoma de *Arabidopsis* revela la presencia de 54 genes de histidina kinasas, histidina fosfotransferasas, moduladores de respuesta y proteínas relacionadas (Hwang, 2002).

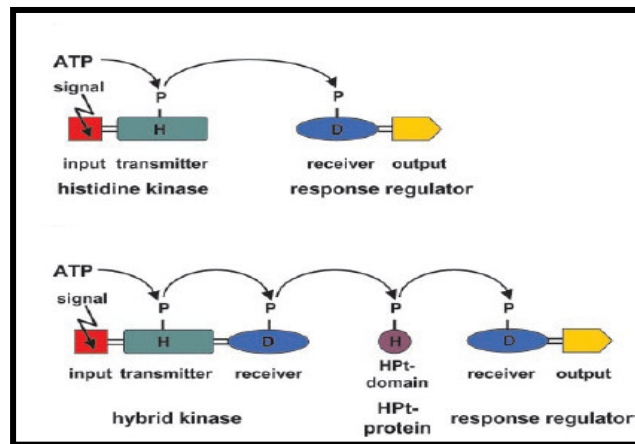


Figura 1.5. Representación esquemática de sistemas de dos componentes (Lohrmann, 2002). Ariba sin intermediario HPT y abajo con intermediario.

1.3.2 Activación por ROS de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Análisis de secuencia de los genomas de arroz y *Arabidopsis* revelan una extraordinaria complejidad en componentes de señalización por MAPK. Se conocen al menos, 100 genes MAPK, MAPKK y MAPKKK. La señalización por MAPKs está involucrada en respuestas a varios estreses, a hormonas y actúan también durante la citocinesis (Jonak *et al.*, 2002).

El peróxido de hidrógeno activa MAPK3 y MAPK6 vía ANP1 (MAPKKK). La sobreexpresión de ANP1 en plantas transgénicas produce un aumento de tolerancia a estreses por calor, congelación y salinidad (Kovtun, 2000).

Por otra parte, también está descrito que el peróxido de hidrógeno aumenta la expresión de la nucleótido difosfato kinasa 2 (NDPK2), una kinasa que interactúa y activa MAPK3 y MAPK6. La sobreexpresión de esta kinasa en *Arabidopsis* reduce la acumulación de peróxido de hidrógeno y aumenta la tolerancia a estrés oxidativo, salino y por frío (Moon, 2002).

Estos datos sugieren un panorama en el cual diferentes estreses inducen la producción de ROS que a su vez activan la señalización por MAPKs. Aunque aún no son conocidas las dianas donde actúan las MAPKs, la activación de éstas mediante ROS parece jugar un papel clave en la mediación de respuestas celulares a múltiples estreses.

1.3.3 Inhibición de proteínas fosfatasa mediante ROS.

Debido a que el peróxido de hidrógeno es un oxidante suave que tiene la capacidad de oxidar residuos tiol, se especula con que una de las vías de percepción sea la modificación de los grupos tioles de ciertas proteínas. Un trabajo reciente en humanos ha identificado que la fosfatasa PTP1B es modificable mediante peróxido de hidrógeno en la cisteína del sitio activo (van Montfort *et al.*, 2003). La inactivación de PTP1B mediante peróxido de hidrógeno es reversible y puede ser suprimida con la adición de glutatión. De una manera similar ocurre en *Arabidopsis* con la fosfatasa PTP1 que inactiva la MPK6, ya que puede ser inactivada mediante peróxido de hidrógeno (Gupta y Luan, 2003). Por último, también existen diversas fosfatasas involucradas en la señalización de ABA que son moduladas reversiblemente *in vitro* mediante peróxido de hidrógeno (Meinhard y Grill, 2001).

1.3.4 Activación de factores de transcripción mediante ROS.

Comparando los mecanismos de expresión de genes inducidos por ROS en procariotas, hongos y plantas se podrían descubrir aspectos comunes. En *E. coli* el factor de transcripción OxyR es el de mayor importancia en señalización por estrés oxidativo (Zheng *et al.*, 1998). En levaduras esta función tan importante la desempeña Yap1, ya que la mayoría de los genes inducidos por ROS depende de este factor de transcripción. OxyR y Yap1 son factores de transcripción sensibles a cambios rédox, y modulan la expresión de genes en respuesta a estrés oxidativo. Las ROS regulan la actividad de estos factores de transcripción a través de modificaciones covalentes de los grupos tioles de cisteínas (Apel y Hirt, 2004).

Diversos tipos de ROS reaccionan con distintos residuos de cisteínas con lo que se producen diferentes productos modificados, de esta forma se podría explicar como diferentes ROS podrían inducir distintos grupos de genes a través del mismo factor de transcripción (Delaunay *et al.*, 2000). Una de las mayores diferencias entre OxyR y Yap1 es que el factor de transcripción de levadura no percibe directamente las ROS sino que lo hace a través de Gpx3, que actúa como glutatión peroxidasa (figura 1.6). El alto grado de complejidad de las levaduras refleja la mayor flexibilidad que han desarrollado los sistemas de señalización en eucariontes (Liu *et al.*, 2005).

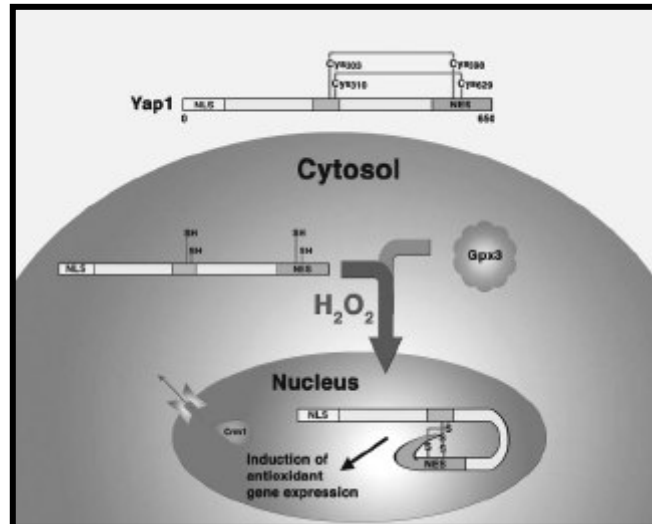


Figura 1.6. Regulación del factor de transcripción de levadura Yap1 (Liu *et al.*, 2005).

De forma parecida a las levaduras, las plantas han desarrollado una ruta de MAPKs y fosfatasa para la señalización de ROS (Apel y Hirt, 2004). Aunque en plantas aún no han sido identificados factores de transcripción modulados por reacciones redox, es altamente probable que estos existan.

La expresión de genes en respuesta a estrés oxidativo parece estar coordinado mediante la interacción de factores de transcripción con elementos *cis* de promotores específicos de estrés oxidativo (Gasch *et al.*, 2000).

Se tienen evidencias de que estos elementos *cis* de respuesta a estrés oxidativo existen en levaduras, plantas y animales. Por ejemplo, se han realizados trabajos con levaduras que han comprobado que homólogos de los factores de transcripción ATF y AP-1 de mamíferos funcionan como intermediarios clave de diversas señales de estrés al unirse a regiones *cis* conservadas de promotores inducibles por estrés (Gasch *et al.*, 2000).

También en micromatrices realizadas en *Arabidopsis*, utilizando peróxido de hidrógeno aparecen potenciales elementos *cis* de respuesta a peróxido de hidrógeno en genes regulados por esta molécula (Desikan *et al.*, 2001). Uno de estos elementos, el del promotor *as-1*, tiene una alta homología con el elemento *cis* del gen de mamíferos sensible a cambios redox AP-1 (Karin *et al.*, 1997). También en *Arabidopsis*, en trabajos realizados con mutantes en catalasa se encuentra un motivo en genes reprimidos (GAAGnnGAwG). Este motivo no se ha descrito anteriormente, aunque

existe el motivo GAGA descrito para *Brassica oleraceae* involucrado en respuestas de estrés (Vandenabeele *et al.*, 2004).

1.3.5 Expresión génica mediada por ROS.

El análisis transcriptómico se ha revolucionado en los últimos años gracias a la creación de micromatrices que comprenden el genoma completo. El estrés oxidativo afecta aproximadamente al 10% del transcriptoma de levaduras (Causton *et al.*, 2001). La exposición de células de levadura a diferentes estreses incluido peróxido de hidrógeno definen un conjunto de genes denominados “common environmental stress response” (CESR). Los genes inducidos de este grupo juegan una importante función en metabolismo de carbohidratos, detoxificación de ROS, degradación y plegamiento de proteínas y transporte de metabolitos. Los genes reprimidos de los CESR están involucrados en crecimiento, transcripción, consumo de energía y biosíntesis de ribosomas y nucleótidos (Chen *et al.*, 2003).

En plantas en un trabajo en que se exponían directamente células de *Arabidopsis* a peróxido de hidrógeno, se encontraron 175 genes diferencialmente expresados (1-2% de los 11.000 genes presentes en la micromatriz). De los 113 genes inducidos, se encontraron muchos que codifican proteínas con funciones antioxidantes o asociados a respuestas de defensa o a otros estreses. Otro grupo importante fueron genes que codifican para proteínas con funciones de señalización (Desikan, 2001). En la figura 1.7 se resumen las rutas de señalización de H₂O₂ en plantas. Tras la entrada a través de porinas o producción interna, el H₂O₂ intracelular activa la salida del Ca²⁺ vacuolar y la entrada de Ca²⁺ externo. Ello activa proteínas quinasas dependientes de Ca²⁺. Por otra parte el H₂O₂ activa directamente proteínas de unión de GTP e inhibe proteínas fosfatasas. También se activa por H₂O₂ (extra o intracelular) las histidina quinasas de los sistemas de dos componentes. Todo ello activa cascadas de MAP quinasas que regulan la expresión génica (Desikan *et al.*, 2001).

En otro trabajo en *Arabidopsis*, se analizó las consecuencias del estrés oxidativo en proteínas de mitocondrias. Tras el estrés se observa la acumulación de dos proteínas antioxidantes, las peroxiredoxinas y las proteínas disulfuro isomerasas, mientras que no se aprecian cambios importantes en proteínas asociadas al ciclo de Krebs (Sweetlove *et al.*, 2002).

Otra estrategia para estudiar los efectos del estrés oxidativo en la transcripción es inducirlo reduciendo la capacidad antioxidante de la planta. Líneas antisentido de catalasa y ascorbato peroxidasa muestran expresiones inducidas de superóxido dismutasa y glutatión reductasa. En líneas mutantes antisentido de catalasa aparecen las siguientes categorías funcionales (Vandenabeele *et al.*, 2004):

- Genes inducidos relacionados con la traducción y la proteólisis. Por ejemplo aparecen proteínas ribosómicas de citoplasma y factores iniciadores de la traducción.
- Aparecen también inducidos genes relacionados con la respuesta hipersensible como el gen de “hevein like protein”. También aparecen inducidos los genes de dos β 1,3-glucanasas y de proteínas kinases con dominios de calmodulina.
- Aparecen reprimidos genes relacionados con la biosíntesis de antocianinas.
- Aparecen reprimidos genes nucleares involucrados en fotosíntesis e inducidos genes involucrados en el metabolismo mitocondrial como el citocromo c y la Hsp60 (“Heat shock protein 60”).
- Aparecen genes de 85 factores de transcripción inducidos entre los que predominan los “AP-2 related transcription factors”, WRKY, Myb y NAC. También aparecen genes de 36 kinasas diferentes como las MAPK y las LRR (“Leucine Rich Repeat”) kinasas y genes de algunas fosfatasa.

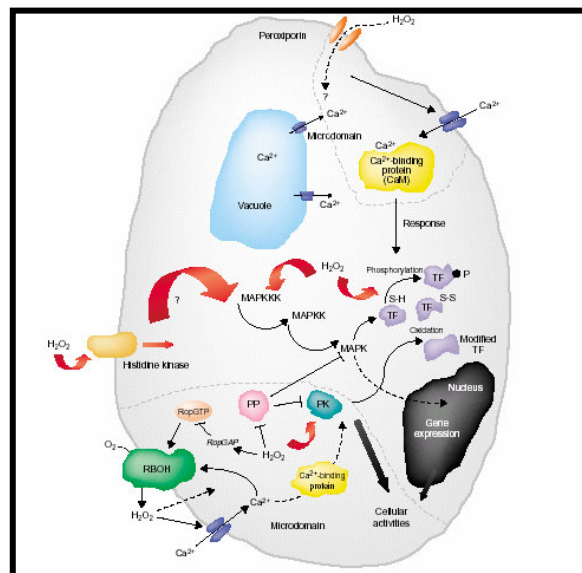


Figura 1.7. Señalización del peróxido de hidrógeno en la célula vegetal (Desikan *et al.*, 2001). PK: proteínas kinases, PP: proteínas fosfatasa.

1.4 Peróxido de hidrógeno.

Mención especial requiere el peróxido de hidrógeno y los principales procesos biológicos en los cuales intermedia. En la presente tesis el peróxido de hidrógeno toma una especial relevancia, ya que es la especie reactiva que actúa en mayor grado tras la anulación de la mayor parte de la catalasa, como es en el caso del mutante *cat2* con el que se trabaja. Como ya hemos comentado anteriormente, hasta fechas relativamente recientes, la especie reactiva de oxígeno peróxido de hidrógeno (H_2O_2) estaba considerada únicamente como un metabolito celular tóxico. Sin embargo, gracias a los últimos estudios realizados, queda claro que el peróxido de hidrógeno es mucho más que eso, ya que funciona como molécula señalizadora que media respuestas a distintos estímulos tanto en células animales como en vegetales (Neill *et al.*, 2002). Por tanto, como molécula señalizadora, el peróxido de hidrógeno debe tener regulada su síntesis, y debe tener respuestas y dianas celulares específicas. Hasta el momento, en la mayor parte de los casos todo esto es desconocido.

Ciclo del peróxido de hidrógeno en la célula vegetal.

En la figura 1.8 se esquematiza todo lo comentado anteriormente para las ROS pero concretado para el peróxido de hidrógeno. Su formación en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, y mediante oxidasas y peroxidasas. Su eliminación mediante compuestos no enzimáticos y enzimáticos y su función señalizadora y su posible transporte a través de canales de agua y peroxiporinas.

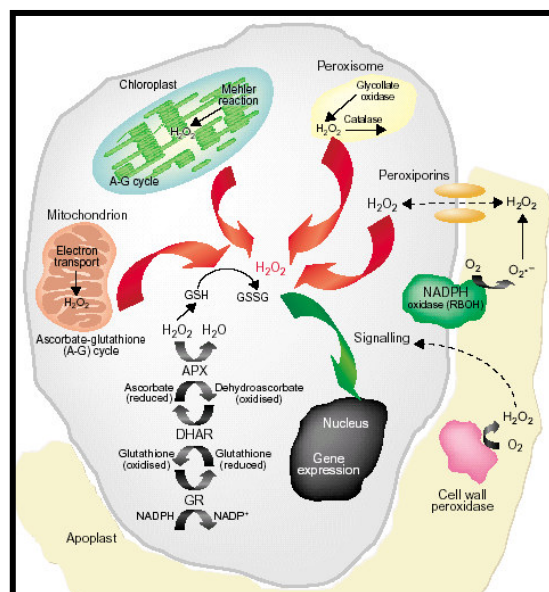


Figura 1.8. Ciclo del peróxido de hidrógeno en la célula vegetal. (Neill *et al.*, 2002).

1.4.1 Procesos biológicos mediados por peróxido de hidrógeno.

Cierre de estomas.

Los estomas son poros microscópicos de la epidermis de la parte aérea de las plantas que permiten tanto la entrada de CO₂ como la salida de vapor de agua. La apertura de éstos, está regulada por un par de células adyacentes denominadas células oclusivas que se hinchan o se encogen para abrir o cerrar el ostiolo, que es el orificio que controla este intercambio gaseoso (Nilson y Assman, 2007).

Durante la apertura del estoma se produce un aumento de volumen celular debido a una subida en la concentración de solutos intracelulares lo que conlleva una caída en el potencial hídrico de las células oclusivas y ello provoca una toma de agua en estas células. Debido a esto, estas células se hinchan haciendo más ancha la apertura del poro. En el caso del cierre del estoma, se produce lo contrario, la reducción de la concentración de solutos y del volumen de las células oclusivas que se encogen estrechando entonces la apertura estomática (Pandey *et al.*, 2007).

Durante la apertura y cierre de estomas se producen numerosos eventos. Los principales modelos que involucran a canales y transportadores iónicos están representados en figura 1.9.

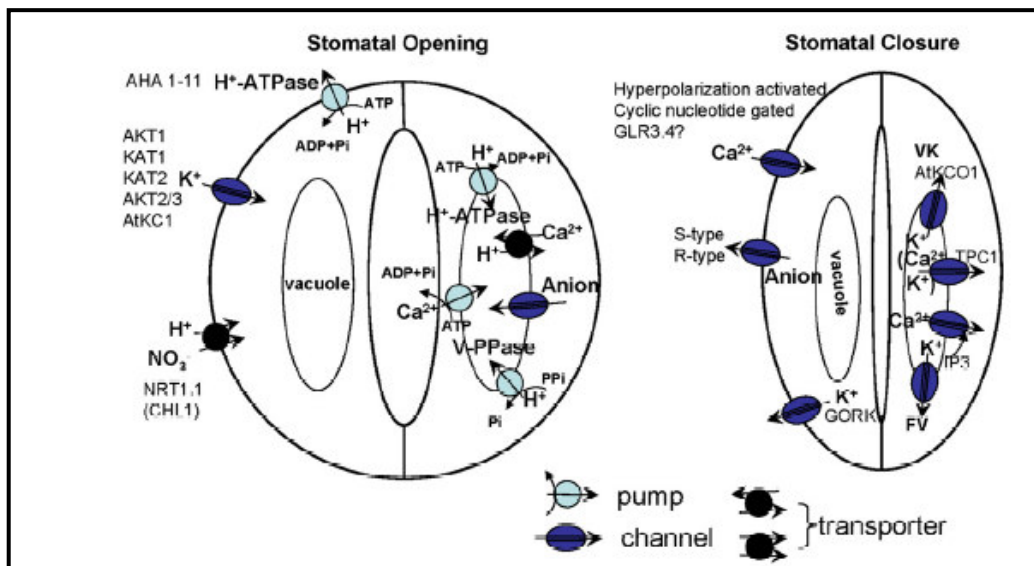


Figura 1.9. Representación de los canales y transportadores de iones involucrados en la apertura y cierre de estomas. (Pandey *et al.*, 2007).

Durante la apertura estomática, el flujo de salida de protones desde el citosol mediada por la H^+ -ATPasa hiperpolariza el potencial de membrana, produciendo una activación de los canales de entrada de potasio permitiendo la acumulación de este catión. El anión malato producido a partir de almidón es la principal especie aniónica que se acumula durante la apertura estomática. También contribuyen a la apertura estomática la toma de los aniones cloruro y nitrato. Durante el cierre estomático, se produce una depolarización de la membrana debido a la inhibición de la actividad H^+ -ATPasa y la activación de canales aniónicos que provocan la salida de cloruro, malato y nitrato. La depolarización resultante produce una activación de los canales de salida de potasio (McRobbie, 2006).

El modelo presentado en la figura 1.10 postula que el ácido abscísico activa la síntesis de peróxido de hidrógeno en las células oclusivas del estoma, supuestamente vía NADPH oxidasa. Este peróxido de hidrógeno a concentraciones micromolares, inactiva los canales de entrada de potasio, produce alcalinización y activa los canales de calcio de la membrana plasmática. Debido a esto, se produce un aumento en el potencial hídrico de las células oclusivas, lo que conlleva una salida del agua y un cierre del estoma.

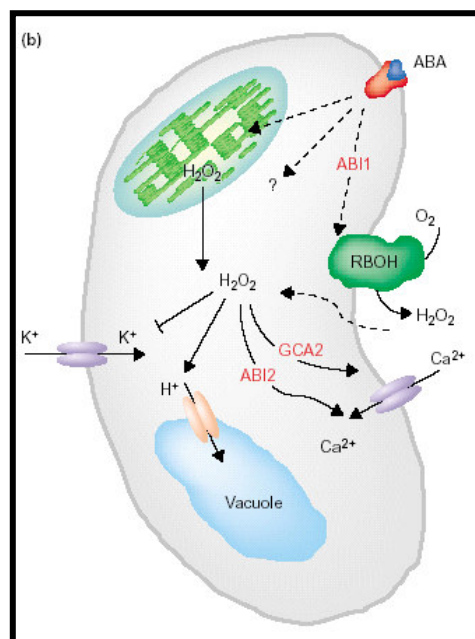


Figura 1.10. Señalización de ABA y H_2O_2 en las células oclusivas (Neill *et al.*, 2002)

Gravitropismo en raíz.

El trabajo realizado por Joo *et al.*, 2001 (figura 1.11) pone de manifiesto el importante papel de las ROS en el gravitropismo de la raíz, funcionando como un elemento importante en la transducción de la señal mediada por auxinas. La aplicación asimétrica de peróxido de hidrógeno produce la curvatura de la raíz, que queda inhibida por la aplicación de diferentes antioxidantes. Los autores llegan a la conclusión que las auxinas redistribuidas por el efecto de la gravedad inducen la curvatura de la raíz a través de la producción de ROS. Además también concluyen que las ROS actúan por debajo de las auxinas, ya que con la aplicación del inhibidor de auxinas NPA (ácido N-1(-naphthyl)phthalamic) se sigue produciendo curvatura de la raíz tras la aplicación de peróxido de hidrógeno.

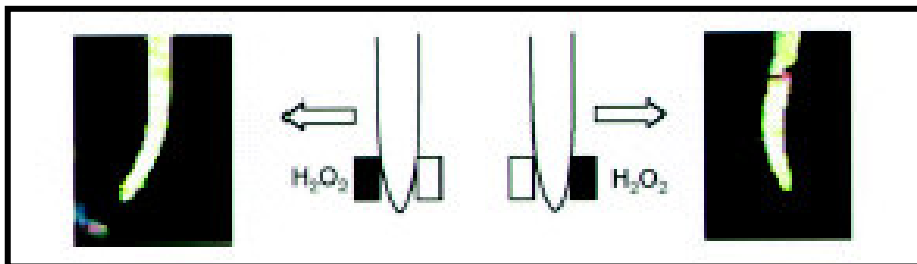


Figura 1.11. Efecto en la curvatura de la raíz tras la aplicación asimétrica de peróxido de hidrógeno (Joo *et al.*, 2001).

Muerte celular programada (PCD).

La muerte celular programada puede estar iniciada por diferentes estímulos y está mediada entre otros por peróxido de hidrógeno y óxido nítrico (Beers y McDowell, 2001). Aunque el orden de ejecución de la PCD en plantas no está totalmente consensuado, se sabe que se produce una alteración de la actividad mitocondrial que incluye la formación de poros y cambios en su permeabilidad.

Las concentraciones de peróxido de hidrógeno que se necesitan para desencadenar la PCD varían, reflejando posiblemente diferencias en la capacidad antioxidante de las células. Por ejemplo los protoplastos, son mucho más sensibles que las células (sensibles a concentraciones micromolares, en contraposición a concentraciones milimolares de las células), debido principalmente a su reducida capacidad antioxidante (Neill *et al.*, 2002).

1.5 Transporte iónico en membranas vegetales.

Uno de los principales objetivos de la tesis es comprobar si se produce un cambio en la homeostasis iónica de la planta tras el cambio redox producido por el incremento celular del peróxido de hidrógeno.

Una de las principales características de las membranas plasmáticas es su capacidad para mantener iones y moléculas dentro de la célula a concentraciones distintas de las existentes en el medio externo. Un ión se mueve de forma pasiva si lo hace a favor de la fuerza físico-química que actúa sobre él, de la misma forma, un ión es transportado de forma activa si su movimiento se realiza en contra de dicha fuerza, para lo cual las células vivas emplean energía metabólica. Dicha fuerza físico-química se denomina fuerza ión motriz que consiste en la diferencia entre el potencial de membrana de las células y el potencial de Nernst para el ión involucrado en el transporte (Taiz y Zeiger, 2002).

Transporte pasivo de iones

El transporte pasivo se produce a favor del gradiente de potencial electroquímico, esto implica que el ión tiende a acumularse en las células en una concentración próxima al equilibrio. El máximo exponente de este transporte son los canales de iones.

Canales de iones

Son proteínas transmembranas que funcionan como poros selectivos de iones. El tamaño del poro y la densidad de cargas sobre su superficie interior determinan su especificidad de transporte (Taiz y Zeiger, 2002). Este transporte de iones es siempre pasivo, la dirección del flujo de un ión en particular es dictada únicamente por el gradiente de potencial electroquímico del mismo. Los canales de iones no sólo están presentes en la membrana plasmática sino también en el tonoplasto, retículo endoplasmático, mitocondria, membrana interna del cloroplasto y membrana tilacoidal. Estos canales no se encuentran abiertos todo el tiempo, sino que presentan una estructura llamada “gate” (puerta) que abre y cierra el poro en respuesta a señales externas como cambios en el potencial de membrana, pH, concentraciones de Ca^{2+} , hormonas y luz (Taiz y Zeiger, 2002). Los canales regulados por potencial eléctrico son frecuentemente unidireccionales (rectificadores de corriente), es decir, se abren sólo

cuando el potencial los hace funcionar en una determinada dirección (de entrada o de salida del ión) (Taiz y Zeiger, 2002).

Transporte activo de iones

En el transporte activo, el ión se mueve en sentido contrario al gradiente de potencial electroquímico. La existencia de este tipo de transporte es esencial para las células, ya que para el correcto funcionamiento de las rutas metabólicas, se necesitan concentraciones internas de iones muy por encima o muy por debajo de la concentración de equilibrio. Se distinguen dos tipos de sistemas en función de la energía que utilizan para realizar el transporte. El primero es el de los transportadores primarios o bombas que realizan el transporte de iones consumiendo energía metabólica. El segundo son los transportadores secundarios o sistemas de cotransporte que utilizan principalmente el gradiente de H^+ , generado por la actividad de las bombas primarias, para impulsar los iones en contra de su gradiente de potencial electroquímico (Fernández y Maldonado, 2000).

Bombas primarias

Son proteínas de membrana que mueven iones en contra de su gradiente de potencial electroquímico utilizando energía metabólica (Fernández y Maldonado, 2000). En las células vegetales, la bomba primaria que energiza la membrana plasmática es la H^+ -ATPasa, una bomba de protones que genera un gradiente de H^+ a través de la membrana hidrolizando ATP. La H^+ ATPasa es una bomba electrogénica ya que el transporte de H^+ genera un movimiento neto de cargas a través de la membrana, generando un déficit de cargas positivas en el citoplasma y un potencial de membrana muy negativo (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001).

En el tonoplasto se ubican dos bombas de H^+ . La H^+ ATPasa de vacuola que difiere de la de membrana plasmática en su estructura, mecanismo de acción y en su relación con los inhibidores, y la H^+ -PP_iasa (pirofosfatasa) vacuolar que usa pirofosfato como fuente de energía (Fernández y Maldonado, 2000).

Transportadores secundarios

Para que este proceso de transporte sea termodinámicamente posible, es necesario que la fuerza protón motriz (gradiente de potencial electroquímico para H^+) supere el gradiente de potencial electroquímico de la molécula (Taiz y Zeiger, 2002). Según el sentido del movimiento del soluto que se transporta, se distinguen dos tipos de transporte secundario.

Simporte: el soluto se mueve en el mismo sentido que los H^+ . Suelen mediar la incorporación de nutrientes y aniones.

Antiporte: el soluto y los H^+ se mueven en sentido contrario. Suelen mediar la salida o compartimentación en vacuola de iones.

1.5.1 Transporte de sodio en plantas.

Entrada de sodio

En condiciones fisiológicas típicas, las plantas mantienen en el citosol una concentración relativamente alta de potasio (100-200 mM) y una concentración relativamente baja de sodio (1-10 mM) (Higinbotham, 1973). Debido al potencial eléctrico de membrana (-140 mV), un aumento en la concentración extracelular de sodio hará que se produzca un gran gradiente de potencial electroquímico para el catión en cuestión que favorecerá el transporte pasivo del sodio desde el exterior hasta el citosol.

La entrada del sodio en las células de la raíz es un tipo de transporte pasivo en el cual los canales de iones y los sistemas de uniporte son los candidatos más probables para realizar esta función. Estos incluyen a HKT, LCT1 y NSCC (CNGC y GLRs). Aunque el papel de cada tipo de transportador puede variar dentro de especie y condición de crecimiento, algunas evidencias sugieren que los diferentes transportadores podrían trabajar en paralelo, llevando a cabo la entrada de sodio a la raíz (Apse y Blumwald, 2007).

LCT1 (“Low affinity Cation Transporter”)

Se trata de un transportador de cationes de baja afinidad, que fue aislado en trigo usando un rastreo por complementación de toma de potasio en un mutante de levadura. En levadura, LCT1 cataliza la toma de diversos cationes como sodio, rubidio y calcio. LCT1 también produce hipersensibilidad a sodio en levadura, que no es mitigada por bajas concentraciones de calcio (2mM). Se ha sugerido que LCT1 podría ser un componente de toma de sodio insensible a calcio y que no se satura a bajas concentraciones externas de sodio (7 mM) (Amtman *et al.*, 2001). Por otra parte, no se han encontrado secuencias similares ni en arroz, ni en *Arabidopsis*, con lo que podría ser única en trigo.

NSCC (Non Selective Cation Channels)

Son la principal vía de entrada de sodio en las raíces cuando existe una alta concentración de este catión en el medio. Aunque en las bases de datos existen muchos

genes candidatos que podrían codificar estos canales, aún no se ha comprobado el caso de ninguno de ellos. Existen dos familias, los CNGCs “cyclicnucleotide-gated channels” y los GLRs “glutamate-activated channels” que han sido sugeridas como candidatos de estos canales (Tester y Davenport, 2003).

Hasta la fecha han sido caracterizados 5 AtCNGCs. Estudios de electrofisiología sugieren que AtCNGC 4 y AtCNGC 1 son igualmente permeables a potasio y sodio (Leng *et al.*, 2002). AtCNGC 2 parece ser exclusivo para potasio (Leng *et al.*, 2002). AtCNGC 10 recupera el transporte de potasio en mutantes defectivos de *E.coli*, levadura y en el mutante *akt1-1* de *Arabidopsis*, sugiriendo una función de transporte de potasio hacia la raíz (Li *et al.*, 2005). AtCNGC 3 fue recientemente caracterizada por complementación funcional en levadura y mediante mutantes de T-DNA en *Arabidopsis* (Gobert *et al.*, 2006). AtCNGC3 se expresa principalmente en las células epidérmicas y corticales de la raíz. En *Arabidopsis* las plántulas mutantes en comparación con las silvestres mejoraron su crecimiento en altas concentraciones de cloruro sódico y cloruro potásico sugiriendo una restricción en el flujo de entrada de estos cationes.

Los GLRs (“Ionotropic glutamate receptors”) son proteínas que interaccionan con glutamato y forman canales de cationes (entre los que encontramos canales de calcio y sodio en la raíz de *Arabidopsis*) con un amplio rango de permeabilidades. En *Arabidopsis* la familia putativa abarca 20 miembros (Essah *et al.*, 2003).

HKT (H⁺,K⁺ Transporter)

Se trata de transportadores de alta afinidad de potasio que funcionan como sistemas de simporte Na⁺:K⁺ y como sistemas selectivos de uniporte de Na⁺ (Horie y Schroeder, 2004). En *Arabidopsis* existe un único miembro de esta familia que ha sido identificado en diferentes tejidos y que transporta exclusivamente Na⁺. En la raíz sólo se encuentra en la estela, pero sin embargo, en los mutantes *AtHKT1* no se han encontrado diferencias en la toma de sodio (Essah *et al.*, 2003). Se ha propuesto que *AtHKT1* funciona en la recirculación de Na⁺ desde hojas a raíz via floema o en la absorción de Na⁺ desde el xilema radicular (Sunarpi *et al.*, 2005). En cambio en arroz la expresión de algunos de los 9 miembros otorga un papel importante en la toma de sodio de la raíz (Horie *et al.*, 2001). También en trigo TaHKT2;1 funciona como sistema de simporte Na⁺:K⁺ y su represión en la planta reduce la acumulación de sodio en la raíz y mejora la tolerancia a sal (Laurie *et al.*, 2002).

Salida de sodio

En presencia de niveles elevados de sodio en el exterior de la célula, los gradientes electroquímicos que producen la toma de sodio en las células de la raíz convierten el proceso de salida de la célula de este catión en un proceso activo. La salida del sodio en las células animales y de microorganismos se realiza directamente a través de ATPasas bombeadoras de Na^+ , pero estas bombas no existen en plantas superiores (Horie y Schroeder., 2004). En plantas esta salida se produce mediante un transporte secundario activo localizado en la membrana plasmática utilizando antiportadores Na^+/H^+ . En *Arabidopsis*, el producto del gen SOS1 ha sido identificado como mediador, al menos en parte, esta salida de sodio celular (Shi *et al.*, 2000). SOS1 fue identificado por mapeo de un mutante recesivo con hipersensibilidad a sodio. Los genes SOS2 y SOS3 también fueron encontrados en el mismo rastreo y tienen la función de regular la actividad de SOS1. SOS3 es una proteína que se une a calcio y recluta a SOS2 a la membrana plasmática. SOS2 es una serina /treonina proteína kinasa que activa a SOS1 por fosforilación y produce un aumento de la actividad de intercambio Na^+/H^+ en vesículas aisladas de membrana plasmática (Qiu *et al.*, 2003).

Por otra parte las membranas del mutante *sos1* siguen presentando cierta actividad de intercambio Na^+/H^+ , es por ello, que se cree que pueden existir otros antiportadores, como el caso de la familia CHX de *Arabidopsis* que comprende 28 miembros (Sze *et al.*, 2004).

Transporte radial en la raíz

La principal restricción de carga al xilema es realizada por la limitación de la entrada de sodio a la estela desde el apoplasto radicular mediante una efectiva banda de Caspary y un eficiente sistema de salida de sodio situada en las células radiculares (Steudle, 2000).

Por otra parte existe un mutante que sobreacumula sodio en la parte aérea de la planta, *sas1*, que es defectivo en el transporte radial de este catión. Este mutante presenta la misma concentración de sodio en raíz que el control, pero en cambio, presenta una concentración de 2 a 7 veces mayor en la parte aérea. Esta mutación todavía no se ha asociado a ningún gen, pero se sabe que se localiza en la parte superior del cromosoma 3 (Nublat *et al.*, 2001). También se conoce el papel fundamental que juega AtCHX21 en la selectividad iónica de la endodermis. Por ejemplo se sabe que el

mutante *chx21* posee una baja concentración de sodio en el xilema así como en hojas (Hall *et al.*, 2006).

Compartimentación de sodio en vacuola

La compartimentación de sodio en vacuola proporciona un eficiente mecanismo para evitar los efectos tóxicos del sodio en el citosol. El transporte de sodio a vacuolas es mediado por antiportadores catión/protón que funcionan gracias a la fuerza protón motriz generada por la H^+ -ATPasa y la H^+ -PPasa vacuolares. Aunque la actividad de estos antiportadores fue demostrada hace más de 20 años (Blumwald y Poole, 1985), su caracterización molecular fue únicamente posible después del proyecto genoma de *Arabidopsis*. AtNHX1 fue el primer miembro clonado de la familia de antiportadores Na^+/H^+ NHX (Gaxiola *et al.*, 1999). Posteriormente se conoció que también puede funcionar como antiportador K^+/H^+ en las mismas vacuolas (Venema *et al.*, 2002). A partir de entonces la existencia de las proteínas NHX ha sido demostrada en todas las plantas testadas, tanto en gimnospermas como en angiospermas, en monocotiledóneas y en dicotiledóneas (Pardo *et al.*, 2006). Se han demostrado otras funciones importantes de los transportadores NHX como son la de regulación del pH endosomal (Yamaguchi *et al.*, 2001), la expansión celular y la homeostasis de potasio (Apse *et al.*, 2003).

El papel del antiportador NHX toma importancia en la homeostasis de sodio en presencia de medios con alta concentración de cloruro sódico que producen inevitablemente incrementos en la concentración celular de este catión. Se ha demostrado una correlación entre la expresión de genes codificantes de antiportadores NHX y la tolerancia a sal que presentan distintos cultivares de algodón (Wu *et al.*, 2004). Resultados similares se han observado en trigo donde la alta expresión de antiportadores endógenos vacuolares en raíz y parte aérea facilita la salida de sodio del citosol, mejorando con ello la tolerancia a sal (Saqib *et al.*, 2005). Por último se ha remarcado su papel con la generación de plantas transgénicas resistentes a estrés salino sobreexpresando genes NHX (Yamaguchi y Blumwald, 2005).

Carga y descarga del xilema

En condiciones normales la entrada de sodio al xilema se asume que es un proceso activo. Bajo condiciones de salinidad moderada se ha propuesto en *Arabidopsis* a SOS1 como sistema de carga al xilema, ya que los mutantes *sos1* tienen una menor acumulación de sodio (Shi *et al.*, 2000).

En condiciones de alta salinidad la carga de sodio al xilema se presenta como un proceso pasivo, siendo probable que la función también esté realizada por SOS1. La

descarga de sodio del xilema parece ser un proceso pasivo, mediado por canales permeables a sodio de las células flanqueantes, siendo *AtHKT1* uno de estos canales (Sunarpi *et al.*, 2005). El mismo papel de descarga aparece en arroz con *OsHKT1;5* y en trigo con *Nax2* (Apse y Blumwald, 2007).

Las funciones de todos estos transportadores de Na^+ se resumen en la figura 1.12.

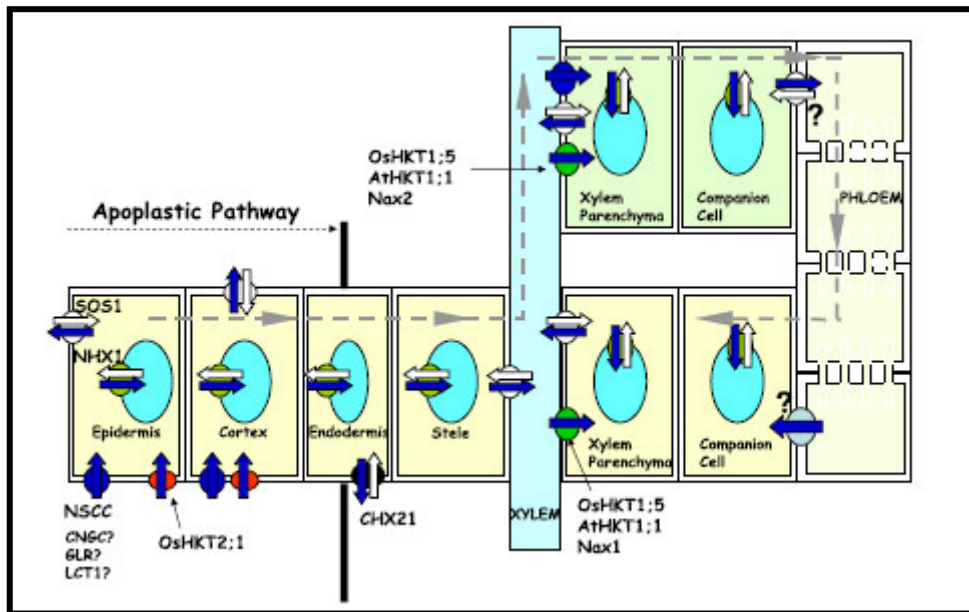


Figura 1.12. Diagrama esquemático que muestra el transporte radial y el movimiento longitudinal del ión sodio desde el suelo, a través de la raíz, hasta el xilema de la parte aérea. (Apse y Blumwald, 2007).

1.5.2 Transporte de potasio en plantas.

El potasio, además de ser un nutriente esencial para la planta, es el catión más abundante, constituyendo hasta el 10% del peso seco de la planta. La concentración de potasio en el tejido tiene un alto rango de variabilidad, pero contenidos por debajo de 10g/Kg. de peso seco conduce a síntomas de deficiencia en la mayoría de las especies, que empiezan generalmente con áreas cloróticas entre las venas en las hojas más antiguas que pasan a ser necróticas con la progresión de la deficiencia, y en condiciones aún más severas se produce la muerte de meristemos laterales y terminales (Epstein *et al.*, 2005).

Los síntomas de deficiencia de potasio son la evidencia visible de la ruptura de muchas funciones esenciales que este elemento tiene en importantes procesos

metabólicos como la fotosíntesis, la biosíntesis proteica, la osmoregulación, la turgencia y el mantenimiento del potencial de membrana.

Los compartimentos subcelulares de las plantas pueden variar considerablemente respecto a los niveles de potasio. La concentración citoplasmática está finamente regulada en niveles cercanos a 100 mM (Walker *et al.*, 1996). Sin embargo, las concentraciones vacuolares de potasio son variables reflejando la situación nutricional de potasio. En tiempos de que las necesidades de potasio están cubiertas por la planta, el potasio vacuolar queda retenido, mientras que en condiciones de escasez el potasio vacuolar es movilizado al citoplasma para mantener allí la concentración. En su función osmótica, en la vacuola puede ser reemplazado por sodio citoplasmático.

La alta demanda de potasio de la planta es satisfecha a través de efectivos mecanismos de toma en la raíz y translocación posterior a las partes aéreas de la planta, siendo distribuido dentro de la célula a apropiadas concentraciones en los diferentes compartimentos subcelulares. El transporte de potasio a través de la membrana puede ser mediado por canales de potasio, utilizando el potencial de membrana o por transportadores secundarios. Los genes candidatos identificados en el transporte de potasio en plantas revelan tres principales familias, KT/HAK/KUP, los transportadores TRK/HKT y la familia de antiportadores catión protón denominada CPA (Maser *et al.*, 2001), aparte de los mencionados canales de potasio.

Las proteínas de la familia KT/HAK/KUP se encuentran en procariotas, hongos, y plantas donde median el transporte de potasio probablemente a través del mecanismo de simporte $K^+ : H^+$ (Haro *et al.*, 1999). Aparte de la adquisición de potasio del medio externo, también están involucrados en la expansión celular y posiblemente en la distribución de las auxinas en la raíz (Gierth y Mäser, 2007). Los transportadores HKT fueron inicialmente estudiados respecto a su capacidad para transportar potasio pero últimamente reciben más atención en su faceta de transporte de sodio. Por último los CPAs, originalmente fueron descritos como antiportadores Na^+ / H^+ pero recientemente se ha observado que pueden actuar también transportando potasio.

KT/HAK/KUP

La familia KT/HAK/KUP ha sido identificada en plantas por homología a las permeasas de potasio (KUP) de bacterias (Schleyer y Bakker, 1993) y a los transportadores de potasio de alta afinidad (HAKs) de hongos (Bañuelos *et al.*, 1995).

Los genes KT/HAK/KUP han sido clonados en diferentes especies de plantas tales como cebada (Vallejo *et al.*, 2005), pimiento (Martínez-Cordero *et al.*, 2004), vid

(Davies *et al.*, 2006) y tomate (Nieves-Cordones *et al.*, 2007). *Arabidopsis* tiene 13 genes KT/HAK/KUP y las proteínas HAK según la base de datos de Aramemnon (Schwacke *et al.*, 2003) poseen entre 10 y 14 dominios transmembrana y, exceptuando *OsHAK3* un extremo N-terminal citoplasmático.

Los estudios iniciales por los cuales se determinó la capacidad de transportar potasio fueron complementaciones en *E.coli* o levadura en mutantes afectados en el transporte de potasio. Además los miembros de esta familia han sido englobados en mecanismos de transporte de alta afinidad desde la identificación en cebada de HvHAK1, cuya expresión se incrementó de forma notable en raíces expuestas a medios con bajo potasio (Santa-Maria *et al.*, 1997). Esta regulación también ocurre en *Arabidopsis* con la expresión de *AtKUP3* (Kim *et al.*, 1998).

HKT

Los transportadores HKT de plantas pertenecen a la superfamilia Trk de transportadores catiónicos que están topológicamente relacionados con los canales de potasio (Kato *et al.*, 2001). Ambos están formados por los denominados “bloques MPM” (dos dominios transmembrana separados por 1 poro). Concretamente las proteínas HKT/Trk poseen 4 motivos MPM en un solo polipéptido. Los genes HKT/Trk se encuentran en bacterias, hongos y plantas, pero han sido selectivamente eliminados del mundo animal (Schatman *et al.*, 1994). En plantas existen dos subfamilias, donde la familia I tiene los intrones más extensos. La subfamilia II contiene genes de monocotiledóneas y la I contiene tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas (Platten JD *et al.*, 2006).

El primer gen HKT/Trk de plantas que identificado fue *TaHKT1* de trigo, que transportaba potasio cuando era expresado en oocitos de *Xenopus laevis*. Sin embargo, el ortólogo de *Arabidopsis AtHKT1* sólo transporta sodio en levaduras y en oocitos (Uozumi *et al.*, 2000).

Como describió Doyle *et al.*, 1998 el poro (“P-loop”) de los canales de potasio sirve para atraer al catión al entorno hidrofóbico de la membrana plasmática. La α -helice del poro termina en el motivo (GYG) glicina-tirosina-glicina que está desprovisto de estructura secundaria y es el encargado de unir el ión potasio.

De hecho, el “P-loop” de las proteínas HKT/Trk contiene una glicina altamente conservada. Además se ha demostrado en bacterias que las 4 glicinas de los 4 motivos MPM son fundamentales para el transporte de potasio (Tholema *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos miembros de la subfamilia I tienen una serina en lugar de la esperada

glicina, aunque también es verdad que éstas son más permeables a sodio que a potasio (Maser *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que mutantes de HKT1 de *Arabidopsis* tienen menores niveles de sodio en la raíz pero, mayores en la parte aérea. Consistente con esto, se ha demostrado que las plantas mutante *hkt1* son resistentes a sal a corto plazo, pero hipersensibles a largo plazo (Mäser *et al.*, 2002).

Además AtHKT1 ha sido propuesto como mediador en la recirculación de sodio desde la parte aérea hacia la raíz (Apse y Blumwald, 2007). Se sabe por estudios de inmunolocalización, que HKT1 descarga sodio desde los vasos del xilema hasta las células del parénquima xilemático, allí el sodio difundiría al floema mediante plasmodesmos y recircularía nuevamente a la raíz. Estos estudios concuerdan con el hecho de que la savia del xilema en plantas mutantes *athkt1* tiene mayor contenido en sodio que los controles silvestres (Sunarpi *et al.*, 2005).

CPAs

Los antiportadores catión monovalente/protón se engloban en dos familias CPA1 y CPA2, además se encuentran en plantas, hongos, bacterias y animales (Gierth y Maser, 2007). Como se muestra en la figura 1.13 tanto CPA1 como CPA2 se subdividen en otros grupos que pueden ser específicos de algún reino en particular. Por ejemplo la familia NhaP corresponde a bacterias, NHE-PM a animales y SOS1 a plantas (Brett *et al.*, 2005). Los CPAs trabajan sin que les afecte el diferencial de potencial de membrana (son electroneutros) y su función puede ser tanto la de regular la homeostasis de los cationes monovalentes como la de regular el pH (Davies, 1986).

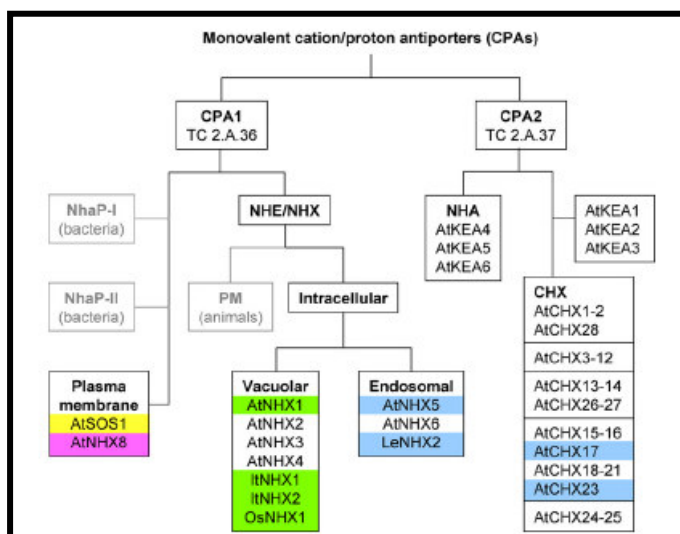


Figura 1.13. Familias y subfamilias de los transportadores CPA. La preferencia de sustrato queda representada por colores (amarillo : sodio, azul : potasio, rosa : litio, verde : sodio y potasio). Subfamilias ausentes en plantas quedan coloreadas en gris (Gierth y Mäser, 2007)

En mutantes *atnhx1* de *Arabidopsis* se observan bajas concentraciones de potasio en las partes aéreas (Apse *et al.*, 1999). En estudios con liposomas se comprobó que AtNHX1 transporta sodio y potasio con la misma afinidad, con una K_m de 42 mM para potasio y 45 mM para sodio (Venema *et al.*, 2002). También esta capacidad dual potasio/protón y sodio/protón es observada para las proteínas vacuolares CPA1 como son ItNHX1 (Ohnishi *et al.*, 2005) y OsNHX1 (Fukuda *et al.*, 2004). La función propuesta para estas CPAs de tonoplasto es la de usar el gradiente de pH para cargar indiscriminadamente potasio y sodio en la vacuola con la finalidad de almacenar (en el caso del potasio), detoxificar (sodio), y generar turgencia (Blumwald y Poole, 1985).

La selectividad catiónica es probablemente mayor para las CPA1 del sistema de endomembranas, cuya función parece ser la regulación del pH endosomal. Los miembros analizados de esta familia muestran una preferencia por potasio más que por sodio. Una explicación puede ser que el exceso de sodio en estos compartimentos celulares podría ser altamente dañino (Venema *et al.*, 2003).

La familia de CPA2 presenta algunos buenos candidatos para el transporte de potasio. AtKEAs se asemeja a los antiportadores potasio/protón bacterianos KefB y KefA, aunque no se han realizado estudios al respecto (Sze *et al.*, 2004).

En la familia CHX de los 28 genes existentes, 18 son específicamente expresados durante la gametogénesis en tejido esporofítico. Esto sugiere que las proteínas CHX están involucradas en la regulación de la homeostasis de potasio en el desarrollo del polen y en la germinación (Sze *et al.*, 2004).

En *Arabidopsis*, en detalle sólo han sido analizadas dos proteínas, AtCHX17 y AtCHX23. AtCHX17 se expresa en raíces con altas concentraciones de sal, bajo pH externo y tratamiento con ABA (Cellier *et al.*, 2004). Los mutantes *atchx17* acumulan menos potasio que los controles y AtCHX17 colocaliza con marcadores de Golgi y complementa al mutante sensible a pH de levadura *kha1*. Estos dos estudios indican su papel fundamental en la homeostasis de potasio y en la regulación de pH. AtCHX23, se encuentra en las membranas cloroplásticas y mutantes de pérdida de función muestran una ultraestructura cloroplástica alterada con una fuerte reducción de clorofila en hojas de plántulas y un elevado pH citosólico en las células oclusivas (Song *et al.*, 2004).

Canales específicos para potasio

Los canales de potasio son proteínas multiméricas. Las subunidades transmembrana denominadas subunidades α , se caracterizan por la presencia de uno o dos dominios P (poro). En proteínas funcionales, 4 dominios P están asociados para

formar parte de la conducción del canal, incluyendo su filtro de selectividad. El motivo GYGD/E está presente en todos los dominios P de los canales de potasio altamente selectivos para potasio (Lebaudy *et al.*, 2007).

En plantas se encuentran 3 familias de subunidad α que forman parte de los canales selectivos de potasio y son denominados Shaker, TPK y Kir-like (Véry y Sentenac, 2003) (figura 1.14). Los tres tipos existen en células animales.

El primer Shaker fue clonado en *Drosophila*. En plantas también fue el primer canal de potasio identificado a nivel molecular. Esto ocurrió en 1992, con el clonaje de dos “Shakers” de entrada de K^+ de *Arabidopsis* por complementación de cepas mutantes de levadura defectivas en toma de potasio (Sentenac *et al.*, 1992). Los canales TPK “Tandem-Pore K^+ Channels” son los equivalentes a los canales de animales TWIN/TREK, y contienen dos dominios P en tándem. El primer miembro TPK de plantas fue identificado en 1997 (Czempinski *et al.*, 1997). Los canales de plantas Kir-like están relacionados con los canales de entrada de potasio Kir. El primer canal Kir identificado en *Arabidopsis* se llevó a cabo tras la búsqueda en bases de datos de secuencias relacionadas con TPK1 (Czempinski *et al.*, 1999). La topología de los tres tipos de subunidades α está representada en la figura 1.14. Las subunidades α del Shaker tienen seis segmentos transmembranas (TMS) y un dominio P, presente entre el quinto y el sexto TMS. Las subunidades TPK tienen 4 segmentos TMS y dos dominio P en tándem. Las subunidades Kir-like poseen dos dominio TMS y un dominio P. Un canal funcional debe estar constituido por 2 (TPK) o 4 (Shaker o Kir-like) subunidades α , ya que 4 dominios P son los necesarios para la formación del poro. Debido a la estructura multimérica de las proteínas funcionales se pueden formar canales heteroméricos, al asociarse subunidades α codificadas por diferentes genes. Probablemente este proceso es propiciado para incrementar la diversidad en canales funcionales, aunque esto sólo se conoce en la familia tipo Shaker (Dreyer *et al.*, 1997). Tampoco se conocen asociaciones entre las diferentes familias antes mencionadas.

En principio todos los genes Shaker y un miembro de la familia de TPK, denominado *TPK4*, codifican canales activos en la membrana plasmática. En cambio, los canales Kir-like y los TPK, menos *TPK4*, son activos en el tonoplasto. Estos resultados han sido corroborados en experimentos con fusiones con la proteína verde fluorescente (“GFP”) (Heibert *et al.*, 1995). La naturaleza molecular de canales de potasio activos en otros sistemas de membranas permanece hasta ahora por determinar.

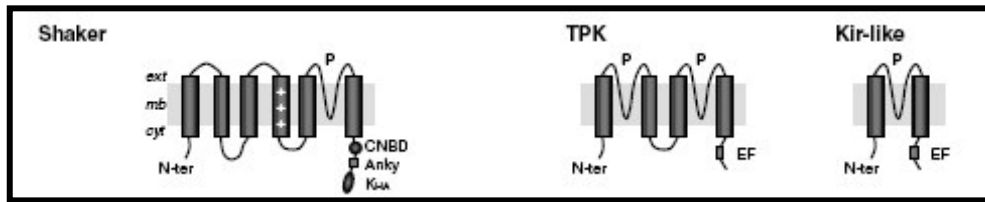


Figura 1.14. Diagrama esquemático de los tipos de subunidades α de los canales de potasio. (Lebaudy et al., 2007).

1.6 Dianas de toxicidad conocidas del litio.

En este apartado presentamos las principales dianas de toxicidad del litio en plantas, ya que uno de los objetivos principales de la tesis fue dilucidar los mecanismos moleculares que hacen posible que un mutante con un aumento en la concentración celular de peróxido de hidrógeno resulte tolerante a una sal como el cloruro de litio.

Familia de fosfatasas sensibles a litio

Estas enzimas participan en rutas metabólicas muy diversas como la señalización por inositoles, la gluconeogénesis o la asimilación de sulfato. A pesar de tener sustratos muy diferentes, comparten ciertas características: su catálisis siempre requiere de un metal divalente que actúa como cofactor (generalmente Mg^{++} o Mn^{++}), y todas ellas son inhibidas por litio.

Se ha comprobado que los enzimas pertenecientes a esta familia poseen un núcleo estructural común que incluye los residuos esenciales para la unión de metales (York *et al.*, 1995). Esto concuerda con el mecanismo de inhibición anticompétitiva por litio, propuesto para estos enzimas. Según este modelo, el catión se une al complejo enzima-producto (E-P), desplazando al metal empleado como cofactor y evitando así la acción de la enzima (Harwood., 2005).

En esta superfamilia se incluyen los siguientes enzimas: inositol monofosfatasas (IMPasa), inositol polifosfato 1-fosfatasas (IPPasa), fructosa-1,6-bifosfato 1-fosfatasa (FBPasa), y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatasas (PAPasa).

Inositol monofosfatasas (IMPasas) e inositol polifosfatasas (IPPasas)

Las IMPasas catalizan la eliminación de un grupo fosfato de los inositol monofosfatos, para formar inositol. Las IPPasa pueden emplear como sustratos al inositol 1,3,4-trifosfato y al inositol 1,4-bifosfato, productos de la degradación del

inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Ambos enzimas emplean preferentemente Mg^{++} como cofactor y son inhibidas por litio.

En *Arabidopsis* se han identificado las enzimas sensibles a litio SAL1 y SAL2 que poseen una doble actividad, ya que pueden actuar como IPPasas y también como PAPasas (Xiong *et al.*, 2001).

En plantas el inositol no sólo es necesario como precursor de los fosfatidilinositoles involucrados en la señalización por inositoles y por calcio, sino que tiene otras muchas funciones, ya que sirve como precursor de moléculas muy variadas. El inositol forma conjugados con el ácido indolacético, por lo que resulta un medio para transportar y almacenar auxinas en la célula. También puede formar ácido fítico que sirve como almacén de fósforo. Por otra parte, se ha asociado con la respuesta a estrés, ya que su acumulación provoca un incremento en la tolerancia a salinidad (Xiong *et al.*, 2004). Por último también es un intermediario en la síntesis de los osmolitos rafinosa, estaquiosa y verbascosa.

Fructosa 1,6-bifosfato 1-fosfatasa (FBPasas)

Otra enzima de los pertenecientes a la familia de fosfatasa es la fructosa 1,6-bifosfato 1-fosfatasa, enzima que elimina el 1-fosfato de la fructosa 1,6-bifosfato para formar fructosa 6-fosfato. La FBPasa emplea preferentemente el Mg^{++} o el Mn^{++} como cofactor.

En las hojas de plantas superiores existen dos tipos de FBPasas necesarias para el correcto funcionamiento de la fotosíntesis (Raines *et al.*, 1988). La obtención de hidratos de carbono en las plantas se inicia con la fijación de CO_2 en el ciclo de Calvin. En este proceso, que tiene lugar en el cloroplasto, se generan triosas fosfato, que pueden almacenarse en el estroma en forma de almidón, o ser exportadas al citoplasma para emplearse en la biosíntesis de sacarosa. Una de las formas de FBPasas existente en plantas se encuentra en el cloroplasto y es necesaria para la regeneración de la ribulosa 1,5-bifosfato del ciclo de Calvin. La otra forma, localizada en el citoplasma, está involucrada en la formación de sacarosa a partir de las triosas fosfato exportadas del cloroplasto. Recientemente se ha caracterizado la FBPasa del citoplasma de manzana, la cual es inhibida por litio (Zhou *et al.*, 2004).

3'-fosfoadenosin 5'-fosfatasa (PAPasas)

Las PAPasas son enzimas dependientes de magnesio que hidrolizan específicamente el 3'fosfato del 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato (PAP), para formar adenosina 5'-monofosfato (AMP) y fosfato inorgánico.

El PAPS (3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato) en *Arabidopsis* actúa como donante de sulfato en las reacciones de sulfatación, catalizadas por sulfotransferasas, en las que se produce nuevamente PAP como producto secundario. Como la inhibición por PAP es un fenómeno general para los enzimas que utilizan PAPS como sustrato, las PAP fosfatasas actúan de forma coordinada con las sulfotransferasas, para evitar la inhibición por producto de las reacciones de transferencia de sulfato. En presencia de litio, la inhibición de las PAPasas provocaría un aumento en la concentración de PAP que afectaría negativamente a la acción de las sulfotransferasas, que se inhiben fuertemente por este producto (Varin *et al.*, 1997).

Fosfoglucomutasas

Las fosfoglucomutasas son enzimas que catalizan la conversión reversible de glucosa 1-fosfato en glucosa 6-fosfato. Estas enzimas se encuentran tanto en levadura como en plantas o animales. Se ha comprobado que tanto la fosfoglucomutasa de levaduras como la de animales, son inhibidas por litio, que desplaza competitivamente al magnesio de su sitio de unión al enzima (Masuda *et al.*, 2001). Sin embargo no hay evidencias que comprueben este hecho en plantas.

Glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3)

Las glucógeno sintasas quinasa-3 son serina/treonina proteína quinasas que se encuentran muy conservadas en eucariotas. En diversas especies vegetales se han caracterizado genes similares a GSK3 formando parte de pequeñas familias multigénicas. En el caso de *Arabidopsis* existen 10 genes similares a GSK3, que parecen tener funciones en el desarrollo de la planta y en la respuesta a estreses abióticos como oscuridad, herida, salinidad o estrés osmótico (Charrier *et al.*, 2002). A pesar de que se conoce, pues, la existencia de estos enzimas en plantas, no existen evidencias de que sean inhibidos por litio, como ocurre en el caso de animales.

Procesamiento del RNA y síntesis de proteínas

En las células eucariotas, previamente al inicio de la traducción, el pre-mRNA debe sufrir ciertas modificaciones para formar el mRNA maduro que será traducido. Algunos de los componentes involucrados en este procesamiento como las proteínas SR y el factor U1A han sido identificados como posibles dianas celulares del litio tanto en levadura como en plantas (Forment *et al.*, 2002).

En cuanto a la traducción, se ha comprobado la importancia del factor de iniciación eIF1A como determinante de la tolerancia a sal en levadura y plantas. Su sobreexpresión en levadura aumenta también la tolerancia a litio (Rausell *et al.*, 2003).

Esto indica que tanto el sodio como el litio interferirían en el inicio de la traducción, reduciéndose así la síntesis de proteínas.

1.7 Etileno. Una hormona gaseosa.

En 1886 en San Petersburgo, el joven estudiante Dimitry Nikolayevich Neljubow se percató que plántulas etioladas de guisante crecían horizontalmente en el laboratorio y en cambio fuera del laboratorio lo hacían de forma vertical. Después de un extenso estudio en el que se excluyó la luz y temperatura, se llegó a la conclusión que la causa de este anormal crecimiento era un gas utilizado en la iluminación, el **etileno**.

Muchos de los efectos del etileno que afectan al crecimiento y desarrollo de la planta, incluyendo germinación, crecimiento de raíz y parte aérea, desarrollo floral, senescencia y abscisión de flores y hojas, y maduración del fruto fueron descubiertos antes de 1940. Trabajos más actuales han revelado que el etileno también participa en la modulación de respuesta de las plantas a diversos estreses abióticos y bióticos.

Muchos investigadores de la década de los 30 consideraron al etileno como un producto residual sin relevancia de la hormona más importante del momento, la auxina. Debido a esta falsa creencia, los estudios con etileno fueron prácticamente inexistentes hasta 25 años después y estos se centraron en otras hormonas como las auxinas, giberelinas y citoquininas. Aparte, existían muchas dificultades técnicas en la medición. Los procedimientos utilizados eran pesados y poco sensibles para las concentraciones fisiológicas. Por ejemplo se usaban métodos manométricos o bioensayos basados en la epinastia de hojas.

Todo esto cambió en los años 60 con la aparición del cromatógrafo de gases que bajó el límite de detección del etileno en un factor de 10^6 . Este mayor desarrollo permitió rápidos avances en el campo de la investigación del etileno, siendo entonces considerado como un importante regulador endógeno del crecimiento, producido por casi todas las plantas superiores (Crozier *et al.*, 2000).

1.7.1 Biosíntesis del etileno.

La S-AdoMet (S-adenosilmetionina) es el precursor de la biosíntesis de etileno. La metionina es fundamental para la síntesis de proteínas, pero cerca del 80% es convertida a S-AdoMet mediante la S-AdoMet sintetasa (SAM sintetasa, EC 2.5.1.6) hidrolizando ATP. S-AdoMet es una de los principales donantes de grupos metilos en plantas y usado como sustrato en muchas rutas bioquímicas, como en la síntesis de

poliaminas o de etileno (Ravanel *et al.*, 1998). Además, la S-AdoMet está involucrada en reacciones de metilación que modifican lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

El primer paso en la síntesis de etileno es la conversión de S-AdoMet a ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) mediante la ACC sintasa (ACS, EC 4.4.14). En esta reacción, además de ACC, la ACS también produce 5'-metiltioadenosina (MTA), que es convertida a metionina a través de un ciclo modificado de la metionina (Bleecker y Kende, 2000). Esta ruta rescata el grupo metilo para la siguiente ronda de producción de etileno. De esta forma el etileno puede ser sintetizado de manera continua sin la necesidad de un aumento de la demanda de metionina, y al mismo tiempo, el grupo sulfuro de la metionina queda conservado.

Finalmente, el ACC es oxidado por la ACC oxidasa para formar etileno, CO₂ y cianuro. Este último detoxificado a β-cianoalanina por la β-cianoalanina sintasa (β-CAS, EC 4.4.1.9). Esta ruta se representa en la figura 1.15.

El paso limitante de la síntesis de etileno es la conversión de S-AdoMet a ACC mediante la ACC sintasa (Kende, 1993). La expresión de los genes de la ACS está regulada por una gran variedad de señales. Además la forma activa de esta enzima es muy lábil y se presenta a niveles muy bajos sugiriendo que la biosíntesis de etileno está finamente controlada por la planta.

1.7.2 Regulación de las ACC sintasas.

Debido a su papel central en la biosíntesis de etileno, la regulación de las ACC sintasas han sido objeto de un estudio intenso. Desde el clonaje de la ACS de calabacín, muchos genes de ACS han sido identificados y clonados de diferentes especies de plantas, incluyendo tomate, calabaza, pera, *Arabidopsis*... (Ge *et al.*, 2000) El mayor enigma en este momento es dilucidar si las distintas isoformas de ACS están diferencialmente reguladas.

En *Arabidopsis*, han sido caracterizadas 7 genes de ACS (Samach *et al.*, 2000). *ACS2* está inducida por cicloheximida, herida y tratamiento con etileno (Liang *et al.*, 1996). *ACS4* está inducida en plántulas por cicloheximida, ácido indolacético y herida (Abel *et al.*, 1995). *ACS5* está inducida por cloruro de litio y por una concentración baja de citoquininas en plántulas etioladas (Vogel *et al.*, 1998). *ACS6* es específicamente inducida por tratamiento con cianuro, exposición a ozono, cicloheximida, ácido indolacético y etileno (Overmyer *et al.*, 2000). *ACS10* ha sido identificada como una de

las dianas de *CONSTANS*, que promueve la floración de *Arabidopsis* en respuesta a la luz (Samach *et al.*, 2000).

La posible explicación de que la cicloheximida induzca la mayoría de las isoformas de las ACS es que los transcritos de las ACS fueran reguladas negativamente por algún represor sensible a cicloheximida, o que la misma cicloheximida retuviera a los mensajeros de las ACS en los ribosomas, incrementando de esa manera su nivel relativo.

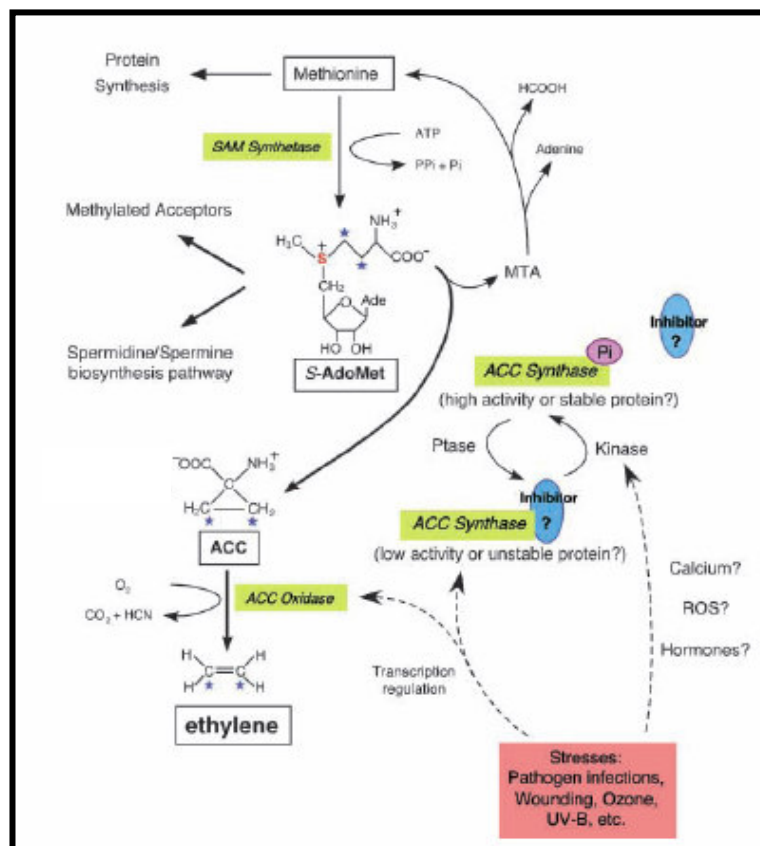


Figura1.15. Ruta de biosíntesis de etileno y su regulación. (Kevin *et al.*, 2002).

1.7.3 Etileno. Señalización.

Ruta de transducción de la señal del etileno.

El etileno regula muchos procesos celulares y de desarrollo tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas a través de rutas de señalización conservadas (Chen *et al.*, 2005). El modelo actual aceptado para *Arabidopsis thaliana* se presenta en la figura 1.16.

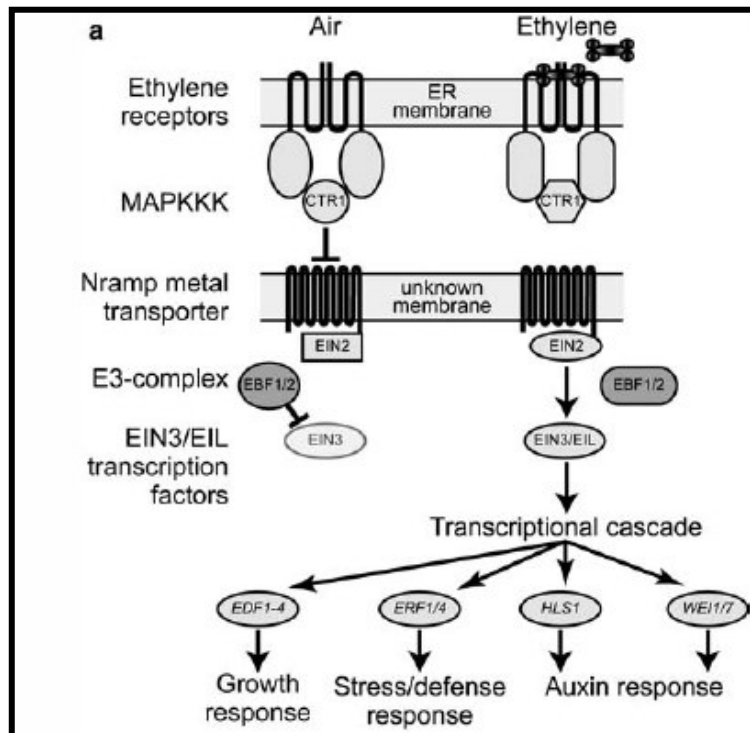


Figura 1.16. Transducción de la señal de etileno (Etheridge *et al.*, 2006).

El etileno es percibido por una familia de receptores relacionados con las histidina kinasas de bacterias (sistemas de dos componentes) (O'Malley *et al.*, 2005). Estos receptores modulan la actividad de la quinasa “Raf-like” CTR1, un regulador negativo de la ruta. Funcionando por debajo de CTR1 se encuentra EIN2, una proteína con similitudes a una “Nramp metal-ion transporter”, y por debajo de estas aparece una familia de factores de transcripción denominados EIN3/EIN3-like (EIL) que actúan modulando la expresión de distintos genes.

Se han propuesto otros componentes que participan en la ruta de señalización, pero sus funciones aún no han sido aclaradas. Debido a las similitudes que presenta CTR1 a las MAPKKK, se ha propuesto una cascada de MAPK que actuarían por debajo de CTR1. En 2003, se implicó una MAPK putativa en la ruta de señalización (Ouaked *et al.*, 2003), pero posteriores estudios indican que la principal función de la MAPK en

cuestión (MAPK6) es la regulación de la biosíntesis y no de la señalización (Ecker 2004). Por otra parte, ya que, los receptores de etileno han sido relacionados con histidina kinasas, se han hechos otros estudios intentando involucrar otros elementos que participan en la señalización de sistemas de dos componentes. Por ejemplo se ha propuesto al modulador de respuesta ARR2 como transductor de la señal de etileno en una ruta independiente de CTR1 (Hass *et al.*, 2004). Sin embargo, posteriores estudios sugieren que ARR2 posee una función más importante en la señalización de citoquininas que en la propuesta para el etileno (Mason *et al.*, 2005).

Señalización mediante receptores de etileno.

El etileno es percibido por una familia de receptores de alta afinidad representados por ETR1. El gen ETR1 codifica una proteína que contiene un dominio N-terminal hidrofóbico que une etileno y un dominio C-terminal que está relacionado con las histidina kinasas (sistemas de dos componentes) encontradas en bacterias. El modelo presenta al ión Cu(I) en coordinación con las α -hélices que surcan la membrana del dominio hidrofóbico como responsable de la unión con el etileno. La unión del etileno produce un cambio conformacional del dominio sensor que es transmitido al dominio citoplasmático transmisor de la proteína (Bleecker *et al.*, 1998) (figura 1.17).

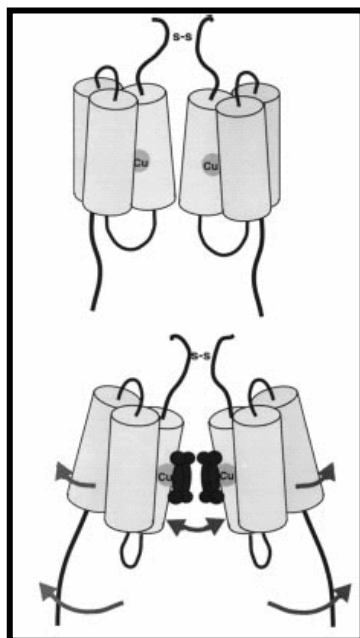


Figura 1.17. Mecanismo propuesto por el cual se une el etileno al cofactor Cu(I), induciendo un cambio conformacional en ETR1

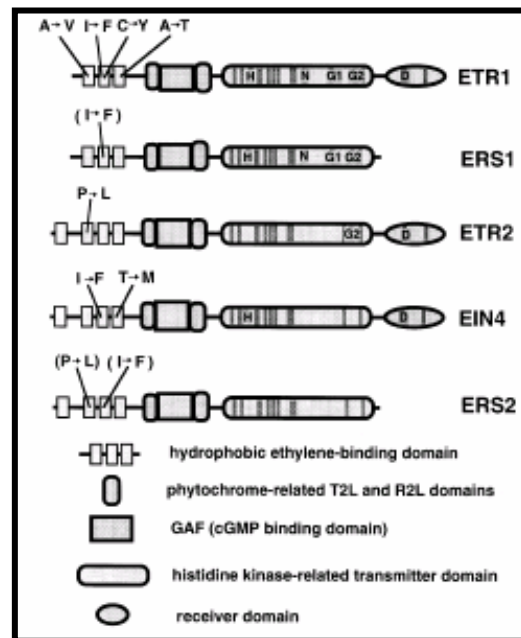


Figura 1.18. Características estructurales de la familia génica ETR1-like (Bleecker *et al.*, 1998).

Recientemente, CTR1 ha sido localizado en el retículo endoplásmico de *Arabidopsis* interaccionando directamente con los receptores de etileno. Existen evidencias directas que CTR1 se asocia con los receptores de etileno por estudios de co-purificación del receptor ETR1 con una versión marcada de CTR1 a partir de un extracto de membrana (Gao *et al.*, 2003). Este resultado confirma la existencia de complejos de receptores de señalización denominados “señalosomas”, que facilitarían la transferencia de información desde los receptores hasta componentes por debajo de ellos.

Análisis filogenéticos y de secuencia dividen los receptores de etileno en dos subfamilias (figura 1.18). Los miembros de la subfamilia I (ETR1 y ERS1) tienen actividad histidina kinasa, pero no los de la subfamilia II que en cambio poseen potencialmente actividad serina kinasa. Por otra parte algunos miembros poseen el dominio receptor C-terminal (ETR1, ETR2 y EIN4), mientras que los otros no lo poseen (Moussatge y Klee, 2004). El papel preciso que juegan la histidina kinasa y el dominio receptor en la señalización del etileno permanece sin resolver, aunque se conoce que la histidina kinasa es esencial para la señal de salida de etileno y su actividad enzimática juega un papel importante en la modulación de la señal, y el dominio receptor no es esencial para la señal de salida de etileno pero sí está involucrado en la modulación de la señal.

1.7.4 Regulación transcripcional mediante etileno.

La familia de factores de transcripción EIN3/EIL regula la expresión de diferentes genes, incluyendo la de otros factores de transcripción como ERF1, indicando que la respuesta a etileno conlleva una cascada transcripcional. Gracias a análisis con micromatrices ahora se conoce que un 3-7% de los genes están regulados por etileno (Alonso *et al.*, 2003). Analizando diferentes resultados se llega a la conclusión de que se trata de una respuesta compleja, por ejemplo existen diferencias significativas entre genes regulados a tiempos cortos (10 minutos) y genes regulados a tiempos intermedios (6h) (De Paepe *et al.*, 2004). También existen diferencias entre plantas tratadas con etileno durante 24 h y los mutantes de respuesta constitutiva a etileno *ctr1-1* (Van Zhong y Burns, 2003). Dependiendo del tiempo de exposición, de la dosis, del tipo de tejido y del estadio de desarrollo de la planta la respuesta transcripcional a etileno puede variar de forma considerable.

1.7.5 Regulación postraduccional de la señalización por etileno.

El punto de control más importante en la transducción de la señal del etileno es el factor de transcripción EIN3. En ausencia de etileno, la proteína EIN3 está continuamente degradándose. La degradación de EIN3 es mediada por dos proteínas F-box (EBF1 y EBF2) que reconocen a EIN3 y lo reclutan a un complejo E3 para su ubiquitinización. La activación de la señal de etileno, hace que EIN3 no se degrade y se acumule, actuando sobre sus dianas (Gagne *et al.*, 2004).

1.8 Ácido abscísico. Hormona del estrés abiótico.

El ácido abscísico (ABA) regula muchos aspectos agronómicamente importantes del desarrollo de la planta, incluyendo la síntesis de proteínas y lípidos de almacenamiento en semilla, la tolerancia a la desecación de la semilla y su dormancia, y la inhibición de las transiciones entre la fases de embrión y la de germinación, así como entre la vegetativa y la reproductiva (Leung y Giradaut, 1998). Además, el ABA media algunos aspectos de respuesta fisiológica a estreses ambientales tales como el cierre de estomas debido a estrés osmótico, la tolerancia a sal, hipoxia, estrés por frío y respuesta a herida y a patógenos.

1.8.1 Percepción del ABA

El lugar de percepción del ABA y particularmente la cuestión de si ésta se percibe intracelular o extracelularmente ha sido objeto de numerosos estudios durante muchos años. Hasta fechas recientes, no se tuvo conocimiento de ningún receptor, aunque los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la percepción se produce de ambas maneras y además contando con los últimos datos parece que podrían existir múltiples receptores para esta hormona. Una evidencia a favor de que existen diferentes receptores, es que utilizando diferentes análogos de ABA se obtienen diferentes respuestas (Huang *et al.*, 2007). La identificación de un receptor de ABA ha sido una tarea bastante complicada que ha producido un cierto estancamiento durante muchos años, aunque roto recientemente por 3 estudios que describen 3 proteínas que unen ABA y con características potenciales para considerarlas como receptores.

Las 2 primeras proteínas publicadas son “Flowering Time Control Locus A” (FCA) y “Magnesium Protoporphyrin-IX Chelatase H subunit” (CHLH) que trabajan uniendo ABA intracelularmente. Ambas proteínas funcionan inesperadamente como receptores de ABA.

FCA fue previamente caracterizada como una proteína nuclear de unión a RNA que interacciona con otra proteína reguladora de la floración, FY, bloqueando la expresión de FLC “flowerin locus C”, un factor de transcripción “MADS box”, y permitiendo la floración. En otro estudio se determinó que el ABA se une al extremo C-terminal de FCA interrumpiendo el complejo FCA-FY, permitiendo que los mensajeros de FLC se acumulen y retrasando por tanto, la floración. Lo realmente sorprendente del asunto es que otras respuestas a ABA como el cierre de estomas y la germinación quedaron inalteradas, indicando que FCA es un regulador específico de la floración y de la formación de raíces laterales (Razem *et al.*, 2006).

Otra proteína igualmente inesperada y de publicación casi simultánea a FCA es la proteína cloroplástica CHLH que también muestra actividad específica de unión a ABA. Las plantas con una expresión reducida de CHLH presentaron fenotipos de insensibilidad a ABA en germinación y en cierre de estomas, mientras que plantas que sobreexpresan CHLH resultaron hipersensibles a ABA en estas respuestas. Sin embargo, el mecanismo por el cual CHLH transmite la señal, así como el significado de su localización en el cloroplasto permanecen sin describir (Shen *et al.*, 2006).

La tercera proteína caracterizada pertenece un grupo de moléculas de señalización bien conocidas, las proteínas G acopladas a un receptor (GCRs). En el modelo clásico de señalización por proteínas G, un ligando se une a la parte extracelular de las GCR produciendo la disociación del complejo $G\alpha/G\beta/G\gamma$ e hidrolizando GTP. Esta disociación activa la transducción de la señal por diferentes mecanismos. La proteína en cuestión que se une a ABA es denominada como GCR2 y causa la disociación de GPA1, la única $G\alpha$ de Arabidopsis, como se esperaría en un modelo clásico de señalización por proteínas G. Tanto la sobreexpresión como la pérdida de función de GCR2 produce una alteración de distintos fenotipos dependientes de ABA. Aunque se conoce que GCR2 se encuentra en la membrana plasmática, no está claro si la percepción del ABA se realiza intracelular o extracelularmente (Liu *et al.*, 2007) (figura 1.19).

Tras estos tres recientes hallazgos en la percepción del ABA, la cuestión que se plantea es si podría existir más receptores de ABA aún sin caracterizar. La respuesta parecer ser que sí, ya que numerosos estudios han identificado distintas actividades de unión a ABA en extractos de plantas, y parece improbable que se deban exclusivamente a estas proteínas caracterizadas hasta la fecha.

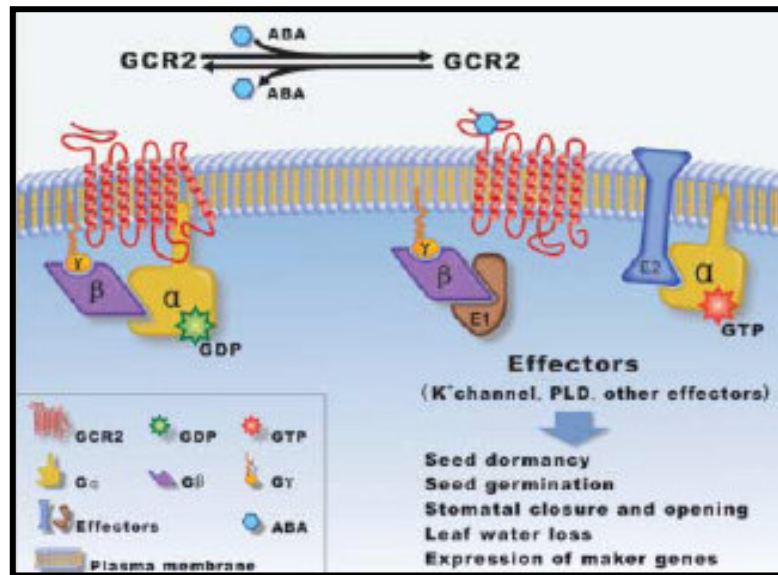


Figura 1.19. Modelo esquemático de la ruta de señalización de ABA mediada por GCR2 (Liu *et al.*, 2007). PLD: fosfolipasa D.

1.8.2 Regulación del ABA mediante metabolismo, conjugación y transporte.

Para que los receptores de ABA funcionen, debe existir primero una acumulación de ABA biológicamente activo en el sitio de percepción. Aunque la síntesis de ABA es necesaria, no está claro que sea el factor más importante en su acumulación bajo situaciones de estrés, ya que una sobreexpresión de una de las principales enzimas implicadas en la biosíntesis, la 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED3), afecta poco o nada en el contenido de ABA en condiciones de estrés. Además, se ha observado que la aplicación exógena de ABA es rápidamente catabolizada (Priest *et al.*, 2006). Es por ello, que se establece como factores determinantes en la acumulación de ABA la síntesis y el catabolismo de esta hormona, sin embargo la importancia relativa de estos dos procesos en la acumulación de ABA por estrés es incierta.

Para el ABA, y para las demás hormonas, existe otro factor importante, la conjugación. El ABA puede ser conjugado a glucosa (además de otros azúcares) para formar ésteres ABA-glucosa que es biológicamente inactivo (Cutler y Krochko, 1999). Sin embargo el significado del ABA conjugado y si se trata de un proceso reversible o de una inactivación permanente que elimina ABA biológicamente activo ha sido objeto de numerosos estudios. Recientemente la situación ha cambiado ya que se ha identificado en *Arabidopsis* la β -glucosidasa1 (AtBG1).

AtBG1 fue primeramente identificada como un gen sobrepresado en condiciones de estrés salino, y su caracterización molecular posterior reveló que AtBG1 puede hidrolizar los ésteres ABA-glucosa. Además se sabe que los mutantes *atbg1* presentan fenotipos asociados a la deficiencia de ABA y las semillas poseen una menor cantidad de la hormona. Otro interesante hallazgo es que ATBG1 es una proteína localizada en el retículo endoplásmico, mientras que ABA-glucosa se encuentra en la vacuola y en el espacio intercelular. Es por ello que se ha propuesto un sistema de transporte del ABA-glucosa, pero todavía no ha sido identificado (Lee *et al.*, 2006).

También es importante la cuestión del transporte de la hormona a nivel de planta entera. Se ha propuesto en este caso el modelo “root to shoot”, es decir, el ABA o el ABA-glucosa es sintetizado en la raíz y posteriormente es liberado en su forma libre para que actúe en las hojas (Dietz *et al.*, 2000). El ABA-glucosa ha sido encontrado en la sabia del xilema tanto de plantas estresadas como no estresadas y actividad glucosidasa capaz de hidrolizar el ABA-glucosa ha sido observada en hojas. Sorprendentemente no se han encontrado diferencias en la actividad de hidrolizar ABA-glucosa extracelularmente entre mutantes nulos y de sobreexpresión de ATBG1 (Lee *et al.*, 2006). Con lo que se llega a la conclusión que la enzima capaz de hidrolizar ABA-glucosa extracelular debe llevarse a cabo a través de otra enzima diferente. Con la identificación de esta enzima se podría determinar la importancia del ABA-glucosa extracelular.

1.8.3 ABA: un modelo.

El ABA es producido en el citoplasma, a partir de un precursor que es sintetizado en plastos. El ABA es inactivado como conjugado ABA-glucosa y se vuelve a activar mediante la actividad de una glucosidasa. La señal de ABA es recibida por al menos 3 receptores de ABA: GCR2, ABAR/CHLH y FCA. GCR2, es una proteína G acoplada a receptor que está localizada en la membrana plasmática, aunque el lugar de percepción aún no ha sido confirmado. Hipotéticamente GCR2 transduce la señal a través de GPA1, subunidad α del complejo de proteínas G. En la ruta de señalización por ABA, los segundos mensajeros, las proteínas kinasas, las proteínas fosfatasas y los factores de transcripción forman una compleja red de trabajo. Además aparecen elementos comunes con otras rutas de señalización incrementando aún si cabe la complejidad. En la figura 1.20 se muestran las posibles conexiones entre los distintos componentes. Las líneas rojas y negras indican interacciones demostradas e hipotéticas

experimentos genéticos, entre los que destacó su pequeño tamaño, ciclo vital corto (8 semanas), facilidad de cruce, elevada producción de semilla (más de 10.000 semillas por planta), número pequeño de cromosomas (5 cromosomas) y facilidad para su mutagénesis (Meyerowitz, 1989).

La era moderna para la investigación con *Arabidopsis* empezó en 1987 con la apertura de la tercera conferencia internacional sobre *Arabidopsis* en la Universidad de Michigan. Los principales objetivos fueron la saturación del genoma con mutaciones, identificando cada uno de los genes y la secuenciación completa de su genoma a la cual se llegó con éxito en el año 2000. Con estas aproximaciones se llegó a la conclusión de otras ventajas de este sistema modelo como son su pequeño genoma 125Mb, un bajo porcentaje de secuencias repetitivas de DNA (10-15%), disponibilidad de técnicas de mapeo estandarizadas y un eficiente sistema de transformación. En la actualidad existen colecciones de líneas mutantes por inserción de T-DNA, que se encuentran disponibles en centros como el *European Arabidopsis Stock Center* (NASC). Sin embargo la principal limitación de *Arabidopsis* es la ausencia de un sistema eficiente de recombinación homóloga (Meinke *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis es el estudio de los efectos en el sistema modelo *Arabidopsis thaliana* de un aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno celular. Para ello se aisló un mutante de inserción T-DNA en el gen 2 de la catalasa (*CAT2*).

Objetivos iniciales

- Aislamiento de líneas mutantes de inserción de T-DNA de *Arabidopsis thaliana* en el gen *CAT2*.
- Caracterización morfológica del mutante *cat2-1* en condiciones sin estrés.
- Caracterización bioquímica del mutante *cat2-1*. Comprobación de actividad catalasa y producción de peróxido de hidrógeno.
- Caracterización fenotípica del mutante *cat2-1* tras crecimiento en diferentes condiciones de estrés oxidativo.
- Caracterización iónica del mutante *cat2-1*.
- Estudio de la sensibilidad del mutante *cat2-1* a ABA.
- Generación de líneas de sobreexpresión de la *CAT2* en *Arabidopsis thaliana* y posterior caracterización fenotípica.
- Análisis transcriptómico del mutante *cat2-1*.

Tras la comprobación de la inesperada tolerancia del mutante *cat2-1* a cloruro de litio se plantearon los siguientes **objetivos adicionales**:

- Comprobación de la sensibilidad del mutante *cat2-1* a etileno.
- Medida de la producción de etileno del mutante *cat2-1*.
- Estudio de la toxicidad del litio mediada por etileno.

MATERIALES y MÉTODOS

3.1 Material biológico.

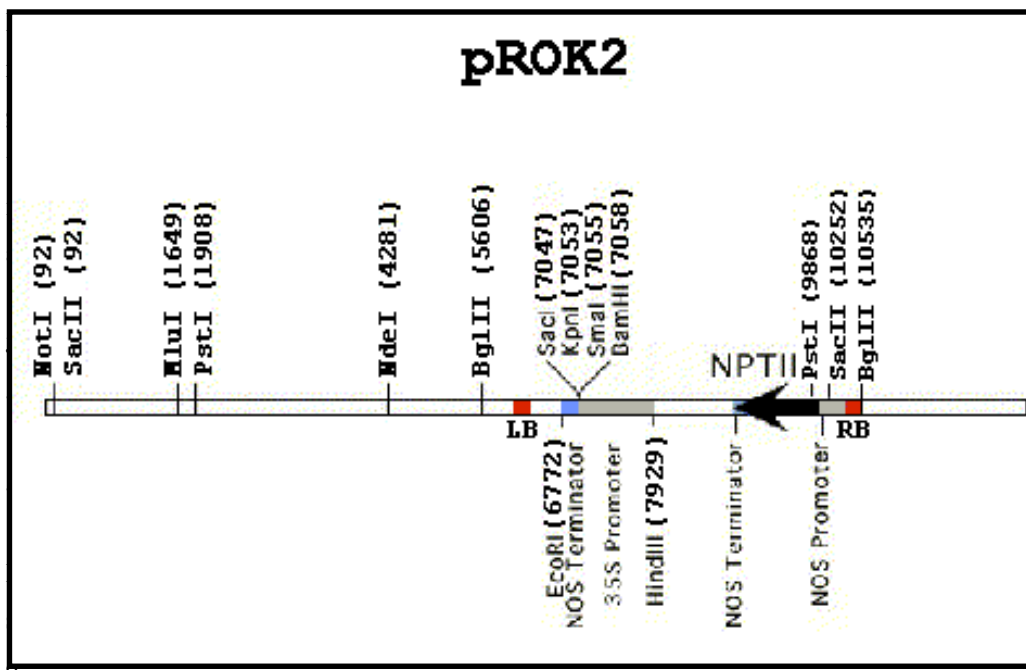
3.1.1 *Arabidopsis thaliana*.

Para la realización del siguiente trabajo se utilizó la línea N576998 del “European *Arabidopsis* stock center” localizado en Nottingham (NASC) que corresponde a la inserción SALK 076998. Como se aprecia en la figura 4.1. (página 86) ésta posee una inserción de T-DNA en el cuarto exón del gen *CAT2* de *Arabidopsis* (locus At4g35090). Como genotipo control se utiliza el ecotipo Columbia 0 de *Arabidopsis*.

Esta línea ha sido generada por J. Ecker (Salk Institute, La Jolla, California), utilizando como T-DNA el del plásmido pROK2 (figura 3.1). Se trata de una línea T3 segregante generada por infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*.

Las principales características del vector pROK2 usado en la transformación son:

- Se trata de un plásmido derivado del pBIN19.
- Posee un borde izquierdo y derecho los cuales delimitan la zona que se va a insertar en el genoma de *Arabidopsis*.
- Posee el gen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina, con el promotor y el terminador NOS.



uma del vector pROK2 empleado en la generación de las líneas mutantes de T-DNA.

Otros mutantes utilizados en este trabajo fueron:

etr1-1: Alelo mutante del locus At1g66340, suministrado por el NASC con el número N237. Se encuentra en el fondo Columbia y fue obtenido por mutación con etilmetano sulfonato.

ein3-3: Alelo mutante del locus At3g20770, suministrado por Roberto Solano (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

3.1.2 *Escherichia coli*.

Se utiliza la cepa **DH5 α** : *F' Φ 80d/lacZAM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 end A1 hsdR17 (r_k^- , m_k^+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1*.

3.1.3 *Agrobacterium tumefaciens*.

Se utiliza la cepa C58C1 que contiene el plásmido desarmado pGV2260 (Amp^r).

3.1.4 Vectores de clonación y transformación.

pBluescriptSK(-): (Stratagene) Plásmido multicopia empleado como vector convencional de clonación. Posee un sitio de clonación múltiple (MCS), el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y el fragmento *lacZ α* para confirmar la presencia del inserto en el sitio de clonación.

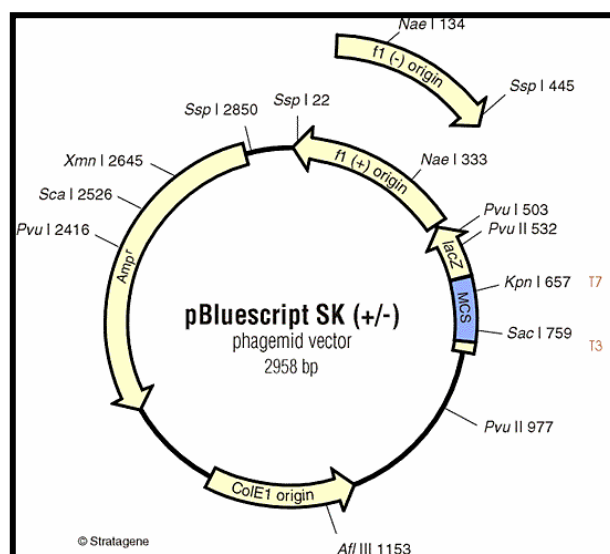


Figura 3.2. Esquema del plásmido pBluescript SK (-)

pCAMBIA 1300: Plásmido binario utilizado en la transformación de *Arabidopsis*. En la región comprendida entre las zonas LB y RB (T-DNA) contiene un sitio de clonación múltiple (MCS) derivado del plásmido pUC18 y el gen HPTII que da resistencia a higromicina.

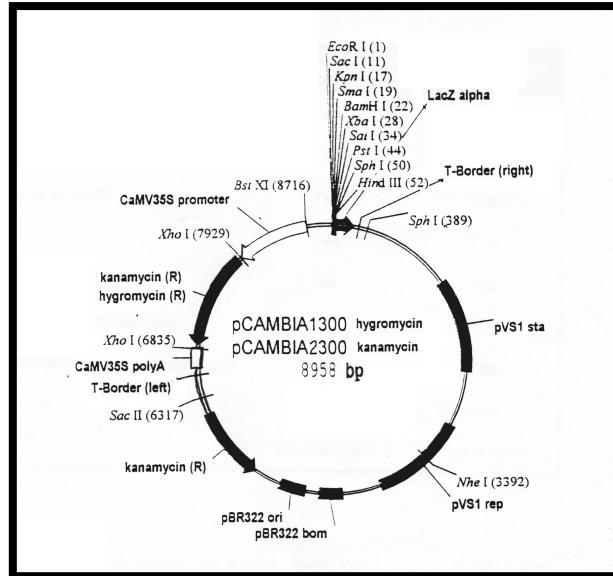


Figura 3.3. Esquema del plásmido pCambia 1300.

RAFL05-13-J04: Plásmido suministrado por “Riken bioresource center” derivado de Bluescript. La característica principal es que contiene el cDNA del gen At4g35090, es decir el *CAT2* de *Arabidopsis*.

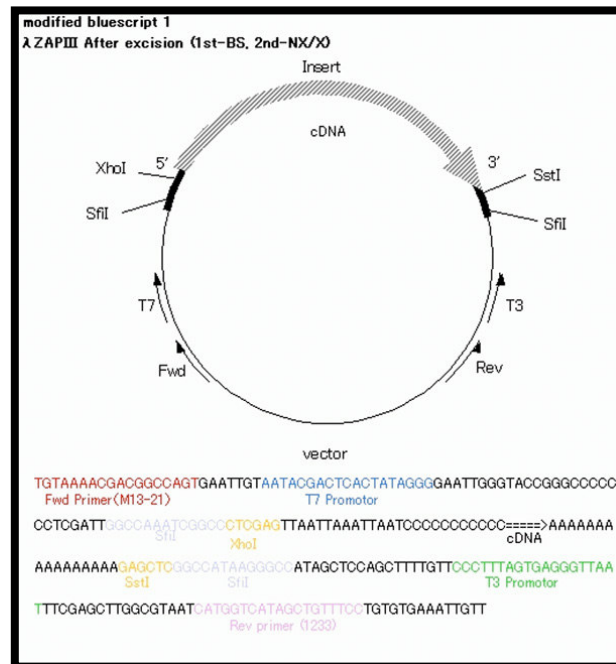


Figura 3.4. Esquema del plásmido RAFL05-13-J04.

pPCR 2.1: Plásmido multicopia utilizado para la clonación de productos de PCR. Posee un sitio de clonación múltiple, los genes marcadores de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y kanamicina y el fragmento *lacZα* para confirmar la presencia del inserto en el sitio de clonación.

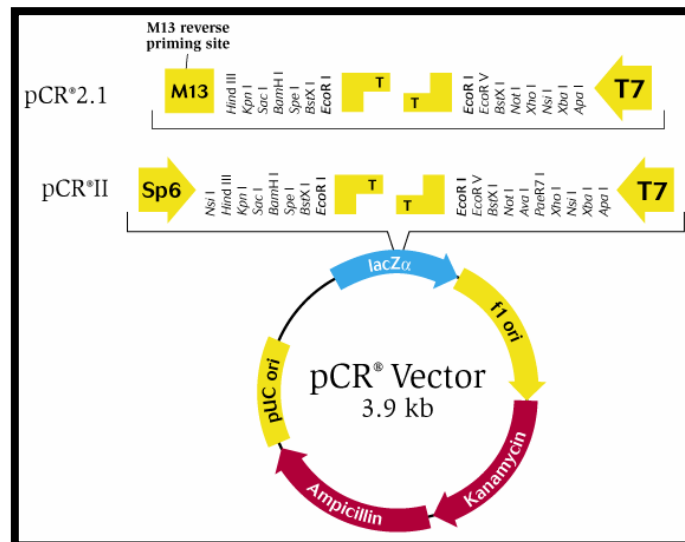


Figura 3.5. Esquema del plásmido pCR 2.1.

pBI121: Plásmido binario utilizado en la transformación de *Arabidopsis* y derivado de pBIN19. En la región comprendida entre las zonas de LB y RB (T-DNA) contiene el gen delator *GUS* bajo el control del promotor 35S y la región terminadora del gen de la nopalisa sintasa (*NOS*), además el gen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina.

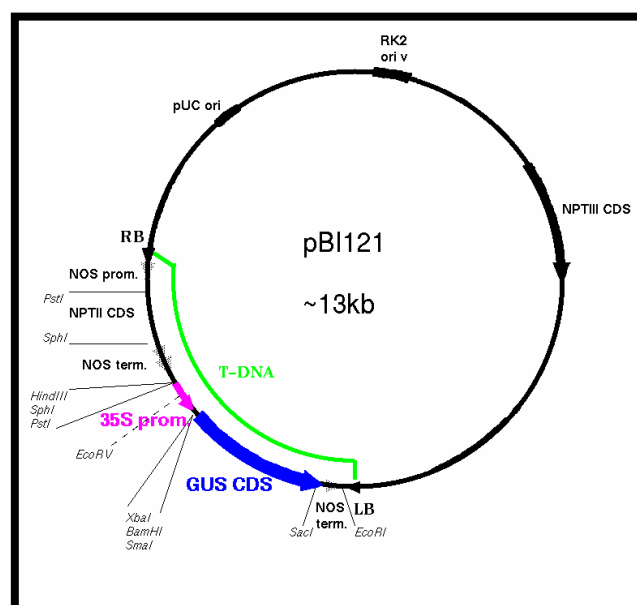


Figura 3.6. Esquema del plásmido pBI121.

3.2 Manipulación y crecimiento de *Arabidopsis*.

En condiciones de invernadero las plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (ecotipo Columbia [Col]) son cultivadas en pequeñas macetas cuadradas de poliestireno 7x7x8 cm. con una mezcla de vermiculita exfoliada (“Verlite”, Vermiculita y derivados S.L.) y turba (Profisubstrat Gramoflor Vertriebs) (1:1 v/v), dispuestas en el interior de una bandeja, la cual periódicamente se riega. Se utiliza un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a 23 °C y 70% de humedad relativa con una intensidad de luz aproximada de $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Para el cultivo “in vitro” las semillas de *Arabidopsis* se esterilizan en su superficie tratándolas primero con una solución de etanol 70% (v/v) y Triton X-100 0,1% (v/v) durante 15 minutos, después se elimina el etanol y se añade una solución de hipoclorito sódico 2,5% (v/v) y Tritón X-100 0,05% durante 10 minutos. Finalmente las semillas se lavan 3 veces con agua MilliQ estéril. La estratificación de las semillas se realiza después de haber sido esterilizadas, almacenándolas a 4 °C durante un periodo de 4 días en oscuridad. La germinación se realiza en medio sólido MS en placas Petri de 9 cm. de diámetro y selladas con cinta porosa. El crecimiento en medio líquido se realiza con medio MS líquido en matraces de 50 ml o en placas de cultivo de 6 pocillos de 15 ml que se colocan en agitación (90-110 rpm.). La incubación de medio MS sólido y líquido se realiza en cámaras con condiciones controladas de 23 °C de temperatura, fotoperiodo de día largo e intensidad de luz de $60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

3.2.1 Medios para el crecimiento de *Arabidopsis*.

Los medios se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 120 °C y 1 atmósfera de presión. Las sustancias termolábiles a las concentraciones indicadas, y esterilizadas por filtración, se añaden al medio después de que éste se enfríe a una temperatura inferior a 50 °C.

Medio Murashige-Skoog (MS).

El medio base de cultivo utilizado fue el medio MS (Murashige-Skoog) sólido estándar. Para la preparación de dicho medio se utilizó la preparación comercial MS de Sigma (ref. m-5524), a razón de 4,7 g/L, junto con sacarosa 1%, MES 0,1%, agar 1% y ajuste de pH a 5,7 con KOH. Para los medios líquidos se utilizan los mismos compuestos, exceptuando el agar.

Medio sin potasio.

Este medio fue utilizado para los ensayos de toma de rubidio, en los cuales es imprescindible que no haya potasio que obstaculice la entrada de rubidio. En este medio se reemplazan las sales MS por una solución de macro y micronutrientes con la siguiente composición: 2,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 mM MgSO_4 , 2 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,1 mM NaFeEDTA, 80 μM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, 25 μM CaCl_2 , 25 μM H_3BO_3 , 2 μM ZnSO_4 , 2 μM MnSO_4 , 0,5 μM CuSO_4 , 0,5 μM Na_2MoO_4 y 0,01 μM CoCl_2 .

Solución nutritiva.

En los experimentos en invernadero en los cuales se observa la sensibilidad del mutante a cloruro sódico se utiliza una solución nutritiva compuesta por los siguientes nutrientes: 4 mM KNO_3 , 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1,5 mM MgSO_4 , 0,75 mM KH_2PO_4 , 0,035% (w/v) EDTA- FeSO_4 , 70 μM H_3BO_3 , 14 μM MnCl_2 , 0,5 μM Cu SO_4 , 1 μM ZnSO_4 , 0,2 μM Na_2MoO_4 , 10 μM NaCl y 0,01 μM CoCl_2 .

3.3 Manipulación y crecimiento de *E.coli*.

Para el crecimiento en medio líquido de *E.coli* se utilizó un incubador orbital a 37° C. Los cultivos se crecieron en tubos o matraces estériles en agitación (200-250 rpm) para mantener una aireación adecuada. En el caso de crecimiento en medio sólido, las placas se situaron en una estufa a 37° C.

3.3.1 Preparación de células competentes.

Células competentes para choque térmico.

Se añaden 400 μl de un cultivo saturado de *E.coli* a 200 ml de medio SOB (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl , 3mM KCl , 10 mM MgCl_2 y 10 mM MgSO_4) y se incuba temperatura ambiente hasta una absorbancia a 660 nm de 0,5-0,7. Se recogen las células por centrifugación en frío a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspenden en 10 ml de TB frío (0,48% p/v Pipes, 16 mM CaCl_2 , 170 mM KCl , 40 mM MnCl_2 , ajustar a pH 6,7), se vuelve a centrifugar, y se resuspenden las células en 10 ml de TB frío. Finalmente se agregan 750 μl de dimetilsulfóxido y se divide en alícuotas de 100 μl que se guardan a -80° C.

Células competentes para electroporación.

Se inoculan 2 ml de cultivo saturado de *E.coli* en 200 ml de medio LB y se incuban a 37 °C hasta una A_{660} de 0,8. Las células se recogen por centrifugación en frío a 4000 rpm durante 10 minutos, luego las células se lavan 2 veces con agua estéril fría 1 vez con glicerol estéril frío al 10% (v/v). Finalmente las células se resuspenden en 1,2 ml de glicerol frío al 10%, se distribuye en alícuotas de 100 μ l y se guardan a -80° C.

3.3.2 Transformación de células competentes.

Choque térmico.

Se añade el plásmido con el que se va a transformar a una alícuota de células competente y se coloca 30 minutos en hielo; seguidamente se realiza una incubación a 42 °C durante 1 minuto e inmediatamente se coloca en hielo durante 2 minutos. Finalmente se agrega 0,9 ml de medio LB, se pone en agitación durante 50 minutos a 37° C y se extiende las células en una placa de LB con el antibiótico de selección del plásmido.

Electroporación.

Se añade el plásmido con el que se va a transformar a una alícuota de células competentes y la mezcla se coloca en una cubeta para electroporación previamente enfriada de 0,1 cm de separación entre electrodos. La electroporación se realiza utilizando el aparato Gene Pulser (Bio-Rad) a 200 Ω , 25 μ F y 1,7 kV. Seguidamente se agrega 0,9 ml de medio SOC, se incuban durante 50 minutos a 37° C en agitación y se extienden las células en una placa de LB con el antibiótico de selección.

3.4 Manipulación y crecimiento de *A. tumefaciens*.

Para el crecimiento en medio líquido de *A. tumefaciens* se utilizó un incubador orbital a 28° C. Los cultivos se crecieron en tubos o matraces estériles en agitación (200-250 rpm) para mantener una aireación adecuada. En el caso de crecimiento en medio sólido, las placas se situaron en una estufa a 28 °C.

3.4.1 Preparación de células competentes.

Se inocula 1 ml de cultivo saturado de *A. tumefaciens* en 100 ml de medio LB y se incuba a 28 °C durante toda la noche. Las células se recogen por centrifugación en frío a 4000 rpm durante 10 minutos y se lavan 2 veces con agua estéril fría. Finalmente se resuspenden en 4 ml de glicerol frío al 10% (v/v) y se dividen en alícuotas de 0,2 ml que se guardan a -80 °C.

3.4.2 Transformación de células competentes.

Se agrega el plásmido que se va a transformar a una alícuota de células competentes y la mezcla se coloca en una cubeta de electroporación, previamente enfriada, de 0,2 cm de separación entre electrodos. La electroporación se realiza utilizando el aparato Gene Pulser (Bio-Rad) a 1 k Ω , 25 μ F y 2 kV. Seguidamente, se agregan 0,8 ml de medio SOC, se incuba durante 2-3 horas a 28 °C en agitación y se extienden las células en una placa de LB con el antibiótico de selección.

3.5 Medios para el crecimiento de bacterias.

Medio Luria –Bertani (LB).

Medio empleado para el crecimiento de *E.coli* y *A.tumefaciens*. Esta compuesto por triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 1%. El pH está ajustado a 7,2 con NaOH. Para preparar medio sólido se agregan 20 g/l de agar.

Medio SOC

Medio empleado para crecer las células de *E.coli*. y *A.tumefaciens*. después de ser transformadas por electroporación. Está compuesto por triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, 10 mM NaCl y 2,5 mM KCl. El pH se ajusta a 7 con NaOH. Después del autoclavado se agregan soluciones estériles de 10mM MgCl₂ y 20 mM glucosa.

Antibióticos.

Se agregan ampicilina (100mg/l) y kanamicina (50 mg/l).

3.6 Extracción de DNA genómico de *Arabidopsis*.

Principio.

El tejido vegetal se tritura congelado con nitrógeno líquido para minimizar la degradación del DNA. El hielo formado sirve de abrasivo. La extracción se realiza con el detergente catiónico CTAB, que solubiliza membranas y desplaza cationes unidos al DNA. Posteriormente se extrae el detergente y lípidos con cloroformo. Se trata con RNAsa y se precipita el DNA como fibras.

Escala y rendimiento.

El procedimiento se describe para 0,1 g de material vegetal, obteniendo unos 5 µg de DNA.

Procedimiento.

El material vegetal recogido se congela en nitrógeno líquido y se tritura en mortero. El polvo obtenido se incuba con 0,4 ml de tampón de extracción [CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) 2% (p/v), Tris-HCl pH 8 100 mM, EDTA pH 8 20 mM, NaCl 1,4 M y PVP (polivinilpirrolidona) 1%] durante 20 minutos a 65 °C con agitación ocasional. Se añaden 0,4 ml de cloroformo:isoamílico (24:1), se mezcla y se centrifuga 10 minutos a 13000 rpm. Se recoge el sobrenadante y se le añaden 0,4 ml de isopropanol, con el cual se precipita el DNA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga 15 minutos a 13000 rpm. Se elimina el sobrenadante, y el precipitado se lava para eliminar el CTAB agitando ocasionalmente con una solución 70% etanol, 10 mM acetato amónico. Para compactar el precipitado se centrifuga 1 minuto a 13000 rpm. Se elimina totalmente el etanol y se deja secar al aire durante 10 minutos. El precipitado se resuspende con 0,1 ml TE (Tris-EDTA). Se añade 5 µl de RNAsa 1% y se deja actuar durante 20 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se centrifuga 5 minutos para eliminar el material insoluble y el sobrenadante se pasa a un tubo nuevo. A continuación se realiza una precipitación del DNA con 0,3 ml de etanol-acetato amónico 7,5 M (6:1) incubándose 10 minutos a una temperatura de -20 °C. Se centrifuga durante 15 minutos, eliminándose el sobrenadante. El precipitado se lava para eliminar las sales con 0,5 ml de etanol 70% y se centrifuga durante 1 minuto para compactar el precipitado. Se elimina el sobrenadante y se deja secar al aire durante 10 minutos. Por último el precipitado se resuspende con 20 µl de TE.

3.7 Minipreparaciones de plásmidos.

Principio.

Tras formar protoplastos con lisozima y EDTA, las células se lisan suavemente por hervido, de forma que el DNA cromosómico queda agregado en el precipitado y el plásmido se extrae en el sobrenadante. Basta una precipitación con isopropanol y otra con etanol-acetato amónico 7,5 M (6:1) para que sea posible digerirlo con nucleasas de restricción. Si además, se trata con RNAsa y fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) es adecuado para subclonar e incluso secuenciar.

Escala y rendimiento.

El método es utilizado para un cultivo líquido de 2 ml crecido a saturación (unos 3 mg de células conteniendo unos 2-4 µg de plásmido). El rendimiento de plásmido es superior al 50% (unos 1-2 µg de plásmido).

Soluciones requeridas.

STET: 10% sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50mM EDTA y 1% Tritón X-100. Se guarda congelado sin necesidad de esterilizar.

Lisozima 5% en agua. Se guarda congelada en alícuotas de 200 µl.

Método.

Se siembra el día anterior a partir de colonias aisladas un tubo con 2 ml de medio selectivo. Se deja creciendo toda la noche.

Primeramente se centrifuga 5 minutos y el precipitado obtenido se resuspende con 0,5 ml STET agitando unos minutos. Se añade a cada tubo 5 µl lisozima 5% y se pone inmediatamente en bloque termostático a 100 °C durante 2 minutos para lisar las células. Se centrifuga 15 minutos en la microcentrífuga y se quita el sedimento con un palillo.

Se precipita con un 1 volumen de isopropanol y se deja 15 minutos en congelador. Se centrifuga 15 minutos resultando un sedimento claramente visible. Se aspira el sobrenadante y se resuspende con 0,2 ml de agua agitando unos minutos. Se vuelve a precipitar en congelador con 0,7 ml de etanol-acetato amónico 7,5 M (6:1) durante 15 minutos y se centrifuga durante 15 minutos. El precipitado se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende con agua, resultando una concentración de 50 ng/µl. Se guarda congelado.

Para análisis con endonucleasas de restricción se utilizan 6 µl de cada minipreparación (0,2 – 0,4 µg de plásmido).

3.8 Purificación de plásmidos de *E.coli* en gran escala por lisis alcalina.

Principio.

Las bacterias se tratan con EDTA para romper la membrana externa y con lisozima para digerir la pared. A continuación se lisan completamente con SDS e hidróxido sódico. El pH alcalino (tamponado por los grupos hidroxilo de la glucosa) desnaturaliza el DNA. El DNA cromosómico resulta fragmentado durante la extracción en trozos lineales y las dos cadenas del DNA se separan completamente en medio alcalino. Las dos cadenas del DNA plasmídico no se separan completamente por ser circulares y quedar trabadas. Al neutralizar con acetato potásico el DNA cromosómico precipita pues los trozos lineales de cadena simple se entrelazan aberrantemente. Los plásmidos se renaturalizan y permanecen en solución. El potasio precipita el SDS y la mayoría de las proteínas. Gran parte del RNA se elimina por precipitación con LiCl y el resto se digiere con RNAsa. Finalmente se eliminan proteínas residuales con fenol y se purifica el plásmido por precipitación con isopropanol y con etanol-acetato amónico.

Escala y rendimiento.

El método está descrito para 0,75 g de peso fresco de bacterias en fase estacionaria, correspondiente a 100 ml de cultivo en medio LB más antibiótico crecido a saturación (absorbancia a 660 nm alrededor de 3). Resultan 40-200 µg de plásmido, dependiendo del número de copias (rendimiento aproximado del 30%).

Soluciones requeridas.

GluTE: 1% glucosa, 25 mM Tris y 10 mM EDTA pH 8. Se guarda estéril en congelador.

Lysozima 5%: lisozima disuelta al 5% en agua y guardada congelada en alícuotas.

SDS-NaOH: 1% SDS y 0,2 N NaOH. Se prepara en el momento de usarla mezclando 1 ml de SDS 10%, 9 ml de agua y añadiéndose en último lugar 0,11 ml de NaOH 50% en peso (19M).

LiCl 6M

KAc: 3M acetato potásico llevado a pH 4,8 con acético glacial, que resulta 2 M.

FCI: fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1).

EtAcAm: 6 volúmenes de etanol absoluto y 1 volumen de acetato amónico^{7,5}
M. Se guarda refrigerado.

RNAasa: RNAasa A pancreática disuelta al 1% en TE más 25 mM NaCl e incubada 20 minutos a 95 °C para inactivar DNAsas contaminantes. Se guarda congelada.

Formación de protoplastos.

El día anterior se siembra por la tarde con una pequeña cantidad de bacterias en 100 ml LB con antibiótico en un matraz de 500 ml. Se crece durante toda la noche a 37 °C. Se recoge a la mañana siguiente el cultivo a saturación y se centrifugan las células 10 minutos a 6000 rpm (rotor Sorvall SS-34). El precipitado se resuspende con 0,5 ml de agua. Se pasa a un solo tubo con 20 ml recuperando 20 ml de agua y se vuelve a centrifugar. Se resuspende con 0,5 ml de GluTE y se diluye con otros 4,5 ml GluTE. Se debe comprobar que no existen grumos de células. Se añaden 0,1 ml de lisozima y se incuban 10 minutos en hielo.

Lisis de los protoplastos y precipitación del plásmido.

Se añaden a la suspensión de protoplastos 10 ml SDS-NaOH recién preparada y se mezcla suavemente por inversión. Se deja 10 minutos en hielo y se añaden 7,5 ml KAc, mezclar suavemente por inversión y se deja 30 minutos en hielo para que precipiten el SDS, las proteínas y el DNA cromosómico. Se centrifuga 15 minutos a 15000 rpm. Se filtra el sobrenadante y se precipita con 15 ml de isopropanol durante 10 minutos en congelador. Se centrifuga 10 minutos a 10000 rpm. Se escurre bien el isopropanol y se resuspende con 5 ml TE, agitando durante unos minutos.

Purificación del plásmido.

Se añaden 5 ml de LiCl 6M, y se deja 15 minutos en hielo y se centrifuga el precipitado de RNA y otros contaminantes insolubles 10 minutos a 10000 rpm. Se añade al sobrenadante 10 ml de isopropanol. Se pone 10 minutos en congelador y se centrifuga 10 minutos a 10000 rpm. Se escurre el isopropanol y se resuspende el precipitado con 1,6 ml de TE, agitando vigorosamente 1-2 minutos. Se añaden 10 µl de RNAasa 1% y se pasa a 2 microtubos de 1,5 ml y se incuban 15 minutos a 37 °C. Se trata cada tubo con 0,5 ml con FCI agitándolo vigorosamente y centrifugándolo. Se pasan las fases acuosas a dos microtubos de 1,5 ml y se repite el tratamiento con FCI. Se pasan las fases superiores acuosas a otros dos tubos y se precipita con 50 µl de acetato sódico 3M y 0,7 ml de isopropanol por tubo. Se dejan 20 minutos en hielo y se centrifugan 10

minutos. Se escurre bien el isopropanol y se resuspende con 150 μ l TE cada tubo. Se pasa todo a un solo tubo y se precipita con 1 ml de EtAcAm durante 10 minutos en congelador. Luego se centrifuga 10 minutos. Se lava con etanol 70%, se deja secar durante unos minutos y se resuspende con 0,2 ml TE agitando unos minutos. Se centrifuga 2 minutos los residuos insolubles y se pasa el sobrenadante a otro tubo. Resulta 0,2-1 mg/ml DNA plasmídico. Se hace una dilución 1/10 para facilitar los análisis y los tubos se guardan congelados.

3.9 Electroforesis de DNA.

Para geles analíticos (minipreparaciones y Southern Blot) se emplea tampón TBE y la agarosa se puede guardar fundida a 50 °C durante varias semanas. Para geles preparativos se emplea tampón TAE, sin ácido bórico que podría contaminar el DNA extraído del gel. Además, la agarosa se prepara fresca para evitar productos tóxicos de descomposición.

Los geles y tampones contienen bromuro de etidio 0,5 μ g/ml para poder visualizar las bandas, siendo el límite de detección del orden de 2 ng por mm de anchura de pocillo cuando se ilumina con UV de 254 nm. En los geles preparativos se utiliza solamente 0,1 μ g/ml de bromuro de etidio y se ilumina sólo con UV de 366 nm, con lo que la sensibilidad es de unos 20 ng por mm de anchura de pocillo.

La electroforesis se corre a un máximo de 10 V/cm de separación de electrodos. En el caso de correr toda la noche utilizan 1 V/cm. Las separaciones normales de electrodos son 9 cm para minigeles y 24 cm para geles grandes.

Las muestras se preparan añadiendo 1 volumen de tampón de carga LBX6 por 5 volúmenes de muestra. Este tampón contiene sacarosa para que la muestra se deposite en el fondo del pocillo, EDTA para parar las digestiones al complejar magnesio y azul de bromofenol para marcar el frente.

El tamaño de las bandas y la cantidad de DNA se cuantifica por comparación con los patrones de lambda-*Hind*III para tamaños normales de DNA. Utilizamos un stock 40 ng/ μ l y para un volumen aplicado de 10 μ l las cantidades de cada banda son las siguientes:

Tamaño (kb)	Cantidad (ng)
23	180
9,4	78
6,6	54
4,4	-
2,3	19
2,0	16
0,56	4,4

Para tamaños pequeños conviene utilizar otros patrones, como por ejemplo pBR322 digerido con BstNI. Utilizando una solución de 0,25 mg/ml, y para un volumen aplicado de 2 μ l las cantidades de cada banda son las siguientes:

Tamaño (kb)	Cantidad (ng)
1,86	210
1,06	120
0,93	105
0,38	43
0,12	13

Las concentraciones más empleadas de agarosa son:

- 0,7% para un rango de tamaños de 0,7 a 12 kb.
- 0,35% para un rango de tamaños de 5 a 50 kb. Estos geles hay que correrlos en frío por ser muy frágiles.
- 1,5% para un rango de tamaños de 0,15 a 4 kb. Para tamaños menores de 0,15 kb debe usarse poliacrilamida o una agarosa especial.

Soluciones requeridas.

TBE X 5: 0,45 M Tris base (54g/l), 0,45 M ácido bórico (27,5g/l) y 10 mM EDTA (20 ml EDTA 0,5 M pH 8 por litro), resultando un pH 8. Se guarda estéril a temperatura ambiente.

TAE X 25: 1 M Tris base (121 g/l), 0,5 M acético (29 ml acético glacial por litro) y 50 mM EDTA (100 ml EDTA 0,5 M pH 8 por litro), resultando un pH 8. Se guarda estéril a temperatura ambiente.

LB X 6: Sacarosa 40%, 0,25% de azul de bromofenol y 0,1 M EDTA. Se guarda congelado.

Lambda-HindIII. 0,1 mg/ml en TE. Se Guarda congelado.

Bromuro de etidio. 1% en agua. Se guarda refrigerado protegido de la luz.

3.9.1 Preparación de gel de agarosa-TAE.

Se pesa 0,7 g de agarosa y se pone en un matraz de 0,25 L con 0,96 ml de agua y 4 ml de TAE X 25. Se funde en microondas. Se deja enfriar hasta 50-60 °C y se añaden 5 µl EtBr 1% y se vierte en la cubeta. Se preparan 1,35 L de tampón con 54 ml TAE X 25 y 50 µl EtBr 1%.

3.9.2 Preparación de gel de agarosa-TBE.

Se pesan 2,1 g de agarosa y se pone en una botella con tapón de 0,5 L con 240 ml de agua y 60 ml TBE X 5. Se funde en microondas y se deja enfriar a 50-60 °C y se añaden 15 µl EtBr y se guarda en estufa a 50 °C. El tampón TBE se prepara con 400 ml de TBE X 5, 1,6 L de agua y 100 µl EtBr 1% y se guarda protegido de la luz.

3.10 Southern Blot.

Soluciones requeridas.

BSA 10X: albúmina de suero bovino libre de Dnasa a 0,5 mg/ml.

KAB 10X: 1M acetato potásico; 0,2M Tris-acético pH 7,6; 0,1M acetato de magnesio y 10 mM ditiotritol.

Tampón de hibridación: 0,4M Na₂HPO₄ pH 7,2; 1mM EDTA y 7% SDS.

Tampón de lavado: 40 mM Na₂HPO₄ pH 7,2; 1mM EDTA y 5% SDS.

Solución de lavado: 0,1% SDS y 0,1X SSC.

Digestión.

Se digieren de 2-3 μg de DNA en un volumen final de 20-30 μl . Para la reacción de digestión se añaden 2 μl de BSA 10X, 2 μl de KAB 10X, 1 μl de RNAsa y 2 μl de la endonucleasa requerida.

Electroforesis.

Se para la reacción con 4 μl de LB 6X. Se prepara tampón TAE y gel TAE 0,8%. Se coloca cada muestra completa en un pocillo y se corre con el marcador λ (Invitrogen 15612-013). Se utiliza unos 20V y se deja toda la noche para que se separen correctamente los distintos fragmentos. Tras finalizar la electroforesis se corta el gel a la altura de los pocillos y se fotografía con una regla con la cual obtenemos referencias para la distancias.

Se cubre el gel en un recipiente con una solución de NaOH 0,4 M y se deja 15 minutos. Con esto se consigue la desnaturalización del DNA.

Trasferencia.

Se coloca una bandeja de base que contiene la solución de NaOH 0,4 M, encima de la bandeja se coloca un cristal y encima se coloca a lo largo un trozo de papel Whatman 3MM que esté comunicado con la solución de la bandeja. Este papel debe estar mojado y pegado al cristal de forma que no se formen burbujas. Encima del papel se coloca el gel y encima la membrana HYBOND N⁺, cortada del mismo tamaño del gel y mojada con la solución de NaOH. En los bordes del gel se coloca parafilm, para evitar que el líquido circule por la periferia. Encima se colocan 3 trozos de papel Whatman del mismo tamaño que el gel y encima servilletas. Finalmente se coloca otro cristal y un peso de alrededor de un cuarto de kilo. Se deja transfiriendo de 8-16 h.

Fijación al filtro.

Se lava el filtro de nylon con SSC 2X para quitarle restos de agarosa adheridos y cristales de sal. El DNA se fija covalentemente al nylon iluminando con luz ultravioleta, para ello es conveniente utilizar un aparato especializado que dosifique la luz ultravioleta adecuada, como por ejemplo el "UV Stratalinker", que utilizando el botón de "auto cross-link" determina una dosis óptima de 0,12 julios de luz de 254 nm.

Hibridación.

Se coloca la membrana en el tubo de hibridación y se colocan 5 ml del tampón de hibridación y se deja prehibridando de 15 a 20 minutos a 65°C. Transcurrido este tiempo se añade la sonda marcada y se hibrida 6-24h.

Tras la hibridación se elimina la sonda y se añade 25 ml de tampón de lavado. El lavado durará 30 minutos. A continuación se realiza un segundo lavado con las mismas características. Después de estos dos lavados se retira la membrana del tubo de hibridación y se coloca en un recipiente con el volumen suficiente de tampón de lavado para que cubra toda la membrana. A continuación se seca la membrana en papel Whatman y se envuelve en plástico *Saran Wrap*.

Los híbridos radioactivos se detectan mediante autoradiografía con una película hyperfilm (Amersham) en un casete de revelado con pantallas intensificadoras, bastando generalmente de 1-5 días. Las películas son reveladas en una procesadora automática M35X-Omat (Kodak).

Reutilización de filtros.

En todo el proceso de manipulación de los filtros es muy importante que no lleguen a secarse, pues ello determina la unión irreversible de sonda al filtro, resistiendo posteriores lavados.

Para el lavado se coloca el filtro en la solución de lavado hirviendo y se deja enfriar hasta temperatura ambiente.

3.11 Preparación de sondas radiactivas de DNA

El DNA empleado para la síntesis de sondas radiactivas fue obtenido mediante la amplificación por PCR de DNA genómico o plasmídico. El producto de PCR es visualizado y separado en un gel TAE 1X y purificado por extracción de banda.

Soluciones requeridas

OLB 5X: 0,1 M MES pH 6,8; 5 mM DTT; 25 mM MgCl₂; 100 µg hexanucleótidos al azar; 0,1 mM dATP; 0,1mM dGTP; 0,1 mMdTT.

BSA 10X: albúmina de suero bovino libre de DNAsa a 0,5 mg/ml.

Procedimiento

Se diluyen de 40-80 ng de DNA con agua en un volumen final de 15 µl se calienta 10 minutos a 95 °C para desnaturalizar. Se pone en hielo y se añaden 5 µl de OLB 5X, 2,5 µl de BSA, 1 µl Klenow y 2 µl (alfa ³²P) dCTP (20µCi totales). Se incuba 4-6 h a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo se añaden 200 µl de TE para parar la reacción. Se desnaturaliza calentando 10 minutos a 95 °C y se pone hielo. La sonda está lista para ser agregada al tubo de hibridación.

3.12 Extracción de RNA de plantas.

Principio.

El tejido vegetal se congela en nitrógeno líquido y se rompe por trituración con mortero y mazo mientras está congelado. A continuación se extrae con un tampón que contiene un detergente fuerte y un agente fuertemente desnaturizante de proteínas tales como SDS y fenol-cloroformo. Ello asegura la inactivación rápida de RNAsas y la extracción del RNA de complejos con proteínas. A continuación se realiza una precipitación con cloruro de litio (el RNA debe estar relativamente concentrado para obtener buenos rendimientos).

Escala y rendimiento.

El método descrito se describe para 1 g de tejido, resultando alrededor de 100 µg de RNA total según los diversos tejidos y variable eficiencia de homogenización.

Soluciones requeridas.

Tampón TCES: 0,2 M Tris, 0,2 M NaCl, 50 mM EDTA, 2% SDS pH 8. Se guarda estéril a temperatura ambiente.

PCI: fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1).

Método.

Primeramente se lava todo bien con agua y jabón y luego se enjuaga con agua MilliQ para evitar la acción de las RNAsas.

Se machaca el material en mortero con nitrógeno líquido. Se pasa el material a un tubo de propileno de 15 ml precalentado a 50 °C y que contenga 1 ml de TCES y 1 ml de PCI (éste debe haber estado a temperatura ambiente 15 minutos antes de usarlo). Se mantiene el tubo 10 minutos a 50 °C. Se centrifuga 10 minutos a 2000 rpm. Se toma el sobrenadante, al que se le añade 1 volumen de cloroformo isoamílico (24:1). Se agita vigorosamente y se centrifuga 10 minutos a 12000 rpm en microcentrífuga. Se toma el sobrenadante y se le añade el mismo volumen de LiCl 6M. Se mezcla suavemente y se deja precipitando en congelador durante 30 minutos. Se centrifuga durante 10 minutos a 12000 rpm. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se lava con etanol 70%. Se centrifuga 3 minutos y se elimina el totalmente sobrenadante. El precipitado se resuspende en 30 µl de agua MilliQ.

3.13 Northern Blot.

Principio.

Para que la movilidad electroforética del RNA sea dependiente del tamaño hay que destruir estructuras secundarias con formaldehído. Ello impide usar en la electroforesis tampones con grupos amino como el Tris. En el presente método se utiliza tampón MOPS.

Soluciones requeridas.

MAE X10: 0,2 M MOPS; 50 mM acetato sódico y 10 mM EDTA, ajustado a pH 7 con hidróxido sódico. Se esteriliza por filtración y se guarda refrigerado y protegido de la luz para que no amarille el MOPS.

Formaldehído 37% (12,3 M)

Tampón de muestras de RNA 1,25X (4ml): Se mezclan 2,2 ml de formamida desionizada; 0,8 ml de formaldehído; 0,5 ml de MAE X10; 0,4 ml de glicerol 80% y 0,1 ml de 2% azul bromofenol.

Tampón de electroforesis MAE 1X: 80 ml MAE 10X; 24 ml formaldehído 37% y 696 ml de agua MilliQ.

Bromuro de etidio 1%

Tampón de hibridación: 0,4 M Na₂HPO₄ pH 7,2; 1 mM EDTA y 7% SDS.

Electroforesis.

Se limpia previamente la cubeta y el tanque de electroforesis con SDS y se enjuaga con agua MilliQ.

El gel se prepara con 1 g de agarosa, 10 ml de MAE 10X y 84 ml de agua. Se disuelve la agarosa en horno microondas y se espera que se enfríe a 50 °C, para añadir 6 ml de formaldehído 37%. Se mezcla y se vierta la solución en la cubeta para que se solidifique. Después de que se solidifique, se añade el tampón de electroforesis MAE 1X.

Las muestras se preparan mezclando 5 µl de solución de RNA (30 µg de RNA total) con 20 µl de tampón de muestra LB 1,25X, al que previamente se le añade 0,1 µl de bromuro de etidio 1%. Se calienta la muestra 10 minutos a 56 °C. Se aplica la muestra al pocillo.

El gel se corre 4 horas a 50 V.

Transferencia.

Tras finalizar la electroforesis se corta el gel a la altura de los pocillos y se fotografía con una regla con la cual obtenemos referencias para las distancias.

El gel se lava con SSC 10X, dos veces durante 15 minutos cada vez, de forma que se consiga eliminar el formaldehído del gel.

El montaje de la transferencia es estándar pero usando SSC 10X como tampón. Se utiliza guantes en todo el desarrollo del proceso para evitar la acción de las RNAsas. Se pone el gel y encima el nylon empapado en SSC 10X. Encima del nylon se ponen tres hojas de papel Whatmann empapadas de la misma forma. Se ponen cintas de Parafilm a los cuatro lados para evitar el circuito de líquido. La transferencia dura 4 horas.

Acabada la transferencia el filtro se seca y el DNA se fija con “Stratalinker” usando el programa “Auto crosslink” dos veces. Se puede comprobar la transferencia al nylon usando un aparato portátil UV a 260 nm.

El filtro se guarda envuelto en plástico y bien protegido de la humedad.

Hibridación.

Se prepara sonda radiactiva utilizando un método estándar.

Primeramente se realiza una prehibridación, colocando el filtro en el tubo de hibridación y añadiéndole 5 ml de tampón de hibridación. El tubo se deja en la estufa durante 15 minutos y entonces se quita la solución de hibridación. Posteriormente se añaden un par ml de tampón y se añade con punta de filtro la sonda radiactiva. Se deja el tubo hibridando a 65 °C y en agitación durante toda la noche.

Una vez realizada la hibridación se procede a los siguientes lavados:

1. Dos lavados de 5 minutos en el tubo de hibridación con 20 ml de una solución SSC 4X y 0,1% SDS.
2. 1 lavado de 5 minutos en el tubo de hibridación con 20 ml de una solución SSC 0,4X y 0,1% SDS.
3. 1 lavado de 5 minutos en un recipiente con la solución SSC 0,4X y 0,1% SDS.

Se seca el filtro con papel Whatmann para evitar condensaciones. Se sella bien el filtro con plástico Saran Wrap para evitar que seque y evitando la formación de burbujas.

Los híbridos radioactivos se detectan mediante autoradiografía con una película hyperfilm (Amersham) en un casete de revelado con pantallas intensificadoras, bastando

generalmente de 1-5 días. Las películas son reveladas en una procesadora automática M35X-Omat (Kodak).

Para la reutilización de filtros se sigue el mismo método que en el caso de “Southern Blot”.

3.14 Reacción en cadena de la DNA polimerasa.

Principio.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento para sintetizar “in vitro” grandes cantidades de una región determinada de DNA con la ayuda de DNA polimerasa, dos oligonucleótidos llamados cebadores que acotan la región que se va a amplificar y ciclos de temperatura que permiten repetidamente separar las dos cadenas del DNA a temperatura alta y anillar los cebadores a temperatura más baja para empezar una nueva ronda de síntesis. En cada ciclo de reacción se duplica el número de moléculas que sirven de sustrato para el siguiente ciclo y se produce por tanto una amplificación exponencial del producto.

Componentes de una reacción de PCR.

- Tampón de reacción: 10-50 mM Tris-HCl pH 9; 1,5-2 mM MgCl₂, 50 mM KCl y 0,1 mg/ml de Triton X-100 o Tween 20. Este tampón suele almacenarse congelado. También puede incluirse en el tampón de PCR gelatina o albúmina bovina a 0,1 mg/ml.
- Deoxinucleótidos trifosfato: se utiliza una mezcla de los cuatro (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) a una concentración final de 0,2 mM cada uno. Se preparan stocks con concentrados 10 veces que se guardan congelados.
- Cebadores: Los dos cebadores acotan la región a amplificar y se utilizan a una concentración de 5-10 ng/μl. Como normalmente tienen un tamaño de 20-30 nucleótidos, su concentración es del orden de 1 μM. Las soluciones concentradas X100 de oligos se guardan congeladas. Todos los cebadores utilizados fueron sintetizados por la empresa Isogen Life Science.
- DNA polimerasa termofílica: la llamada Taq polimerasa con que se puso a punto la reacción de PCR se obtiene de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. En las reacciones de PCR se utiliza una concentración final de enzima de 0,02-0,04 unidades/μl. La enzima se comercializa a 1-5

unidades/ μl y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un medio que contiene 50% glicerol, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM ditioneitol, 1 mM EDTA, 0,1 M KCl y 0,1% Triton X-100.

- Muestras con DNA a amplificar: las cantidades de DNA suelen estar en el rango de 0,1 ng/ μl en el caso de plásmidos a 40 ng/ μl en el caso de DNA genómico.

Las reacciones de PCR se realizan en un termociclador MINICYCLERTM PTC-150 usando el siguiente programa de PCR:

- 1 ciclo de desnaturalización a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 minutos.
- 30 ciclos:
 - 30 segundos de desnaturalización a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - 30 segundos de hibridación de los cebadores utilizando una temperatura de anillamiento $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ inferior a la T_m (“melting temperature”) de los oligonucleótidos.
 - Una extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto por cada kilobase que se vaya a amplificar.
- 1 ciclo de extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.

3.15 RT-PCR cuantitativa.

Principio.

Utilizando una reacción previa de transcripción en reverso, la reacción de PCR permite amplificar fragmentos de mRNA convertidos en cDNA. Se trata de un método rápido y limpio para cuantificar mRNAs en sustitución del tradicional Northern.

Método.

Se utilizan 2 μg de RNA total libre de DNA, en un volumen de 16 μl de agua y se le añade 10 μl de dNTPs (2,5 mM de cada desoxirribonucleotido trifosfato) y 2 μl del cebador para RNA oligo p(dT)₁₅ (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se incuba a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos para romper posibles estructuras secundarias y permitir el anillamiento del cebador. Transcurrido este tiempo la mezcla se enfría el hielo y se le añade 8 μl de tampón RT X5, 4 μl de DTT (ditioneitol) 0,1 M y 0,7 μl de la transcriptasa en reverso Mo-MuLV (virus de la leucemia murina de Moloney). La reacción de síntesis de cDNA se realiza incubando la mezcla de reacción a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 75 minutos. A continuación se inactiva la enzima calentado a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos y se coloca en hielo.

La PCR del cDNA obtenido se realiza con los siguientes componentes:

- 0,5 μ l de cDNA obtenido
- 2 μ l de tampón de PCR X10
- 2 μ l de dNTPs 10 mM
- 1 μ l cebador sentido 10 μ M
- 1 μ l cebador antisentido 10 μ M
- 0,5 μ l de Polimerasa Taq 1U/ μ l
- 1 μ l del colorante EVAGREEN 20 X (Biotium Cat:31000)
- 12 μ l de agua MilliQ

Las reacciones de PCR se realizan en el 7000 Fast Real-Time (Applied Biosystems) con el siguiente programa:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos.
- 40 ciclos:
 - 30 segundos de desnaturalización a 95 °C
 - 30 segundos de hibridación de los cebadores a 55 °C
 - Una extensión a 72 °C durante 30 segundos (los fragmentos amplificados nunca exceden de 0,5 kb).
- 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

3.16 Expresión génica mediante micromatrices de oligos.

Las micromatrices fueron suministrados por el Dr. David Galbraith (Universidad de Arizona, <http://www.ag.arizona.edu/microarray/>) y contienen 29110 sondas con oligos de 70 pares de bases, que representan 26173 genes codificantes de proteínas, 28964 transcritos codificantes de proteínas y 87 miRNAs. El diseño está realizado de acuerdo a la base de datos “TIGR Arabidopsis genome” (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>) y al “miRNA Registry” del “Sanger Institute” (<http://www.sanger.acuk/Software/Rfan/mirna/index.shtml>).

La impresión de los oligos se realiza sobre cristales recubiertos de aminosilano (Telechem). Después de la impresión los cristales se ponen a 80° C durante 1 hora y posteriormente se guardan en lugar seco y oscuro a temperatura ambiente. Justo antes de su uso el cristal se hidrata usando vapor de agua a 60° C durante 10 s y se seca en un termobloque a 65° C. La hidratación se repite 3 veces. El DNA se fija usando luz UV exponiendo los cristales a 65 mJ en un “UV cross-linker” (Stratagene). A continuación los cristales se lavan dos veces en 0,1 % SDS y 4 veces en agua, cada lavado se realiza durante 2 minutos. Se introduce el cristal en etanol 96% durante 1 minuto y se seca por centrifugación a 2000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Los cristales se prehibridan 30 minutos a 42 °C con 100 µL de solución de prehibridación (6X SSC (Sigma), 1% BSA (Sigma) y 0,5% SDS (Sigma) en una cámara de hibridación de microarrays (ArrayIt Hybridization Cassete, TeleChem) y se tapa con una cubierta 60x22 mm LifterSlip (Erie Scientific). Los cristales se enjuagan 5 veces en agua a temperatura ambiente y se secan por centrifugación a 2000 rpm durante 1 minuto. Inmediatamente después se realiza la hibridación.

El RNA se extrae de plantas del genotipo silvestre y del mutante *cat2-1*. A continuación se utiliza el “Message Amp II aRNA Amplification kit” (Ambion) para realizar una amplificación del RNA. Al RNA amplificado se le añade entonces un nucleótido modificado, el 5-(3-aminoallyl)-UTP (aa-UTP) (Ambion), en una relación 1:1 con el nucleótido sin modificar UTP. Después de la purificación, 7,5 µg de aminoallyl-aRNA (aa-aRNA) se utilizan para una reacción de acoplamiento con los fluoróforos Cy3 o Cy5 (N-hydroxyl succinimidyl fluoróforos) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Para esto, cada alícuota de fluoróforo se disuelve en 20 µl de DMSO y se puede utilizar para cuatro reacciones de acoplamiento. El aa-aRNA se disuelve en 15 µl de NaCO₃ 0,1 M pH 9, y se mezcla con 5 µl del fluoróforo Cy3 o Cy5. El acoplamiento se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción se para con 35 µl de NaOAc 100 mM pH 5,2 y se incuba 5 minutos en oscuridad. El aa-aRNA acoplado al fluoróforo se purifica usando una columna de purificación MegaClear (Ambion), a continuación se seca en “speedvac” y se disuelve en 2,5 µl de agua MilliQ. Ambos aa-aRNA (Cy3 y Cy5) se mezclan y se fragmentan en presencia de 20 µg de tRNA y 20 µg de poly(A), usando un agente de fragmentación de RNA (Ambion) en un volumen final de 10 µl. El aa-aRNA fragmentado se usa directamente en la mezcla de hibridación, que contiene 50 µl de formamida desionizada, 30 µl de SSC 20x, 5 µl de solución Denhardt’s y 5 µl de SDS 10% en un volumen final

de 100 μ l. La mezcla de hibridación se desnaturaliza a 95 °C durante 5 minutos y se aplica al cristal pretratado. Los cristales se incuban a 37 °C en una cámara de hibridación (ArrayIt Hybridization Cassete, Telechem). Al día siguiente, los cristales se lavan con las soluciones siguientes: el primer lavado se realiza con SSC 1x y SDS 0,1% 5 minutos a 30 °C, el segundo con SSC 0,2x y SDS 0,1% 5 minutos a 30 °C, el tercero y el cuarto con SSC 0,1x 2 minutos a 30 °C y finalmente con SSC 0,01x 10 segundos a temperatura ambiente. Los cristales se secan por centrifugación a 2000 rpm 1 minuto a temperatura ambiente.

Los *microarrays* hibridados se escanean a 532 nm para el fluoróforo Cy3 y a 635 nm para el fluoróforo Cy5, usando el escáner Genepix 4000B (Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA) a una resolución de 10 nm. Se ajusta 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. La intensidad de cada punto se cuantifica usando el programa “GenePix Pro 6,0 microarray-analysis” (Axon Molecular devices, Sunnyvale CA).

Se obtienen 3 réplicas biológicas para el genotipo silvestre y para el mutante *cat2-1*. Cada réplica se crece en paralelo como se describe en puntos anteriores (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 22 °C). Todas las réplicas se recogen por la mañana sobre la misma hora para evitar diferencias en la expresión de genes regulados por ritmos circadianos. En dos réplicas en el genotipo silvestre se utiliza el fluoróforo Cy5 y en el mutante el fluoróforo Cy3, mientras que en la tercera réplica los fluoróforos se invierten, el Cy3 se utiliza para el genotipo silvestre y el Cy5 se utiliza para el mutante. Después del análisis de las imágenes, los puntos con una intensidad en ambos canales menor al doble de la intensidad media del fondo se eliminan. Al final del análisis sólo se consideran 12.871 puntos, los cuales son los únicos que presentan datos validos para las tres repeticiones, y con los cuales se procede a realizar un análisis más exhaustivo.

Para identificar genes con cambios significativos, se elimina aquellos puntos que no cumplan el requisito de un \log_2 ratio $> 0,8$ o $< -0,8$ en al menos 2 cristales, y sólo se seleccionan los genes con una media del \log_2 de las tres réplicas superior o inferior a 0,68 o a $-0,68$ respectivamente, eliminando aquellos puntos con datos inconsistentes. Con estos criterios se seleccionan 349 puntos, correspondientes a 321 genes sobreexpresados y 12 reprimidos diferencialmente entre el mutante *cat2-1* y el genotipo silvestre.

3.17 Transformación de *Arabidopsis* mediante *A. tumefaciens*.

Se emplearon 8 plantas de *Arabidopsis* crecidas en tierra con una inflorescencia primaria de alrededor de 10 cm de longitud. A estas plantas se les corta el ápice de la inflorescencia primaria para promover la aparición de inflorescencias secundarias y tener mayor cantidad de capullos florales. La transformación de las plantas se realiza 5 días después de haber cortado el ápice de la inflorescencia primaria.

Para la transformación se agrega 1 ml de cultivo saturado de *Agrobacterium* con el vector a 200 ml de medio LB con kanamicina (50 µg/ml) y se incuba en agitación a 28 °C durante 24 h. Luego las células se recogen por centrifugación en frío a 4000 rpm durante 10 minutos y resuspendidas en 400 ml de solución de transformación compuesta por 5% (p/v) sacarosa y 0,02% (v/v) detergente Silwet L-77 (Léele Seeds).

La solución de transformación se coloca en un recipiente donde se introduce la parte aérea de las plantas durante 15 segundos. A continuación, las plantas se cubren con bolsas de plástico para mantener la humedad y aumentar la eficiencia de transformación. Después de 2 días se retiran las bolsas y se mantienen las macetas en el invernadero hasta recoger la población de semillas transgénicas T1.

Selección de líneas transgénicas.

Las semillas transgénicas T1 se siembran en placas Petri de 14 cm de diámetro con medio MS suplementado con el antibiótico de selección de plantas transgénicas. Después de 10 días, las plántulas resistentes al antibiótico (T1) son rescatadas y transplantadas a macetas para obtener la generación T2. Las semillas T2 son crecidas en medio MS sólido con el antibiótico de selección para observar la segregación de la resistencia al antibiótico. De aquellas líneas transgénicas cuyas semillas muestran una segregación 3:1 (resistentes:sensibles) para el antibiótico, se pasan las plántulas resistentes a tierra para obtener la generación T3. La segregación 3:1 es la que se espera cuando existe una sola integración del T-DNA en el genoma. Las semillas T3 se sembraron en medio MS sólido con el antibiótico de selección para identificar los homocigotos.

3.18 Contrucción de plantas transgénicas.

Se realizaron dos construcciones:

1. Construcción de complementación: Se realiza una PCR con los cebadores p+cat2f'' y p+cat2r'' que amplifican una región que comprende el gen *CAT2* con sus intrones incluyendo 1,2 kb de la parte anterior al gen considerándose ésta la parte promotora del mismo y 0,5 kb de la parte posterior al gen considerándose ésta la parte terminadora del gen. Este producto de PCR se hace romo con la enzima T4 DNA polimerasa y se clona en el plásmido Bluescript SK- utilizando la enzima *EcoRV*, obteniendo la construcción pEB1. Para la transformación de plantas silvestres se procedió a subclonar el fragmento *XbaI-XhoI* de pEB1 en pCambia 1300, obteniendo la construcción pEB2, con la cual se transformó *Agrobacterium*. Con esta construcción se transforma el mutante *cat2* para obtener uno de los dos tipos de complemetación realizados.
2. Construcción de sobreexpresión: El cDNA del gen *CAT2* de *Arabidopsis* se obtiene de "RIKEN Experimental Plant División" en el clon RAFL05-13-J04. El cDNA es liberado con *XhoI* y *EcoRI* y clonado en el plásmido multicopia pCR 2.1. Por otra parte se libera el casete 35S:GUS:NOS del plásmido pBI121 y se clona en pCAMBIA1300 en los sitios *EcoRI* y *HindIII*., Obteniéndose la construcción pEB3, en la cual se libera el GUS usando *SacI* y *XbaI*. En su lugar se clona el cDNA liberado del pCR 2.1 con *KpnI* y *XbaI*. Los extremos cortados con *KpnI* se transforman a romos mediante T4 DNA Polimerasa previamente al corte con *XbaI*.

3.19 Medida de actividad catalasa.

Para la medida de la actividad catalasa se crecen tanto las plantas control como las plantas mutantes en medio líquido durante tres semanas y posteriormente se separan las raíces y las hojas para la extracción. El método es el descrito por Moran *et al.*, (1994) y consiste en una extracción de 0,1 g de material a 4 °C con 0,5 ml de tampón que contiene 5 mg de polivinilpirrolidona, 100 mM fosfato potásico pH 7 y 0,1 mM

EDTA. A continuación se centrifuga durante 20 minutos a 15000 rpm y se utiliza el sobrenadante para los posteriores ensayos enzimáticos.

La actividad catalasa se determina a 25 °C mediante la velocidad inicial de disminución de absorbancia a 240 nm de una solución 8 mM agua oxigenada (concentraciones superiores provocan la aparición de burbujas de oxígeno con el consiguiente problema de medición) utilizando de 20-40 µl del extracto (Aebi, 1984). Una unidad se define como 1 µmol/minuto y está referida al peso fresco de tejido extraído.

Se utilizan dos controles uno en el que a la solución de agua oxigenada no se le añade el extracto de la planta y otro en el que se le añade un extracto hervido con la enzima desnaturalizada. Ambos casos presentan una nula actividad enzimática.

3.20 Detección de peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno se detecta visualmente en hojas de plantas de 3 semanas de edad usando 3,3-diaminobencidina (DAB). Las hojas se cortan por la base del peciolo. Se pone en contacto el corte realizado con una solución DAB de 1 mg/ml, pH 3,8 durante 8 horas y expuesto a luz y 25 °C. Transcurrido este tiempo, las hojas se sumergen en etanol hirviendo durante 10 minutos. Este tratamiento decolora las hojas excepto en la zona donde ocurre la interacción entre el tinte y el peróxido de hidrógeno, donde se produce una mancha de color marrón oscura (Orozco-Cárdenas y Ryan, 1999).

3.21 Medida de la producción de etileno.

Las plántulas se crecen durante 15 días en medio MS sólido. A continuación se transplantan a medio MS sólido (control) y medio MS sólido suplementado con 15 mM LiCl y se dejan crecer durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se introducen unos 100 mg de material vegetal en un vial de vidrio de 2,5 ml cerrado herméticamente con tapas de goma y se deja 2,5 h incubando a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se toma 1ml del gas del interior del vial con una jeringuilla y se inyecta en el cromatógrafo de gases HP4890A.

3.22 Crecimiento en atmósfera de etileno.

Las semillas del genotipo silvestre y del mutante se germinan en un medio MS sólido en placa. Las placas se introducen en una caja cerrada herméticamente y transparente donde se inyecta el etileno necesario para alcanzar la concentración de 50 ppm. Cada día se aireaba la caja 5 minutos y se repetía la inyección de etileno.

3.23 Ensayos de toma y acumulación de cationes.

Para el ensayo de toma, se siembran semillas en medio MS sólido y después de 5 días desde la germinación se pasan 3 plántulas a un matraz 125 ml con 25ml de medio MS líquido donde crecen en agitación durante 10 días. Transcurrido este tiempo las plántulas se pasan a un nuevo medio MS líquido suplementado con NaCl 120 mM, LiCl 20 mM o norespermidina 2,4 mM durante los tiempos que se establecieran para la toma. En el caso del rubidio 1 mM se utilizó un medio sin potasio, descrito en un apartado anterior. Finalizada la toma las plantas se lavan con una solución fría de MgCl₂, que bloquea la absorción de cationes, y agua fría, que limpia los posibles cationes que queden en superficie de la planta.

Entonces, las muestras se guardan en papel de filtro y se dejan secando en estufa a 50 °C durante un par de días. Para el caso de la norespermidina, finalizada la toma las muestras se congelan en nitrógeno líquido y se guardan a -80 °C.

Para el ensayo de acumulación de sodio, litio, potasio y norespermidina, se repite el procedimiento anterior, pero las plántulas se dejan en medio MS líquido suplementado con NaCl, LiCl o norespermidina durante dos días. En el caso del potasio, las muestras se recogieron tras 12 días en el medio MS.

3.24 Medida de cationes y norespermidina.

3.24.1 Cationes.

Tras secar las muestras en la estufa se trituran. La extracción de 10 mg de material vegetal se realiza con 1 ml HNO₃ 0,1 M a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifuga 2 minutos, se recoge el sobrenadante y éste se guarda a 4 °C. Para las mediciones se realizan las diluciones oportunas para

entrar en el rango de sensibilidad del espectrofotómetro de absorción atómica SpectrAA 10 plus (Varian).

3.24.2 Norespermidina.

Las muestras se trituran en un mortero usando nitrógeno líquido. Se colocan 200 mg de tejido en un tubo de centrifuga al que se le añaden 2 ml de ácido perclórico 5% (v/v) frío. Se incuba en hielo durante 1 hora y se centrifuga a 4 °C durante 20 minutos a 15000 rpm. El sobrenadante que contiene la fracción de poliaminas se guarda a -20 °C.

La medición se realiza de poliaminas benzoiladas, por tanto, antes de medir se benzoilan las poliaminas según el método de Flores y Gastón (1982) que se detalla a continuación. Se utilizan 0,5 ml de extracto de poliaminas, al que se le añaden en tubo de vidrio 1 ml NaOH 2M y 15 µl de cloruro de benzoilo. Se mezcla vigorosamente durante 1 minuto y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregan 2 ml de NaCl 5 M y 2 ml de éter dietílico y se mezcla vigorosamente durante 1 minuto. Se coge la fase superior, donde se encuentran las poliaminas benzoiladas, y se coloca en tubo de vidrio. Se repite el proceso, pero esta vez con 1 ml de éter dietílico. Posteriormente se evapora el éter usando un sistema de secado por aire. Las poliaminas benzoiladas se resuspenden en 200 µl de metanol. Se utilizan dos patrones de 10 y 20 nmoles que se tratan de forma idéntica a las muestras.

La cantidad de norespermidina benzoilada se determina usando un sistema de HPLC compuesto por una bomba Waters 600E, un autosampler Waters 717 plus, un detector de absorbancia Waters 486 y una columna Symetry C₁₈ 5 µm (Waters). La longitud de onda a la cual se detecta el grupo benzoilo unido a un grupo amino de la norespermidina es 254 nm y una AUFS de 2. Los datos se procesan usando el programa Millennium32 suministrado por Waters. La fase eluyente esta compuesta por un gradiente agua:metanol (50:50) a un flujo constante de 1 ml/minuto hasta una proporción 30:70. después de analizar cada muestra, se lava la columna con metanol puro durante 20 minutos seguido de 15 minutos con agua metanol (50:50) para volver a equilibrar la columna.

RESULTADOS

4.1 Aislamiento del mutante *cat2* de *Arabidopsis*.

El objetivo principal de la presente tesis fue el estudio de los diferentes efectos que produce un aumento permanente en la concentración celular del peróxido de hidrógeno. Hasta la fecha, se han realizado numerosos estudios que implican al peróxido de hidrógeno con el daño celular debido al estrés oxidativo que produce y por ello queda clasificado como especie reactiva del oxígeno. Pero por los últimos trabajos realizados, se sabe que el peróxido de hidrógeno también funciona como molécula señalizadora. Se ha demostrado su implicación en la regulación del cierre de estomas, la inhibición de la germinación, y su función como factor fundamental en la elongación de los pelos radiculares.

Es por ello que nuestro trabajo se centró en el aislamiento de un mutante que de forma natural, sin la adición exógena, tuviera unos niveles celulares de peróxido de hidrógeno superiores a los que encontramos en genotipos silvestres. De esta forma, tenemos un sistema de estudio de los efectos y fenotipos derivados de la alta concentración del peróxido de hidrógeno, tanto en su componente oxidativa como en su función reguladora.

Los posibles mutantes con una previsible mayor acumulación de agua oxigenada se buscaron en la colección del SALK INSTITUTE y las semillas de los mutantes fueron suministradas por el “Nottingham Arabidopsis Stock Center” (NASC).

La línea mutante que se eligió, además de la ya comentada probable sobreacumulación de peróxido de hidrógeno, debe cumplir otros dos requisitos fundamentales:

- La mutación debe estar ubicada en un exón, y a ser posible no terminal, para tener una completa seguridad de que exista una pérdida total de función génica.
- El gen elegido debe transcribirse de una forma constante y regular en la planta. Por ello, debe estar apoyado por la presencia de un cDNA completo que esté registrado en los bancos de datos.

Estos requisitos fueron cumplidos por la línea N576998, la cual contiene una inserción de T-DNA en el cuarto exón del gen At4g35090. Este gen en cuestión corresponde a la isoforma 2 de la catalasa que se encuentra en el cuarto cromosoma de *Arabidopsis* (figura 4.1).

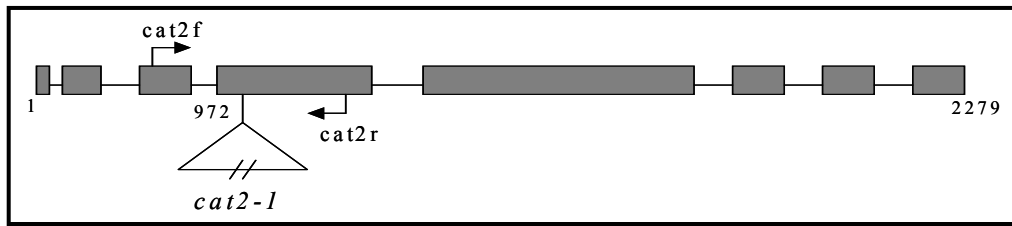


Figura 4.1. Inserción del T-DNA dentro del gen *CAT2*. Los rectángulos corresponden a exones y las posiciones nucleotídicas con referencia al principio del gen quedan señaladas. También quedan señaladas la posición de los cebadores usados para la PCR.

4.1.1 Diseño de cebadores.

Los cebadores diseñados, a parte de las consideraciones generales (de más de 20 pares de bases, con un 50% de bases G+C y que los extremos no solapen entre sí), debían ser totalmente específicos para *CAT2* para amplificar este fragmento exclusivamente y no otras catalasas, ya que las secuencias nucleotídicas de las tres catalasas de *Arabidopsis* denominadas *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* llegan a ser idénticas en un 72% (McClung, 1997).

Primeramente se calcularon las temperaturas para las que anillan nuestros cebadores con las secuencias elegidas de *CAT2*.

A. **Cebador cat2f: gcttgcaatttcgacaggg**

Se observan 11 pares de purinas y 9 pares de pirimidinas. Cada par de purinas hace que la temperatura de anillamiento aumente en 4 °C y cada par de pirimidinas hace que la temperatura de anillamiento aumente 2 °C, con lo cual el cebador cat2f anilla en *CAT2* a una temperatura de 62 °C.

B. **Cebador cat2r: cctggttgacgtatggtttg**

Se observan 11 pares de purinas y 10 pares de pirimidinas. Por tanto, la temperatura de anillamiento del cebador cat2r es de 64 °C.

A continuación se comparó con las otras catalasas existentes en *Arabidopsis*, por si existiera algún tipo de hibridación no deseada y obtuviéramos una amplificación diferente al del fragmento de *CAT2*.

- ***CAT1***

A. El fragmento de mayor similitud con el cebador **cat2f** fue:
ctCgcTaaCttTgacaggg.

En mayúsculas quedan reflejadas las bases diferentes que presenta el fragmento con respecto al cebador *cat2f*. Cada diferencia de base rebaja la temperatura de anillamiento en 7,5 °C. Al observarse 4 cambios de base se puede concluir que el anillamiento entre nuestro cebador y el fragmento de *CAT1* sólo se produciría en el caso que la reacción se realizara a una temperatura menor o igual a 32 °C.

B. El fragmento de mayor similitud con el cebador **cat2r** fue **cctgttggTcgCTtggtCttg**.

Se observan 4 cambios de base. El anillamiento sólo se produciría en el caso que la reacción se realizara a una temperatura menor o igual a 34 °C.

Por tanto se puede concluir, que utilizando los cebadores *cat2f* y *cat2r* no se producirá una amplificación parcial del gen *CAT1*, ya que la temperatura de anillamiento de la PCR para la identificación de mutantes *cat2* se estableció en 60 °C.

- **CAT3**

A. El fragmento de mayor similitud con el cebador **cat2f** fue **gGttgcTaatttcACcagAg**.

Se observan 5 cambios de base, por tanto sólo se produciría anillamiento en el caso que la reacción se realizara a una temperatura menor o igual a 24,5 °C.

B. El fragmento de mayor similitud con el cebador **cat2r** fue **ccGgttggTcgCTtggtTCtg**.

Se observan 6 cambios de base, por tanto sólo se produciría anillamiento en el caso que la reacción se realizara a una temperatura menor o igual a 19 °C.

Por tanto se puede concluir, que utilizando los cebadores *cat2f* y *cat2r* no se producirá una amplificación parcial del gen *CAT3*, ya que la temperatura de anillamiento de la PCR para la identificación de mutantes *cat2* se estableció en 60 °C.

4.1.2 Identificación de homocigotos para la mutación *cat2* por PCR.

Para la identificación de los homocigotos mutantes se utilizan los cebadores: **cat2f**, **cat2r**, **tdna1** y **tdna2**.

Se realizaron dos reacciones de PCR:

- I. La primera reacción utiliza los cebadores *cat2f* y *cat2r* y tiene por objetivo la detección de alelos silvestres.
- II. La segunda reacción utiliza los cebadores *cat2f*, *tdna1* y *tdna2* y tiene por objetivo la detección de los alelos mutantes, considerando las dos posibles orientaciones de inserción del T-DNA.

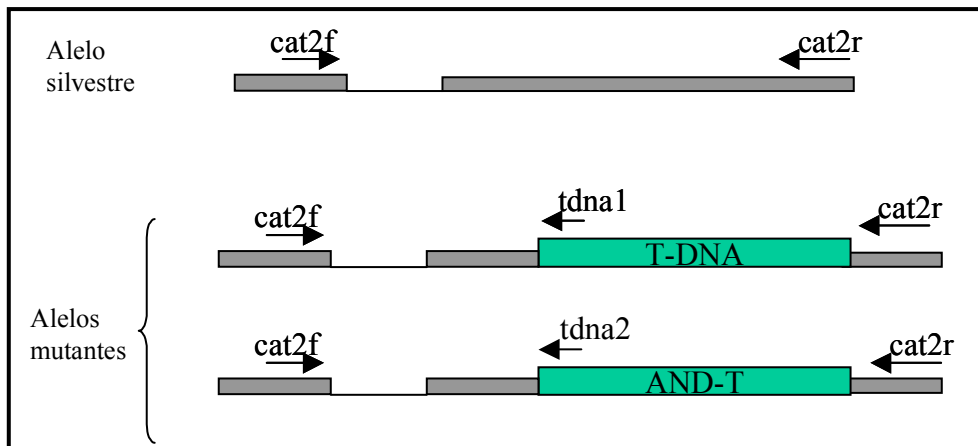


Figura 4.2. Esquematación de los 3 posibles alelos existentes. Por sencillez se representan únicamente el tercer y el cuarto exón de *CAT2*, así como las dos posibles inserciones del T-DNA (La primera orientación en que se inserta la denominamos inserción en sentido y la segunda inserción antisentido).

Por tanto, en los homocigotos sólo se producirá amplificación en la segunda reacción, mientras que en los genotipos silvestres sólo se producirá en la primera reacción. Para los hemicigotos se producirá amplificación en ambas reacciones (figura 4.2).

Tras aislar los posibles homocigotos para la mutación se determinó la forma en que se había producido la inserción, en dirección “sentido” o en “antisentido”, utilizando separadamente el cebador *tdna1* del *tdna2*. Se llegó a la conclusión que la inserción en la línea mutante era en “sentido”, ya que sólo se producía amplificación en los homocigotos al utilizar el cebador *tdna1* y no al utilizar el *tdna2*.

Se aislaron dos individuos homocigotos y la inserción fue comprobada por Southern Blot. Desde este momento al mutante se le denominó *cat2-1*, por representar específicamente a la línea N576998, que posee una inserción en el cuarto exón del gen *At4g35090*.

4.1.3 Identificación de homocigotos para la mutación *cat2-1* por Southern Blot.

Se realizó un Southern Blot con 2 µg de DNA genómico digerido con los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* por línea y utilizando una sonda específica de *CAT2* generada con los cebadores *cat2f* y *cat2r'*, tal como se detalla a continuación.

- Generación de una sonda específica para detectar mutantes *cat2-1*.

Primeramente se realizó una amplificación por PCR de un fragmento delimitado por los cebadores *cat2f* y *cat2r'* (fragmento de 471 pb) a partir de DNA genómico. El fragmento generado se ligó en el plásmido pCR 2.1 especialmente diseñado para clonar productos de PCR. Con los mismos cebadores anteriores se generó la sonda que luego se utilizará en la hibridación.

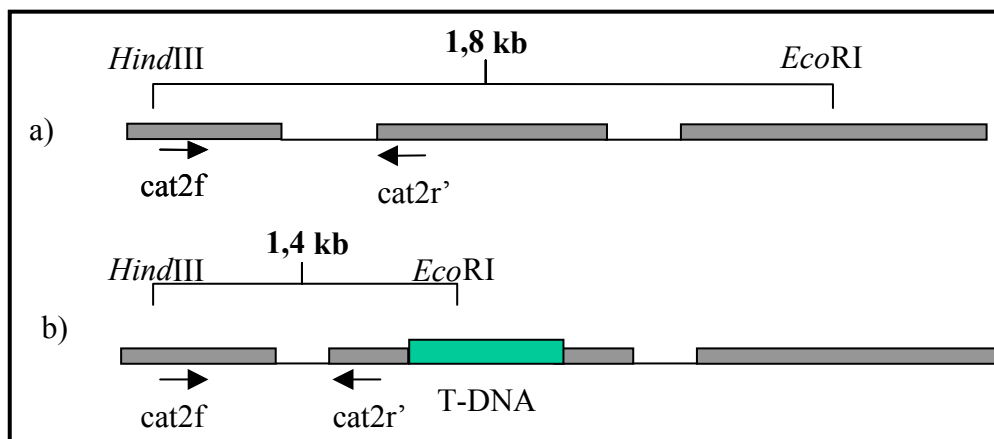


Figura 4.3. Esquematización de los distintos fragmentos generados tras la digestión con los enzimas *HindIII* y *EcoRI* entre el alelo silvestre(a) y el alelo mutante(b).

Por tanto, en el caso de genotipos silvestres aparece una banda de 1,8 kb, en el caso de homocigotos para la mutación aparece una banda de 1,4 kb y en el caso de heterocigotos aparecen las dos bandas (figuras 4.3 y 4.4).

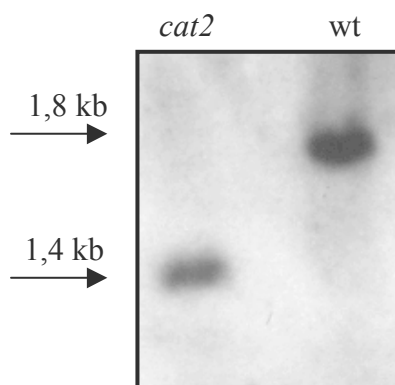


Figura 4.4. Southern Blot del mutante *cat2-1* y del genotipo silvestre. Cada línea posee 2 µg de DNA digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*, utilizando la sonda generada a partir de los cebadores *cat2f* y *cat2r'*.

4.2 Análisis de expresión del gen *CAT2* en el mutante *cat2-1*.

El análisis de expresión del mensajero del gen *CAT2*, se realizó mediante la técnica de RT-PCR, que consiste en cuantificar por PCR de manera semicuantitativa los cDNAs generados a partir del mRNA de la planta.

En este caso se utilizaron como cebadores el *cat2f* y el *cat2r'* (Figura 4.3), quedando demostrado que este mutante *cat2-1* es nulo, ya que la expresión del mensajero queda totalmente suprimida, como era de esperar por la zona en que se inserta el T-DNA, es decir en uno de los exones iniciales (figura 4.5).

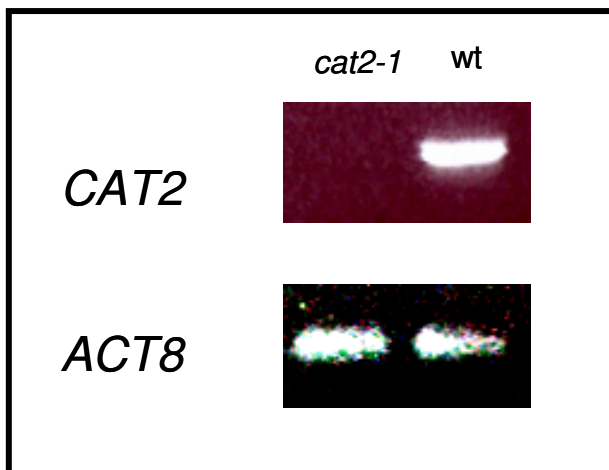


Figura 4.5. RT-PCR del transcrito de *CAT2* en el mutante *cat2-1* y en el genotipo silvestre. Se utilizan como cebadores de la reacción *cat2f* y *cat2r'*. En paralelo se lleva el gen de actina *ACT8* como control de la transcripción.

4.3 Caracterización bioquímica del mutante *cat2-1*.

4.3.1 Medida de actividad catalasa.

Tras el aislamiento del mutante *cat2-1* se realizó un ensayo para determinar la actividad catalasa que poseía respecto a un genotipo silvestre. Para esta determinación se utilizó la capacidad de la catalasa para dismutar el peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua y oxígeno, lo que produce un cambio de absorbancia en el ultravioleta. De este modo, se preparó un extracto tanto de raíz como de hoja, que se utilizó para comprobar la velocidad de dismutación de una solución de agua oxigenada.

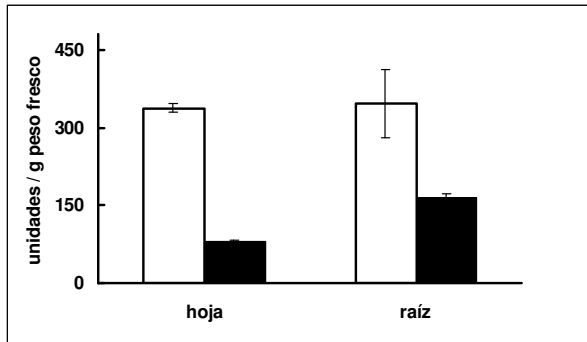


Figura 4.6. Ensayo enzimático para determinar la actividad catalasa de extractos de hoja y raíz en un genotipo silvestre (columnas blancas) y en el mutante *cat2-1* (columnas negras). Los valores son la media de cuatro determinaciones y las desviaciones estándar están indicadas por las barras verticales.

Los resultados fueron los esperados (figura 4.6), el mutante *cat2-1* exhibe una gran disminución en su actividad catalasa, ya que *CAT2* es una de las catalasas predominante en *Arabidopsis*. La actividad enzimática del mutante se ve reducida a un 21% respecto de la del genotipo silvestre en el caso de hoja y en un 47% en el caso de raíz, esto es debido a la destacada expresión de *CAT2* en hojas (McClung *et al.*, 1997).

4.3.2 Detección de peróxido de hidrógeno.

En este experimento se demuestra que el descenso en actividad catalasa lleva consigo un aumento en la acumulación de peróxido de hidrógeno en hojas. Existen grandes dificultades para hacer análisis cuantitativos fiables y precisos de peróxido de hidrógeno en plantas (Neill *et al.*, 2002), es por ello que decidimos realizar un análisis cualitativo pero muy ilustrativo de la mayor acumulación de peróxido de hidrógeno en el mutante *cat2-1*. En la figura 4.7 observamos la acumulación de agua oxigenada por la formación de una mancha negra debida a la interacción de ésta con el colorante DAB.



Figura 4.7. Producción en hojas de agua oxigenada en un genotipo silvestre (fila superior) y en el mutante *cat2-1* (fila inferior) utilizando 3,3'-diaminobenzidina. El experimento fue repetido 6 veces con resultados similares.

4.4 Complementación del mutante *cat2-1*.

Se realizó la complementación del mutante *cat2-1*, mediante la construcción de complementación detallada en el apartado 3.18. Se obtuvieron varias líneas que volvían a expresar *CAT2*, desapareciendo las alteraciones morfológicas que presentaba el mutante. Estas líneas fueron utilizadas posteriormente en diversos experimentos para comprobar que los fenotipos eran debidos a la mutación en *CAT2* y no a artefactos producidos por la transformación con *Agrobacterium*.

4.5 Caracterización fenotípica del mutante *cat2-1*.

4.5.1 Alteraciones morfológicas.

Tras el aislamiento del mutante *cat2-1*, se comprobaron rápidamente ciertas alteraciones que se presentaban en su crecimiento respecto del genotipo silvestre de forma sistemática y sin establecer ningún tipo de estrés.

En el caso de su crecimiento en placa el mutante tras 10 días desde la germinación presentaba un significativo menor tamaño que el genotipo silvestre, así como una coloración verde más pálida, tal como se aprecia en la figura 4.8.

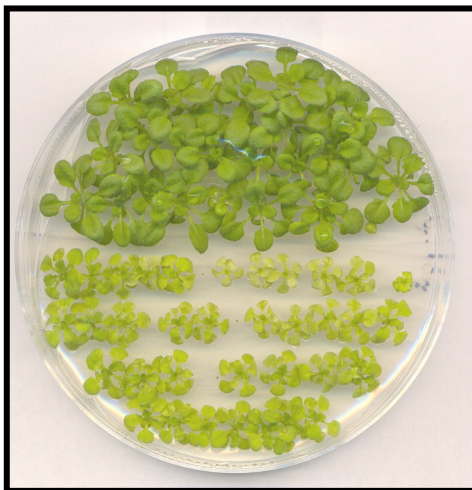


Figura 4.8. Crecimiento en MS en placa tras 10 días desde la germinación del mutante *cat2-1* (abajo) respecto del genotipo silvestre (arriba).

Las plántulas al ser crecidas en invernadero y con 3 semanas desde la germinación mantuvieron su menor tamaño y color verde pálido, pero además desarrollaron un prematuro escapo floral, así como manchas necróticas blancas en los bordes de las hojas con más tiempo de desarrollo (figura 4.9).



Figura 4.9. Crecimiento en invernadero tras 3 semanas desde la germinación del mutante *cat2-1* (fila inferior) respecto del genotipo silvestre (fila superior).

Ante el aparente menor crecimiento de raíz que presentaba el mutante, se realizó posteriormente un estudio comparativo del crecimiento de la raíz entre el mutante y el genotipo silvestre. En experimentos de crecimiento vertical en placa y tras 10 días desde su germinación se comprobó que el mutante presentaba una raíz principal con mayor longitud, pero sin embargo, poseía una menor masa, ya que la formación de raíces secundarias es prácticamente nula. En este experimento, también se comprobó el desarrollo de la raíz con la complementación del mutante, que resultó ser idéntico que en el caso del genotipo silvestre (figura 4.10).



Figura 4.10. Crecimiento radicular tras 10 días desde la germinación en placa en medio MS en posición vertical del genotipo silvestre (izquierda), de la complementación del mutante (centro) y del propio mutante (derecha).

Estos resultados fueron cuantificados para el caso del genotipo silvestre y del mutante (figura 4.11).

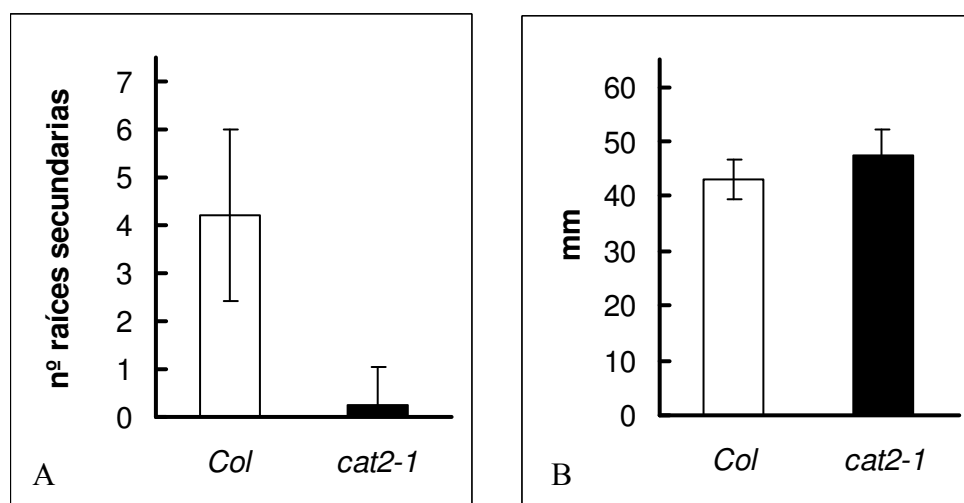


Figura 4.11. (A) Desarrollo de raíces secundarias tras diez días desde la germinación. (B) Longitud de la raíz principal tras diez días desde la germinación. Los valores son la media de 20 plantas y la desviación estándar están representadas por las barras verticales.

A la vista de las alteraciones morfológicas que presenta el mutante *cat2-1*, se pone de manifiesto que es un mutante hipersensible al estrés oxidativo, por el menor desarrollo vegetativo y radicular que presenta, además de las manchas necróticas que aparecen en sus hojas adultas. Por otra parte, se puede adivinar que es un mutante con alguna alteración en auxinas, y llegamos a esa conclusión por su anormal desarrollo radicular, así como también por su menor tamaño foliar.

4.5.2 Sensibilidad a estreses abióticos.

En este apartado se quiso comprobar la sensibilidad del mutante *cat2-1* a diferentes generadores de estrés oxidativo, tal como otros estudios presentaban con otros mutantes deficientes en catalasa (Chamnongpol *et al.*, 1996; Vandenabeele *et al.*, 2004).

Peróxido de hidrógeno

El primer lugar se estudió el desarrollo del mutante en un medio al que se le añadió agua oxigenada. Se puso de manifiesto la supuesta sensibilidad, ya que este mutante posee una reducida capacidad para la eliminación de esta especie reactiva de oxígeno (figura 4.12).

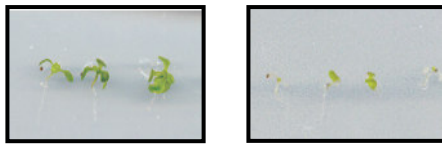


Figura 4.12. Crecimiento del genotipo silvestre (panel izquierdo) y del mutante *cat2-1* (panel derecho) tras 7 días desde la germinación en un medio MS suplementado con 3mM de agua oxigenada.

Por otra parte se comprobó la sensibilidad del mutante sumergiendo pequeños cilindros de hoja en una solución 10 y 100 mM de peróxido de hidrógeno durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se observa claramente el blanqueamiento que sufren los cilindros de hoja del mutante *cat2-1* poniendo de manifiesto la carencia del enzima antioxidante (figura 4.13).

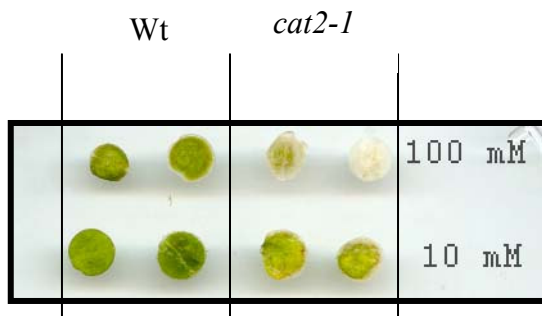


Figura 4.13. Sensibilidad del mutante *cat2-1* al peróxido de hidrógeno. Los cilindros fueron cortados de plantas de 3 semanas e incubadas en las soluciones indicadas de peróxido de hidrógeno durante 24 horas.

Salinidad

En segundo lugar se comprobó el desarrollo de la planta en macetas regadas con un medio salino. A las concentraciones utilizadas las plantas prácticamente no disminuyeron su tamaño respecto a los controles sin sal, pero sin embargo, el mutante *cat2-1* desarrolló una clorosis fruto de su sensibilidad (figura 4.14). Los resultados fueron los mismos al realizarlos en cultivo “in vitro”.



Figura 4.14. Crecimiento del genotipo silvestre (columna izquierda) y del mutante *cat2-1* (columna derecha) tras 3 semanas desde la germinación con riego semanal de una solución 100 mM NaCl.

Alta intensidad lumínica

En tercer lugar se ensayó el efecto de una relativamente alta intensidad lumínica ($130 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) desde la germinación hasta las dos semanas de desarrollo. Se trata de un ensayo muy utilizado en otros mutantes deficientes en catalasa (Vandenabele *et al.*, 2003), aunque en esos experimentos se utilizan mayores intensidades de luz, de hasta $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pero con exposiciones de tiempo menores (horas). Estos resultados son prácticamente los mismos, ya que se pone de manifiesto la sensibilidad del mutante *cat2-1* al estrés oxidativo generado por la alta intensidad de la luz, y como han demostrado en el anterior estudio, el estrés se concreta en un aumento en la producción de agua oxigenada en las células del parénquima en empalizada de la hoja y conlleva a la apoptosis de las células (figura 4.15).



Figura 4.15. Desarrollo en medio MS del genotipo silvestre (panel izquierdo) y del mutante *cat2-1* (panel derecho) en condiciones de alta intensidad lumínica a las dos semanas desde la germinación.

Ácido

El estudio realizado por Giannattasio *et al.*, (2005) en levadura destaca que tras una acidificación del medio se produce un aumento de la actividad enzimática de la catalasa como medida de protección celular. Es probable que en *Arabidopsis* la catalasa sea una de las enzimas más importantes contra el estrés ácido, con lo que la carencia de esta enzima puede comportar una sensibilidad de la planta ante este estrés.

Para comprobar la probable sensibilidad del mutante a estrés ácido, las plantas se crecieron en ácido acético 2 mM y en paralelo se llevó un control del crecimiento en MS. Tras dos semanas se comprobó la reducción de crecimiento (en peso fresco) debida al tratamiento en el genotipo silvestre y en el mutante. Por los resultados obtenidos se llega a la conclusión que el mutante es sensible a este ácido ya que el tratamiento le produjo una mayor reducción en su crecimiento (figura 4.16).

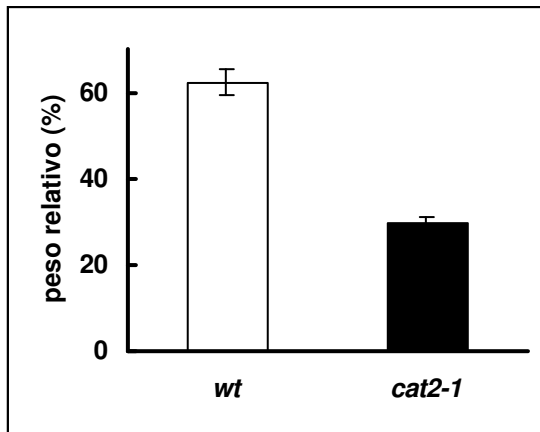


Figura 4.16. Peso relativo respecto al de MS tras crecimiento en ácido acético 2 mM en un genotipo silvestre y en el mutante *cat2-1* en plantas de 2 semanas.

Congelación

Por último se ensayó el estrés por congelación, en el cual se llegó a la misma conclusión de que el mutante *cat2-1* presenta sensibilidad ante este estrés (figura 4.17). Se trata de un resultado interesante, ya que en los anteriores estudios con mutantes deficientes en catalasa no se llegó a la misma conclusión, en ensayos utilizados con frío (Willekens *et al.*, 1997). Esto puede ser debido a que las mutaciones son de distinta naturaleza, ya que ellos reducen la actividad en las tres catalasas de *Arabidopsis*, y en cambio en nuestro estudio eliminamos la expresión de la segunda catalasa, y que según otros estudios es inducida por frío (Mittler *et al.*, 2004).

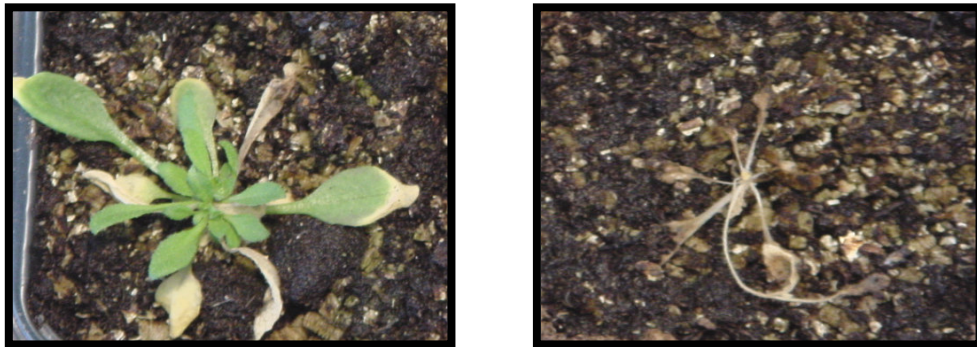


Figura 4.17. Genotipo silvestre (panel izquierdo) y mutante *cat2-1* (panel derecho) crecidas durante 3 semanas y sometidas a un estrés por congelación de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Fotografías tomadas tras 5 días desde que se someten al estrés. Se realizaron 10 repeticiones del experimento con idénticos resultados.

4.6 *cat2-1* presenta una alteración de la homeostasis de iones.

En este apartado se realizó un estudio de las repercusiones de la elevada concentración celular de peróxido de hidrógeno en la homeostasis de iones a nivel de planta entera, ya que se supone que el peróxido de hidrógeno es un modulador general del transporte de iones. Es conocida la función del agua oxigenada para activar los canales de calcio en las células oclusivas de los estomas, bloqueando la entrada de potasio (Pandey *et al.*, 2007). También se han realizado estudios relacionando el agua oxigenada con el transporte de potasio en células de la raíz.

Se estudió tanto la toma a tiempos cortos, como la acumulación durante varios días de litio, sodio, norespermidina y potasio. Para medir la toma de potasio se utilizó el rubidio como análogo.

4.6.1 Toma de iones

Litio

En el caso de la toma de litio, se ensayaron los tiempos de 30, 60 y 90 minutos, y se comprobó que el contenido en litio de la planta a tiempo cero era nulo. Se observaron diferencias importantes, ya que a los 30 minutos el mutante ya había tomado un 30% más de litio que el genotipo silvestre. Tras 90 minutos la toma empieza a igualarse, aunque sigue siendo superior la del mutante, la cual parece haber llegado antes a la fase de saturación (figura 4.18).

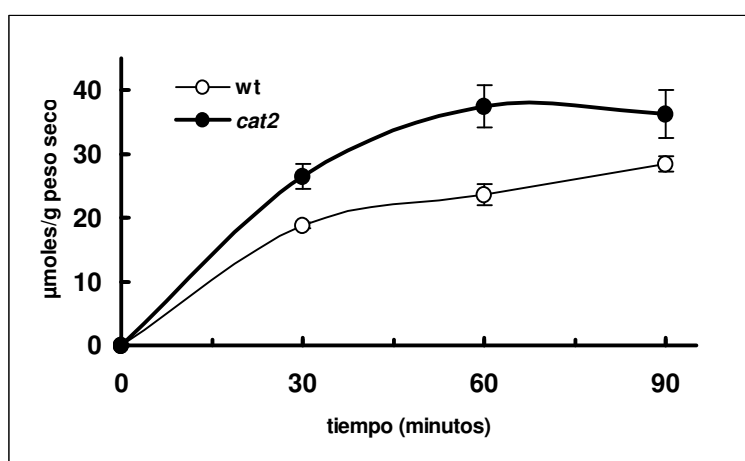


Figura 4.18. Toma de litio en un genotipo silvestre y en el mutante *cat2-1*. Los valores son la media de 4 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales. El experimento se repitió 3 veces con resultados semejantes.

Sodio

Se ensayaron tiempos de 10, 20 y 40 minutos. Los niveles de sodio, antes de la toma, fueron apreciables pero bajos y semejantes tanto en el mutante como en el genotipo silvestre, alcanzando valores cercanos a los 10 micromoles por cada gramo de peso seco. La toma de sodio tuvo características similares a la del litio, ya que el mutante en tiempos relativamente cortos presentaba un 30% más concentración que el genotipo silvestre. La fase de saturación de la toma parece que en ambos individuos se alcanza a los 20 minutos, pero siendo de nivel superior en el caso del mutante (figura 4.19).

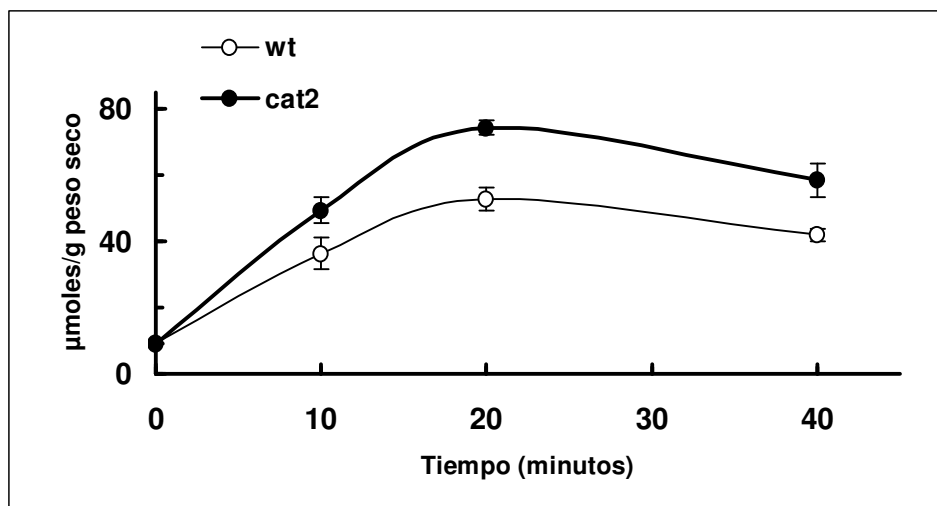


Figura 4.19. Toma de sodio en un genotipo silvestre y en el mutante *cat2-1*. Los valores son la media de 4 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales. El experimento se repitió 3 veces con resultados semejantes.

Norespermidina

Nuevamente el mutante *cat2-1* presenta una mayor toma en todos los tiempos (20, 40 y 80 minutos). Las diferencias a tiempos cortos (20 minutos) fueron escasas (10%), pero estas se acentuaron con la medición a los 40 minutos, en donde el mutante alcanza una toma un 30% mayor que la del genotipo silvestre. A partir de este momento el mutante llega a la fase de saturación y las diferencias comienzan nuevamente a ser menores (figura 4.20).

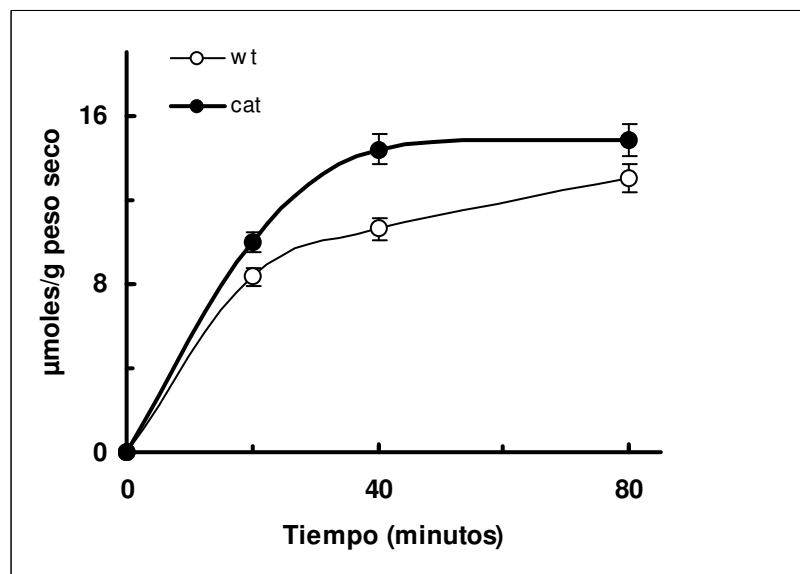


Figura 4.20. Toma de noespermidina en un genotipo silvestre y en el mutante *cat2-1*. Los valores son la media de 4 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales. El experimento se repitió 3 veces con resultados semejantes.

Rubidio

La toma de potasio no se realiza con el mismo elemento en cuestión, ya que las concentraciones de potasio en la célula son tan grandes que pequeñas variaciones no se podrían medir de forma fiable. Por tanto, se usa un análogo, el rubidio, que teóricamente utiliza los mismos mecanismos para incorporarse a la célula. En este no hubo diferencias significativas entre el mutante y el genotipo silvestre (figura 4.21).

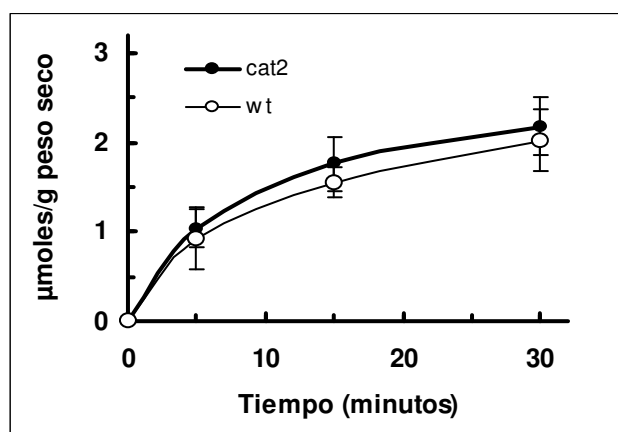


Figura 4.21. Toma de rubidio en un genotipo silvestre y en el mutante *cat2-1*. Los valores son la media de 4 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales. El experimento se repitió 3 veces con resultados semejantes.

4.6.2 Acumulación.

Litio

La acumulación se midió tras dos días y con los datos obtenidos se puede concluir que el mutante, al igual que ocurría en la toma, acumula más litio. Esta diferencia fue notoria ya que el genotipo silvestre sólo presenta un 67% de la acumulación que presenta el mutante. Los datos obtenidos para cultivo líquido, también denotaron la mayor acumulación del mutante *cat2-1* (figura 4.22).

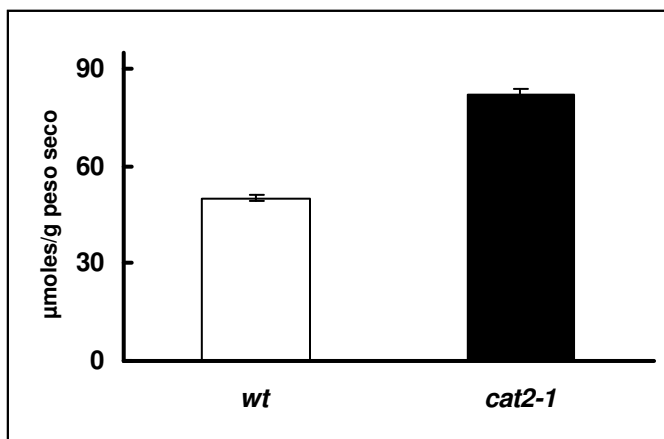


Figura 4.22. Acumulación de litio en plantas crecidas en invernadero en genotipo silvestre y mutante *cat2-1*. La medición se realiza tras dos días de irrigación con una solución 25 mM LiCl y con plantas de 3 semanas. Los valores son la media de 4 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

Sodio

Nuevamente se confirma la mayor acumulación de sodio tras dos días de irrigación con cloruro sódico 100 mM. El genotipo silvestre toma casi un 40% menos de sodio que el mutante. Los resultados fueron similares cuando se realizó el experimento en medio líquido (figura 4.23).

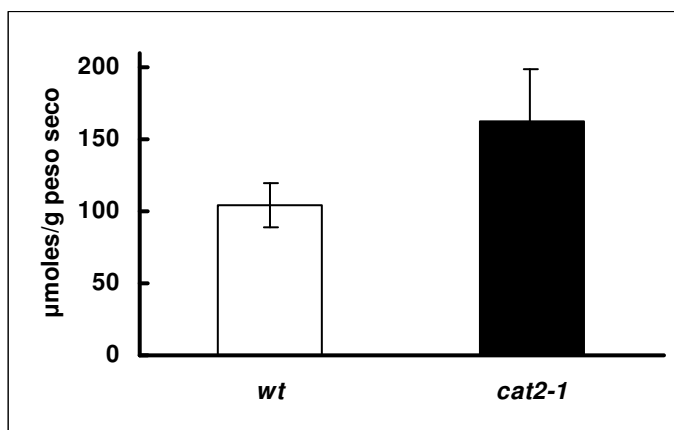


Figura 4.23. Acumulación de sodio en plantas crecidas en invernadero en genotipo silvestre y mutante *cat2-1*. La medición se realiza tras dos días de irrigación con una solución 100 mM NaCl y con plantas de 3 semanas. Los valores son la media de 4 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

Norespermidina

Los resultados para la acumulación de la poliamina norespermidina fueron idénticos que para los otros cationes tóxicos, el genotipo silvestre acumula alrededor de un 60% de norespermidina de lo que lo hace el mutante *cat2-1*. En este caso el experimento únicamente se realizó en medio líquido (figura 4.24).

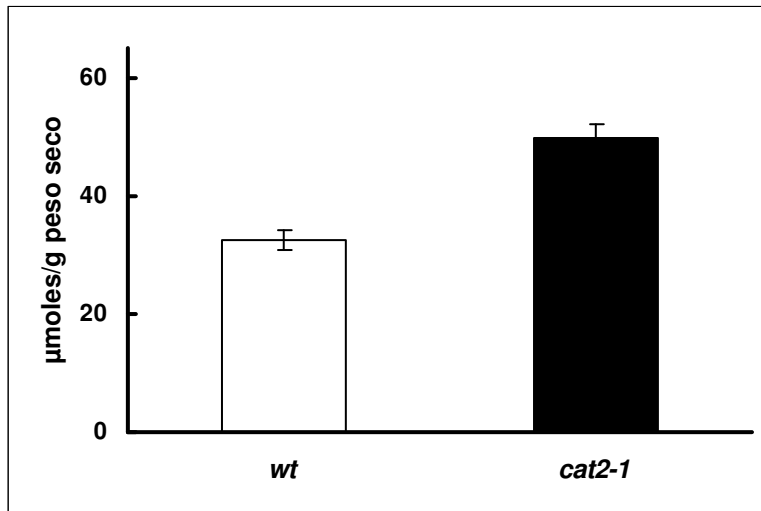


Figura 4.24. Acumulación de norespermidina en plantas crecidas en medio líquido en genotipo silvestre y mutante *cat2-1*. La medición se realiza tras dos días de incubación con una solución 2,4 mM Ne y con plantas de 3 semanas. Los valores son la media de 4 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

Potasio

Los resultados confirman que el bloqueo de entrada de potasio por agua oxigenada no sólo se presenta a nivel de células oclusivas, sino que parece un hecho generalizado en toda la planta (figura 4.25).

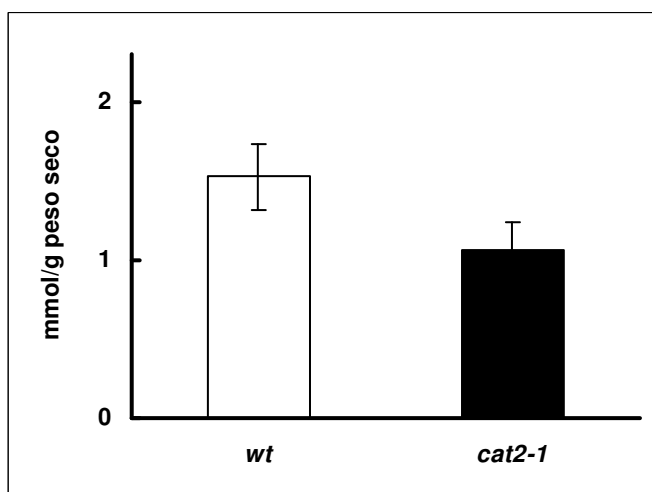


Figura 4.25. Niveles de potasio en plantas crecidas en invernadero en genotipo silvestre y mutante *cat2-1*. La medición se realizó con plantas de 3 semanas. Los valores son la media de 4 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

4.7 Fenotipos asociados al cambio de homeostasis iónica.

4.7.1 Sensibilidad a noespermidina

Tras los resultados obtenidos en lo que hemos podido comprobar que el mutante *cat2-1* tiene una mayor toma a tiempos cortos y una mayor acumulación de noespermidina, era obvio el experimento de comprobar la probable sensibilidad del mutante al crecimiento con esta sustancia.

Se realizaron dos ensayos en la germinación con noespermidina 2 mM. En el primero se comprobó a los 3 días la emergencia de la radícula y en el segundo se comprobó a los 5 días el despliegue de los cotiledones. En ambos experimentos el mutante resultó ser sensible a esta poliamina (figura 4.26).

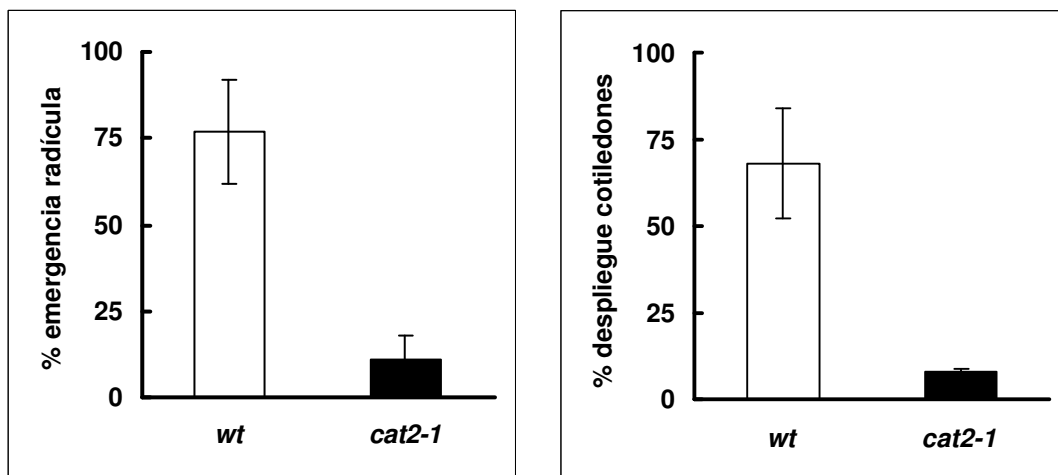


Figura 4.26. Germinación del genotipo silvestre y del mutante en un medio con 2mM noespermidina. A) Emergencia de radícula tras tres días B) despliegue de cotiledones tras 5 días.

4.7.2 Tolerancia a cloruro de litio

Sin ninguna duda, este fue el fenotipo más inesperado, ya que además de que se considera al litio como un probable generador de estrés oxidativo, el mutante *cat2-1* toma y acumula más litio como hemos podido comprobar.

El mutante presentó una mayor germinación tanto a 15 mM como a 20 mM LiCl (figura 4.27). Además a concentraciones que no inhibían la germinación (10 mM) presentó un desarrollo vegetativo superior al del genotipo silvestre. Como se puede

observar en la figura 4.28 tanto el genotipo silvestre como la complementación del mutante tuvieron un desarrollo vegetativo menor con un medio 15 mM LiCl.

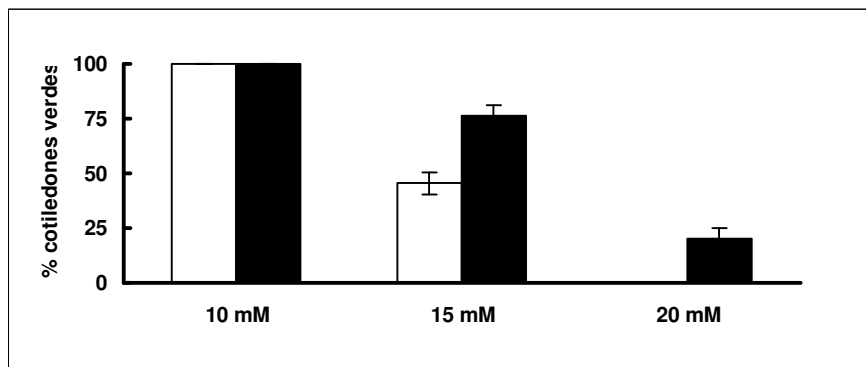


Figura 4.27. Germinación del genotipo silvestre (barras blancas) y del mutante *cat2-1* (barras negras) tras 5 días en un medio que contiene las concentraciones indicadas de cloruro de litio. Los valores son la media de 4 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

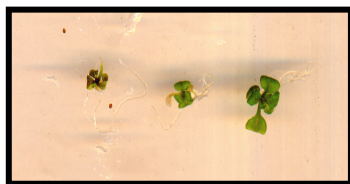


Figura 4.28. Crecimiento del mutante *cat2-1* (derecha), del genotipo silvestre (medio) y de la complementación del mutante (izquierda) en un medio MS suplementado con 15 mM LiCl tras 10 diez días.

4.8 Resultados explicativos de la tolerancia al litio en *cat 2-1*.

Las siguientes líneas van dedicadas a las posibles explicaciones de esta inesperada tolerancia del mutante *cat2-1* al cloruro de litio. Estos experimentos parten de la observación de que el litio induce la producción de etileno, hormona inhibitoria para el crecimiento (Naranjo *et al.*, 2003).

4.8.1 Producción de etileno.

Se midió la producción de etileno tras tratamiento con cloruro de litio en un genotipo silvestre y en el mutante *cat2-1* y de acuerdo con los resultados obtenidos se llegó a la conclusión que el tratamiento con litio hace aumentar la producción de etileno, así como que la mutación en *CAT2* hace disminuirla (figura 4.29).

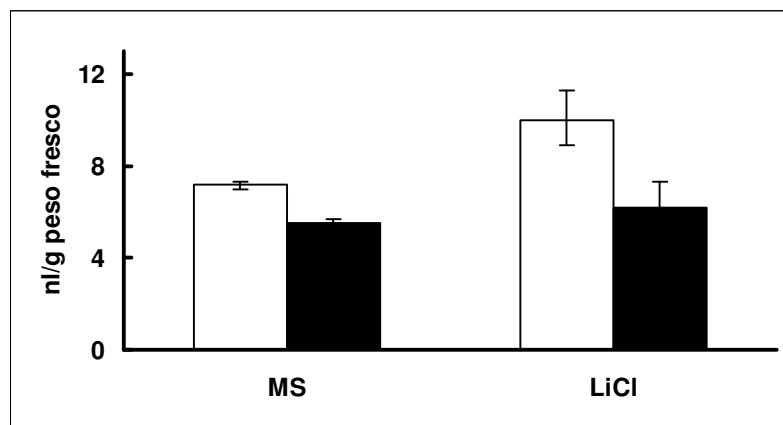


Figura 4.29. Producción de etileno durante 2,5 h en plántulas de 10 días del genotipo silvestre (barras blancas) y del mutante *cat2-1* (barras negras) después de 1 día creciendo en medio MS o en 15 mM LiCl según el caso. Los valores son la media de 4 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

4.8.2 Insensibilidad a etileno.

Se realizaron 4 pruebas para demostrar la insensibilidad del mutante *cat2-1* al etileno:

Crecimiento en atmósfera de etileno.

Se crecieron plántulas desde semilla durante 10 días en atmósfera de etileno 50 ppm. Para cuantificar los resultados se comparó el peso de un grupo de plantas crecidas en MS con el peso alcanzado tras tratamiento en atmósfera de etileno y se calculó el peso relativo respecto al alcanzado en MS. En el caso del genotipo silvestre el alcanzado por 5 plántulas crecidas en MS fue de 20,3 mg y el de 5 plántulas mutantes fue de 13,6 mg (figura 4.30).

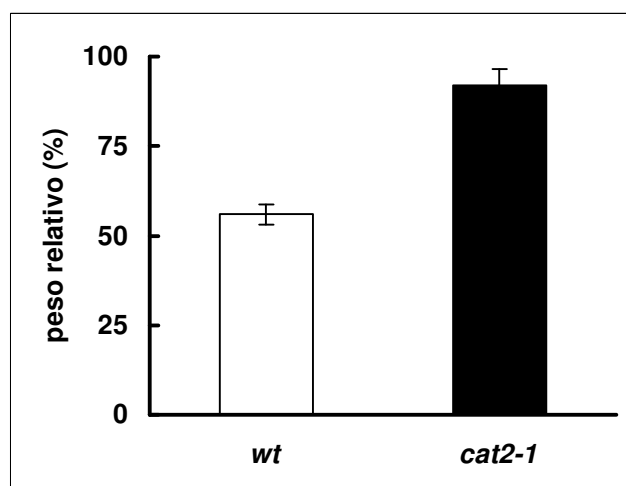


Figura 4.30. Peso relativo respecto al de MS tras crecimiento en atmósfera de etileno 50 ppm en plantas de 10 días del genotipo silvestre (barra blanca) y del mutante *cat2-1* (barra negra). Los valores son la media de 6 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

Se observa una clara inhibición del crecimiento en el genotipo silvestre, que llega a perder casi el 50% del peso. En cambio, en el mutante la inhibición en peso es prácticamente nula, aunque se aprecia un cambio drástico de morfología.

Crecimiento en ACC.

Se crecieron las plántulas utilizando un medio que contenía 50 μM de ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato), un precursor del etileno. Con ello se consiguió el mismo resultado, una fuerte inhibición del crecimiento en el caso del genotipo silvestre y no en el caso del mutante *cat2-1*. Para la cuantificación se siguieron los mismos parámetros que en el apartado de crecimiento en atmósfera de etileno (figura 4.31).

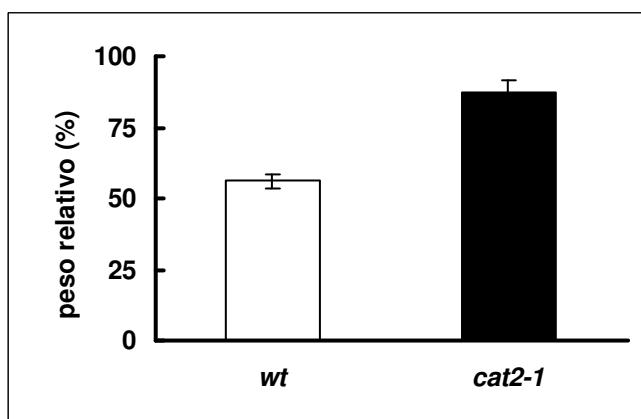


Figura 4.31. Peso relativo respecto al de MS tras crecimiento en un medio 50 μM ACC en plantas de 10 días del genotipo silvestre (barra blanca) y del mutante *cat2-1* (barra negra). Los valores son la media de 13 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

Para comprobar la hipótesis de que el mutante *cat2-1* es tolerante a litio por ser insensible a la inhibición por etileno (Dangl *et al.*, 2000) se comprobó que la adición exógena de peróxido de hidrógeno a un medio 20 micromolar ACC en plantas de genotipo silvestre, hace que esta sustancia presente menos toxicidad, recuperándose de esta forma parte del desarrollo de la planta (figura 4.32 y 4.33).

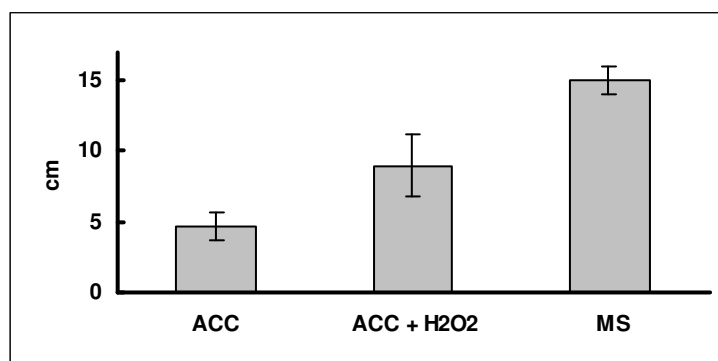


Figura 4.32. Longitud de la raíz tras 1 semana de crecimiento de un genotipo silvestre en un medio 20 micromolar ACC, 20 micromolar ACC más 1 micromolar peróxido de hidrógeno y en MS. Se realizaron 5 repeticiones del experimento quedando representadas las desviaciones estándar por barras verticales.

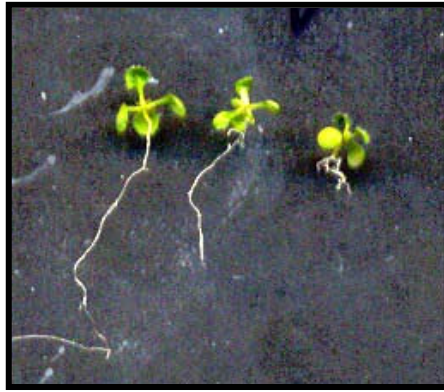


Figura 4.33. Longitud de la raíz tras 1 semana de crecimiento de plantas representativas de un genotipo silvestre en un 1 medio MS suplementado con 20 micromolar ACC (derecha), MS suplementado con 20 micromolar más 1 micromolar peróxido de hidrógeno (medio) y MS (izquierda).

Triple respuesta.

Los mutantes insensibles a etileno presentan un fenotipo característico de defecto a la triple respuesta (Guzmán y Ecker, 1990).

Las semillas se germinaron en un medio que contenía 10 μM de ACC en oscuridad para observar el fenómeno de la triple respuesta (gancho apical, engrosamiento y acortamiento del hipocotilo e inhibición radicular) en el mutante. Como se puede observar en la figura 4.34, el mutante *cat2-1* presentó un fenotipo intermedio entre el genotipo silvestre y el mutante totalmente insensible a etileno *etr1-1*. Es decir, se observa una menor inhibición de la raíz y del hipocotilo. Es por ello que podemos concluir que el mutante *cat2-1* es un mutante parcialmente insensible a la hormona etileno. Para cuantificar los resultados se midió la longitud de los hipocotilos en los tres genotipos (figura 4.35). Este resultado se reprodujo al sustituir el ACC por una atmósfera de etileno 50 ppm.

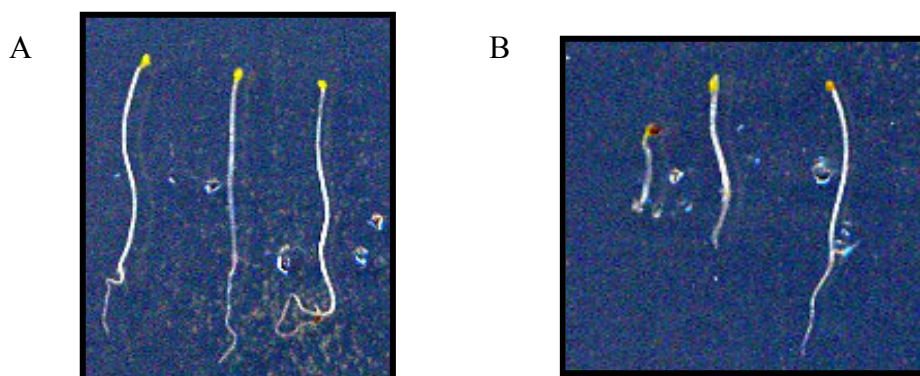


Figura 4.34. Crecimiento en oscuridad en un medio MS (A) y en oscuridad y con un medio MS suplementado con 10 μM de ACC (B) de un genotipo silvestre (izquierda) del mutante *cat2-1* (centro) y del mutante *etr1-1* (derecha) en plántulas de 6 días.

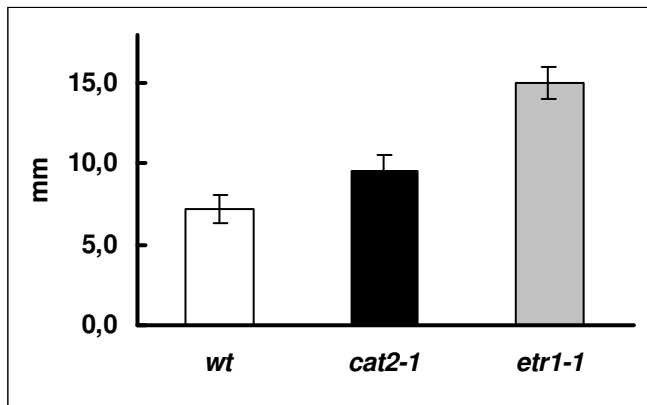


Figura 4.35. Longitud de hipocotilo en plántulas crecidas en oscuridad en un medio con 50 μ M ACC durante 6 días. Los valores son la media de 10 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

Expresión en genes inducidos por etileno.

Además de la inhibición de crecimiento, el etileno regula la expresión de muchos genes de plantas (Van Zhong y Burns, 2003). Comprobamos la expresión en dos genes típicamente inducidos por etileno: EBP/ERF72 (At3g16770) y PR4/prehevein (At3g04720). Se demostró que la inducción de ambos genes tras tratamiento con etileno es menor en el mutante *cat2-1* que en el genotipo silvestre, pero no indetectable como en el caso del mutante *etr1-1* (figura 4.36).

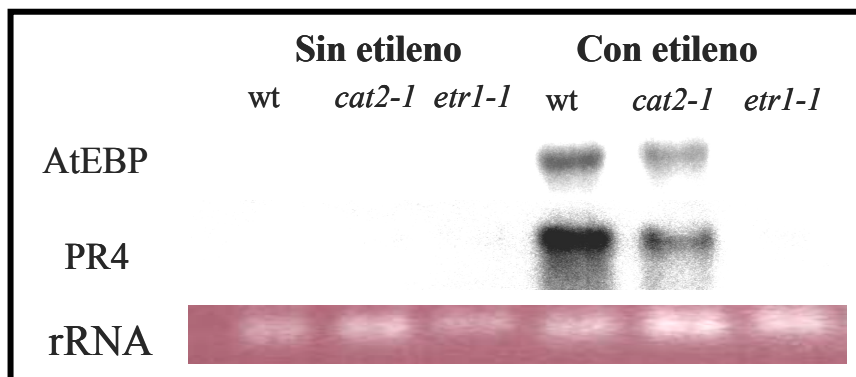


Figura 4.36. Análisis Northern de los genes EBP/ERF72 y PR4/prehevein en ausencia y presencia de etileno 50 ppm. Las plántulas del genotipo silvestre y de los mutantes *cat2-1* y *etr1-1* fueron crecidas durante 2 semanas y después tratadas durante dos días con o sin etileno como se indica. La expresión de PR4 y EBP tras tratamiento con etileno fue aproximadamente dos veces mayor en el genotipo silvestre que en el mutante *cat2-1*.

4.9 La toxicidad del litio está mediada por etileno.

Nuestra hipótesis por tanto, es que el mutante *cat2-1* es resistente a litio debido a su menor producción de etileno tras tratamiento y a la parcial insensibilidad que tiene a esta hormona. Para comprobar hasta qué punto la toxicidad del litio se debe a la producción de etileno realizamos dos experimentos.

El primero consistió en crecer las plántulas en un medio con cloruro de litio y con un inhibidor de la síntesis de etileno. En este caso se debe observar una recuperación parcial del crecimiento. El segundo experimento consistió en comprobar el crecimiento en litio de mutantes insensibles a etileno, para corroborar que están menos afectados que el genotipo silvestre.

Crecimiento con ácido 2-aminoisobutirico (AIB).

Las plántulas crecieron durante 10 días en medio MS, y medio MS suplementado con AIB (inhibidor de la síntesis de etileno) y/o LiCl 10 mM como se indica en la figura 4.37. Como se esperaba al crecer las plántulas con el inhibidor AIB se recupera el crecimiento respecto al obtenido con litio, lo cual indica que el inhibidor está frenando la toxicidad del litio al bloquear la síntesis de etileno. Por otra parte, el crecimiento con AIB y sin litio no mejoró el crecimiento obtenido sólo con MS.

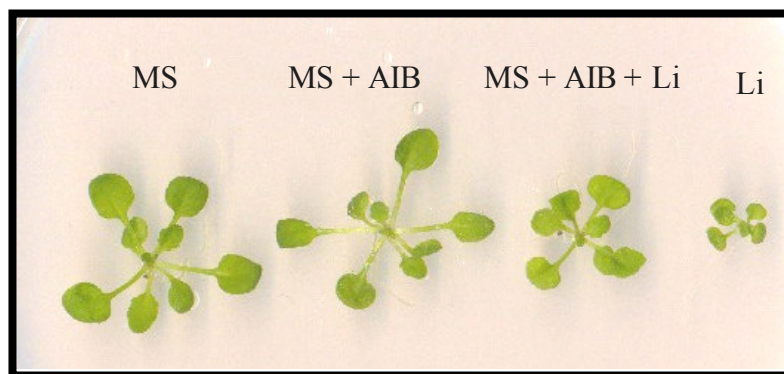


Figura 4.37. Crecimiento del genotipo silvestre en medio MS y suplementado con 5 mM AIB y/o 10 mM LiCl, tal como se indica. Las plantas de 10 días son representativas de cada tratamiento.

Por otra parte se realizó un experimento utilizando sodio y noespermidina e intentando recuperar el crecimiento utilizando AIB. Tanto para los experimentos con noespermidina como para los de sodio no se recuperó el crecimiento del obtenido con los mencionados cationes tóxicos de forma aislada.

Crecimiento de mutantes insensibles a etileno en cloruro de litio

Se realizaron dos experimentos:

En el primero, se cuantificó la germinación del mutante *etr1-1* con cloruro de litio 25 mM. Se observa que la germinación del mutante es cercana al 80%, y en el genotipo silvestre no alcanza el 25%. Concluimos por tanto, que el mutante insensible *etr1-1* es tolerante al cloruro de litio (figura 4.38 y 4.39).

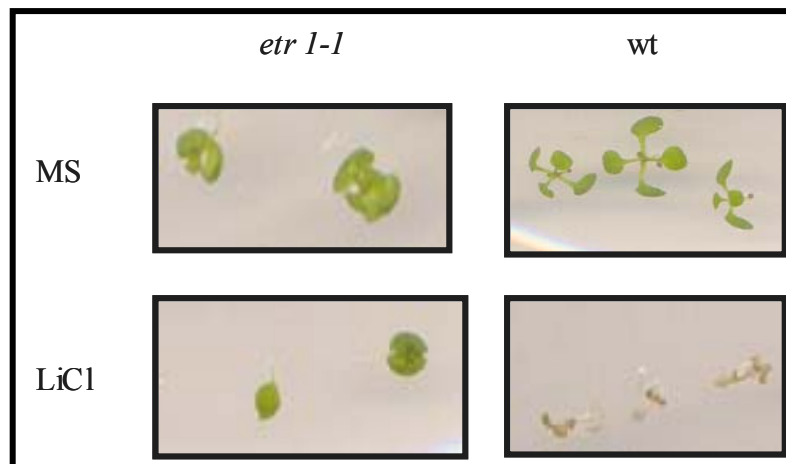


Figura 4.38. Crecimiento durante 7 días del mutante *etr1-1* y del genotipo silvestre en medio MS y suplementado con cloruro de litio 25mM.

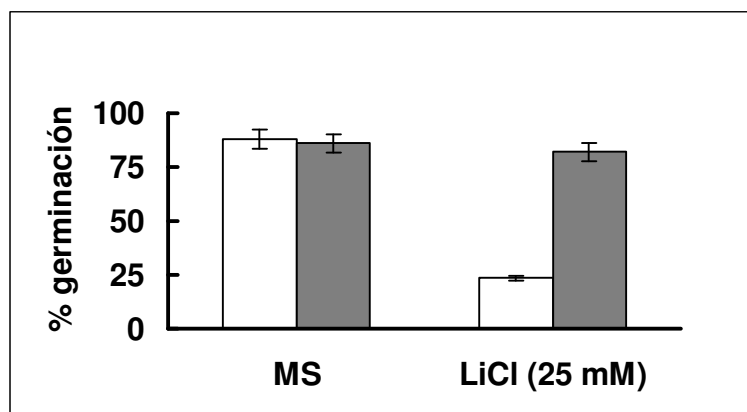


Figura 4.39. Porcentaje de germinación en MS y en LiCl 25 mM del genotipo silvestre (barras blancas) y del mutante *etr1-1* (barras grises) tras una semana. Los valores son la media de 10 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

En el segundo (representado en la figura 4.40) se cuantificó la pérdida de peso tras germinación en un medio 15 mM LiCl comparándolo con el crecimiento en MS y

tras diez días desde la germinación. Se utiliza para el experimento un genotipo silvestre y dos mutantes insensibles a etileno *etr1-1* y *ein3-3*. Los dos mutantes presentan una menor pérdida de peso, con lo cual se puede concluir que ambos son más tolerantes al litio que el genotipo silvestre.

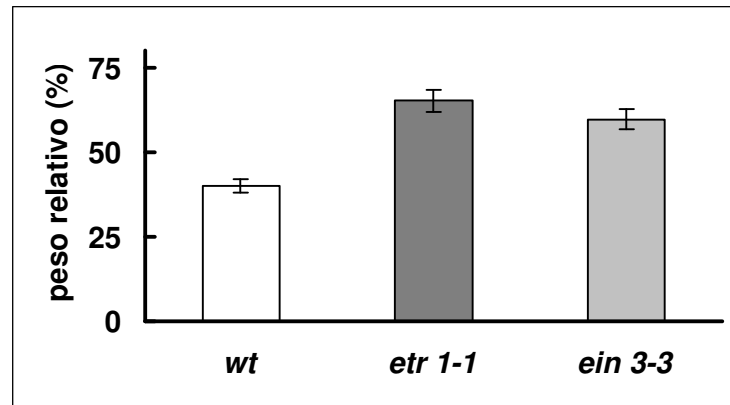


Figura 4.40. Peso relativo respecto al de MS tras crecimiento en cloruro de litio 10 mM de dos mutantes insensibles a etileno y un control. Las plantas crecieron durante 10 días. Los valores son la media de 10 determinaciones, estando representada la desviación estándar por barras verticales.

4.10 Sensibilidad a estrés oxidativo de mutantes insensibles a etileno.

Para comprobar que la parcial tolerancia a litio que presentan los mutantes insensibles a etileno no se trata de una respuesta general a estrés abiótico, se comprobó el crecimiento de estos mutantes con medios 100 mM NaCl y 2 mM norespermidina. Los resultados fueron concluyentes, ya que no sólo no presentaron resistencia, sino todo lo contrario, fueron sensibles a ambos estreses (figura 4.41).

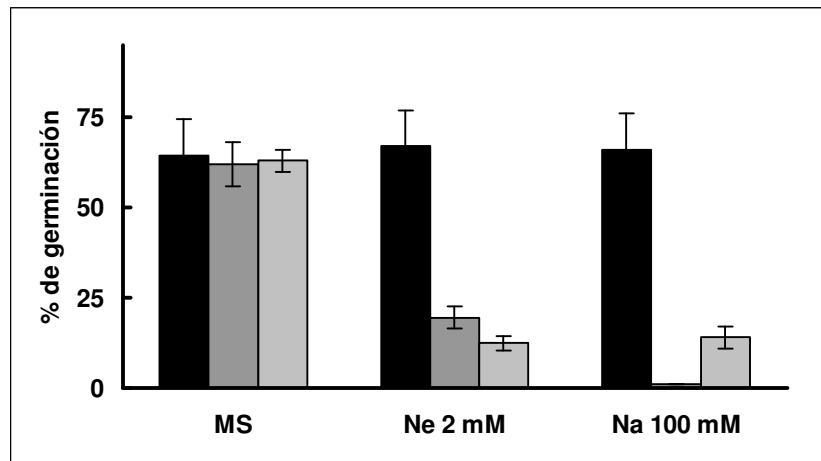


Figura 4.41. Germinación a los 7 días del genotipo silvestre (negro), del mutante *etr1-1* (gris oscuro) y del mutante *ein 2-5* (gris claro) en medios con noespermidina y cloruro sódico. El experimento fue repetido 3 veces y la desviación estándar queda representada por barras verticales.

4.11 Sensibilidad a ABA y papel en el cierre de estomas.

Un fenómeno estudiado por diferentes trabajos es el papel que tiene el peróxido de hidrógeno en el cierre de estomas mediado por el ácido abscísico (Neill *et al*, 2002). Es por ello, que nos embarcamos en un experimento en el cual se comprobó la tolerancia del mutante *cat2-1* a sequía dejando la planta sin regar durante 10 días.

Los resultados fueron concluyentes, el mutante *cat2-1* presenta una resistencia parcial a sequía, debido probablemente al cierre de estomas por la alta concentración de peróxido de hidrógeno en toda la planta y con ello en las células oclusivas de los estomas (figura 4.42).

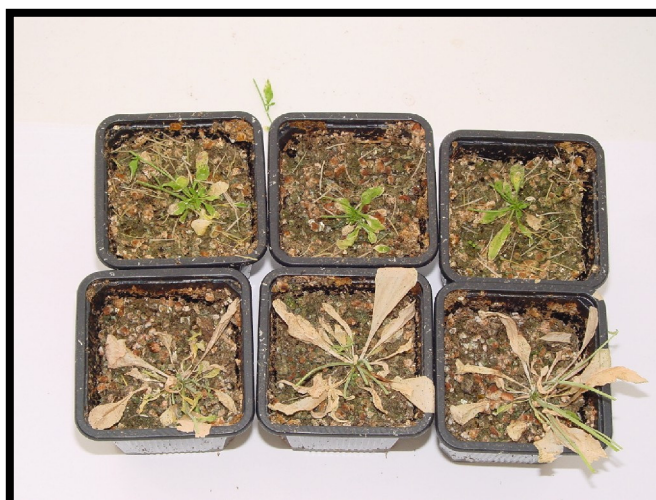


Figura 4.42. Tolerancia a sequía del mutante *cat2-1* (fila superior) frente al genotipo silvestre (fila inferior). Las plantas se crecieron durante 3 semanas y a partir de ese momento se dejaron de regar durante 10 días.

Ante estos resultados y conociendo la capacidad que tiene el peróxido de hidrógeno para inhibir reversiblemente a la la fosfatasa 2C ABI1, reguladora negativa de la señalización de ABA, (Merlot *et al.*, 2001, Meinhard and Grill, 2001), se pensó en comprobar la supuesta sensibilidad que debería tener el mutante *cat2-1* a esta hormona.

Se realizó un ensayo con diferentes concentraciones de ABA y tal como se pronosticó, el mutante *cat2-1* presenta una marcada sensibilidad en todas ellas (figura 4.43 y 4.44).

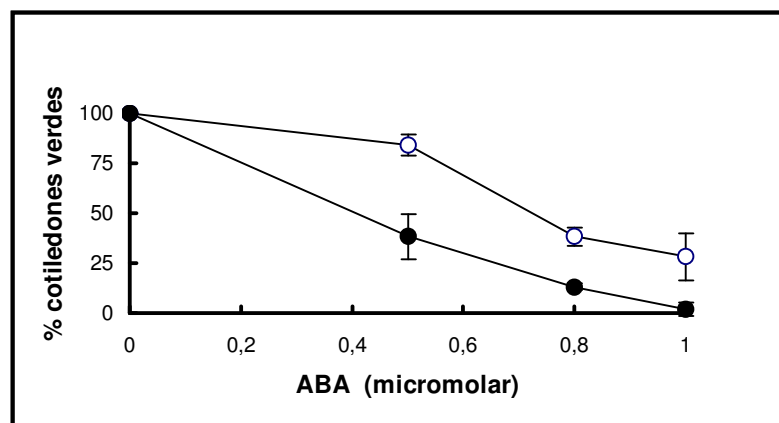


Figura 4.43. Germinación del mutante *cat2-1* (círculos negros) y del genotipo silvestre (círculos blancos) en un medio con las concentraciones indicadas de ABA. La germinación se evaluó a los 6 días. Se realizaron 3 repeticiones quedando representadas las desviaciones estándar por barras verticales.

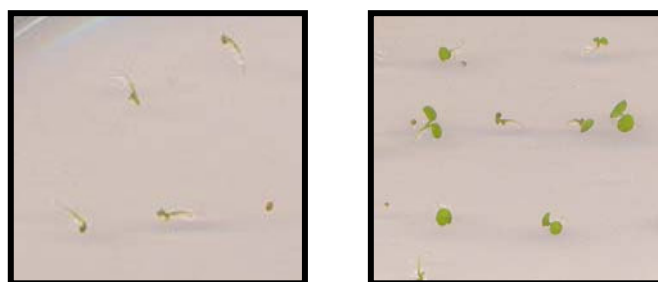


Figura 4.44. Germinación a los 6 días del mutante *cat2-1* (izquierda) y del genotipo silvestre (derecha) en un medio MS suplementado con 0,5 micromolar ABA.

4.12 Sobreexpresión del gen *CAT2*.

Se realizó la sobreexpresión del gen *CAT2* con el promotor constitutivo 35S en un genotipo silvestre y se obtuvieron 6 líneas diferentes. Tras realizar un análisis Northern (figura 4.45) se comprobó que en 4 líneas se produjo una clara sobreexpresión (en L1 de unas 10 veces, en L2 de unas 5 veces, en L3 de unas 15 veces y en L4 de unas 25 veces.). En las otras dos líneas apareció el extraño fenómeno de la cosupresión en la que la expresión disminuye drásticamente como si fuera el caso de una construcción antisentido. Estas líneas fueron L5 y L6 con una represión de 6 y 4 veces respectivamente.

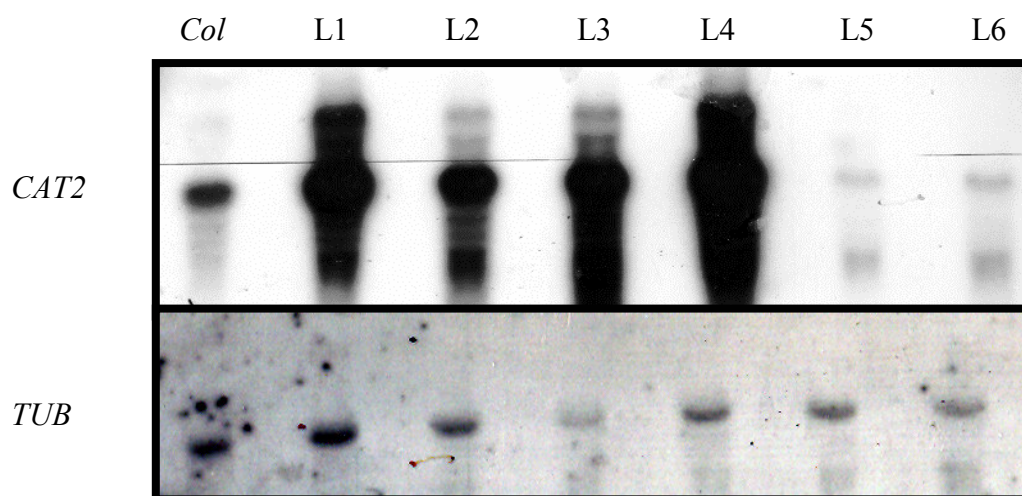


Figura 4.45. Análisis Northern de las diferentes líneas obtenidas de sobreexpresión del gen *CAT2* en un genotipo silvestre. La membrana contiene 20 μ g de RNA por muestra que fue hibridada con una sonda específica para el gen 2 de catalasa de *Arabidopsis*. El control de carga de RNA fue determinado mediante la hibridación con una sonda específica para el gen de la β -tubulina.

Las plantas en las cuales se produjo sobreexpresión se observó un fenotipo de planta más robusta y con mayor producción de semilla. En cambio, las plantas en que se produjo represión fenocopian al mutante *cat2-1*. La descendencia de las líneas con sobreexpresión se intentaron utilizar para comprobar la tolerancia a distintos estreses abióticos, pero fue imposible el análisis al aparecer aleatoriamente plantas con represión total del transcrito y fenocopiando a *cat2-1*. El único fenotipo comprobado fue la resistencia que presentan a peróxido de hidrógeno de líneas con sobreexpresión y excluyendo las plántulas que fenocopiaran en germinación a *cat2-1* (figura 4.46).

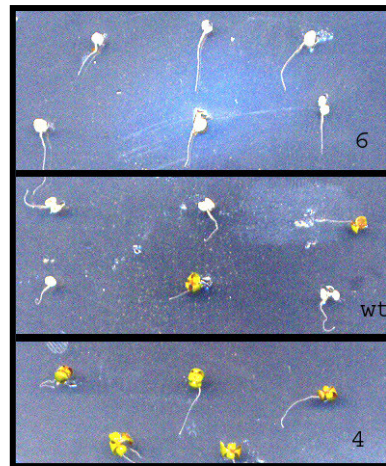


Figura 4.46. Crecimiento en medio MS suplementado con 20 mM peróxido de hidrógeno durante 4 días plántulas de la línea 6 (6), genotipo silvestre (wt) y de la línea 4 (4). Las plantas previamente crecieron en MS durante 7 días

4.13 Análisis transcriptómico en el mutante *cat2-1*.

Los fenotipos del mutante *cat2-1*, como el reducido crecimiento, la alteración de la homeostasis iónica o la insensibilidad al etileno, podrían ser explicados por cambios en la expresión génica resultantes de la acumulación continua de agua oxigenada. Por otra parte, esta acumulación podría directamente modificar proteínas oxidándolas dando lugar a los citados fenotipos.

Para identificar genes diferencialmente regulados por la acumulación de agua oxigenada, como consecuencia de la mutación *cat2-1*, se comparó el perfil de expresión de *cat2-1* y del genotipo silvestre, usando una micromatriz de oligos de la Universidad de Arizona (<http://www.ag.arizona.edu/microarray/>). Se realizaron tres réplicas biológicas independientes del mutante *cat2-1* y del genotipo silvestre, crecidas sin ningún tipo de estrés. Se calculó la media del cambio de expresión de las tres réplicas y con un factor de 1,6 veces de cambio de expresión se identificó 321 genes diferencialmente sobrepresados y 12 genes diferencialmente reprimidos en el mutante *cat2-1* comparados con el genotipo silvestre.

Los resultados más importantes están mostrados en la **tabla 1** (genes sobreexpresados más de 3 veces en *cat2-1*) y en la **tabla 2** (genes reprimidos en *cat2-1*). Las familias de genes más inducidas en el mutante son las glutatión S-transferasas (GST U1, U4 y U8; Wagner *et al.*, 2002), defensinas (PDF 1.1 y 1.2a-c), inhibidores de proteasas, citocromos P450, kinasas y dedos de zinc. Por otra parte, los genes más reprimidos en el mutante codifican 6 proteínas de respuesta a auxinas (SAUR/AUX/IAA). Para la validación de la micromatriz se realizaron dos *nothorns* que

confirmaron la sobreexpresión de la defensina PDF 1.2a y de la glutatión S-transferasa U10 en el mutante *cat2-1*. Para la realización de este experimento se utilizaron unas sondas suministradas por el laboratorio de Pablo Vera (IBMCP).

Tabla 1. Genes inducidos en el mutante *cat2-1* respecto al genotipo silvestre bajo crecimiento sin estrés. Sólo los genes con cocientes *cat2/wt* iguales o mayores a 3 han sido presentados.

TAIR code	Anotación génica	Cociente (<i>cat2/wt</i>)
DEFENSA		
At3g22600	protease inhibitor	8,58
At5g44420	plant defensin (PDF1.2a)	8,03
At2g29490	glutathione S-transferase (GST U1)	7,83
At1g75830	plant defensin (PDF1.1)	6,51
At2g43510	trypsin inhibitor	5,81
At1g45145	thioredoxin H-type 5	5,55
At4g12490	protease inhibitor	5,23
At2g29460	glutathione S-transferase (GST U4)	5,17
At5g44430	plant defensin (PDF1.2c)	4,63
At5g43580	protease inhibitor	4,46
At3g09940	monodehydroascorbate reductase	4,3
At2g26020	plant defensin (PDF1.2b)	4,16
At3g09270	glutathione S-transferase (GST U8)	3,77
At1g72900	disease resistance protein (TIR-NBS class)	3,44
At4g12500	protease inhibitor	3,41
At5g38900	DSBA oxidoreductase family protein	3,35
At1g66090	disease resistance protein (TIR-NBS class)	3,35
At4g12480	protease inhibitor	3,33
At3g53980	protease inhibitor	3,24
At3g53980	protease inhibitor	3,11
At1g74590	glutathione S-transferase (GST U10)	3,04
At1g57630	disease resistance protein (TIR class)	3,04
METABOLISMO		
At2g29350	tropinone reductase	8,53
At4g34135	UDP-glucosyl transferase	5,45
At5g20960	aldehyde oxidase 1 (AAO1)	5,22
At3g26830	cytochrome P450 71B15	5,12
At3g60140	glycosyl hydrolase	4,63
At3g54150	embryo-abundant protein-related	4,58
At1g61800	glucose-6-phosphate/phosphate translocator	4,42
At1g67980	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	4,2
At1g32350	alternative oxidase	4,06
At3g44300	nitrilase 2 (NIT2)	4,05
At2g15480	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase	3,48
At1g60730	aldo/keto reductase	3,45
At4g37370	cytochrome P450	3,34
At4g13310	cytochrome P450 71A20	3,31
At1g33030	O-methyltransferase	3,22
At2g24850	aminotransferase	3,12
At2g15390	xyloglucan fucosyltransferase	3,1
At2g30750	cytochrome P450 71A12	3,08
At3g22370	alternative oxidase 1a, mitochondrial (AOX1A)	3,08
At5g22860	serine carboxypeptidase S28	3,02

CALCIO		
At3g01830	calmodulin-related protein	4,31
At5g48410	glutamate receptor	3,62
At1g21550	calcium-binding protein	3,15
At3g63380	calcium-transporting ATPase	3,05
KINASAS		
At2g19190	light-responsive receptor protein kinase	5,21
At5g67080	protein kinase	4,65
At4g18250	receptor serine/threonine kinase	4,17
At4g23190	protein kinase	3,59
At1g79680	wall-associated kinase	3,54
At5g01540	lectin protein kinase	3,22
At3g59700	lectin protein kinase	3,21
At5g25930	leucine-rich repeat family protein / protein kinase	3,16
At4g04490	protein kinase	3,1
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN		
At3g28210	zinc finger (AN1-like)	4,07
At2g41835	zinc finger (C2H2 type, AN1-like)	3,96
At5g27420	zinc finger (C3HC4-type RING finger)	3,84
At4g11370	zinc finger (C3HC4-type RING finger)	3,64
At5g18270	no apical meristem (NAM)	3,29
At3g04070	no apical meristem (NAM)	3,27
At5g13080	WRKY family transcription factor	3,06
MISCELÁNEA		
At1g26400	FAD-binding domain-containing protein	6,21
At1g26380	FAD-binding domain-containing protein	6,04
At5g62150	peptidoglycan-binding LysM domain	5,88
At4g18430	Ras-related GTP-binding protein	4,95
At2g26400	acireductone dioxygenase (ARD/ARD')	4,3
At2g26560	patatin	4,11
At4g15610	integral membrane family protein	3,8
At1g26420	FAD-binding domain-containing protein	3,73
At4g20860	FAD-binding domain	3,7
At3g26500	leucine-rich repeat family protein	3,56
At1g66700	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase	3,52
At5g66640	LIM domain-containing protein-related	3,43
At1g26390	FAD-binding domain-containing protein	3,33
At4g23700	cation/hydrogen exchanger, putative (CHX17)	3,24
At1g03850	glutaredoxin family protein	3,22
At2g04100	MATE efflux family protein	3,14
At5g54710	ankyrin repeat family protein	3,08
At2g02990	ribonuclease 1 (RNS1)	3,06
At4g01870	tolB protein-related	3,06
DESCONOCIDO		
At1g36640	expressed protein	6,72
At4g08555	expressed protein	6,32
At4g37290	expressed protein	5
At2g18680	expressed protein	4,55
At2g14777	hypothetical protein	4,53
At5g22545	expressed protein	4,24
At2g40095	expressed protein	4,01
At1g10585	expressed protein	3,98
At3g10320	expressed protein	3,93
At3g13950	expressed protein	3,92
At2g32190	expressed protein	3,85
At4g39670	expressed protein	3,82
At2g23270	expressed protein	3,23

Tabla 2. Genes reprimidos en el mutante *cat2-1* con respecto al genotipo silvestre bajo crecimiento sin estrés. Sólo los genes con cocientes *wt/cat2* iguales o mayores a 1,5 han sido representados. La baja represión de *CAT2* contrasta con los resultados de la figura 4.5 y podrían ser explicados por la hibridación cruzada que puede producir con otras catalasas.

TAIR code	Anotación génica	Cociente (<i>wt/cat2</i>)
At4g32280	auxin-responsive AUX/IAA	2,86
At5g18020	auxin-responsive protein	1,92
At4g35090	catalase 2	1,85
At5g18060	auxin-responsive protein	1,82
At5g18050	auxin-responsive protein	1,79
At5g18080	auxin-responsive protein	1,75
At5g18030	auxin-responsive protein	1,75
At5g57760	expressed protein	1,75
At3g44990	xyloglucan:xyloglucosyl transferase	1,75
At3g19850	phototropic-responsive NPH3	1,75
At3g02380	zinc finger protein CONSTANS-LIKE 2 (COL2)	1,7
At5g06530	ABC transporter family protein	1,54

Por último presentamos en la **tabla 3** un estudio comparativo entre los diferentes genes inducidos en el mutante *cat2-1* de nuestro estudio con los trabajos de Desikan *et al.*, 2001 en el que se estudia la expresión génica tras la adición de agua oxigenada a protoplastos de *Arabidopsis*, Davletova *et al.*, 2005 en el que se estudia la expresión génica en un mutante de ascorbato peroxidasa de *Arabidopsis* sometida a un leve estrés lumínico y Vandenabeele *et al.*, 2004 en el que se estudia la expresión génica de un mutante de catalasa sometido a un estrés lumínico.

Tabla3. Cuadro comparativo entre los diferentes genes inducidos en el presente trabajo (1), en el trabajo de Desikan *et al.*, 2001 (2), en el trabajo de Davletova *et al.*, 2004 (3) y en el trabajo de Vandenabeele *et al.*, 2004 (4). *Para el trabajo de Desikan *et al.*, 2001 se utiliza el número de EST suministrado por *Arabidopsis* Biological Resource Center (Ohio State University, Columbus).

Familia génica	1	2*	3	4
Inhibidores de proteasas	At3g22600 At4g12490	H36601	NO	At1g73260 At3g22600
Defensinas	At5g44420 At1g75830	NO	NO	NO
Glutación S-transferasa	At2g29490 At2g29460	R90669	At1g02920 At4g02520	NO
“disease resistance protein”	At1g72900 At1g66090	NO	NO	NO
Citocromos P450	At3g26830 At3g37370	N38687	NO	At2g45570 At2g30770

Familia génica	1	2	3	4
Alternativa oxidasa	At1g32350 At3g22370	NO	At3g22370	NO
“Calmodulin-related protein”	At3g01830	R30557	At3g01830 At5g26920 At3g50770	NO
“Calcium binding protein”	At1g21550	NO	At1g21550 At5g54490	NO
“Lectin protein kinase”	At5g01540 At3g59700	NO	At5g01540 At5g10530	NO
Protein kinasa	At5g 67080 At4g23190	H76238	At2g23200 At4g23150	NO
“Zinc finger”	At5g27420 At2g41835	T41722	At5g27420 At1g08050	NO
Factor de transcripción NAM	At5g18270 At3g04070	NO	At2g17040 AT1g34180	NO
Factor de transcripción WRKY	At5g13080	NO	At1g62300 At4g31800	NO
Proteínas con dominio de unión a FAD	At1g26400 At1g26380	NO	NO	NO
“Heat shock protein”	NO	R9801	At4g18880	At1g74310 At5g52640
“Mitogen-activated protein kinase”	NO	H36168	At2g01450	At3g45640 At1g01560

DISCUSIÓN

El principal objetivo de la tesis, como ya se ha comentado en apartados anteriores, fue el diseño de un modelo biológico en el cual se pudieran estudiar los efectos del peróxido de hidrógeno, también denominado agua oxigenada, tanto en su faceta oxidativa como en su función señalizadora. En nuestro modelo se estudiaron los efectos del agua oxigenada a través del mutante *cat2-1* de *Arabidopsis*, un mutante de pérdida de función de la isoforma 2 de la catalasa de la citada planta modelo.

Hasta la fecha existen 3 importantes estudios en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* similares al propuesto en esta tesis. El primero en realización fue el de Desikan *et al.*, (2001), en el cual se añade exógenamente peróxido de hidrógeno a protoplastos de *Arabidopsis*. Este estudio puso de manifiesto las dos facetas de esta molécula, ya que concluye tanto en su capacidad para inducir diferentes defensas antioxidantes como genes involucrados en la señalización. Se trata de un estudio pionero pero con serias limitaciones, ya que propone un modelo alejado de la realidad biológica al utilizar células aisladas de *Arabidopsis*, un choque puntual y exógeno de agua oxigenada, y únicamente presentan a estudio 11.000 genes (aproximadamente la mitad de los existentes en *Arabidopsis*). En nuestra tesis, en cambio, pretendemos diseñar un modelo en el que tengan cabida las respuestas tanto a nivel celular como a nivel de planta entera. También se pretende que el agua oxigenada sea producida de forma continua por el propio metabolismo de la planta en interacción con el medio externo. Por último, también realizamos un estudio más exhaustivo utilizando una micromatriz más completa, con 28964 transcritos codificantes de proteínas y 87 miRNAs.

El segundo estudio realizado por Davletova *et al.*, (2005) utiliza otra enzima fundamental en la eliminación del agua oxigenada en plantas, la ascorbato peroxidasa 1. Esta enzima difiere de la catalasa 2 en su localización celular, ya que se presenta en citosol mientras que la catalasa es peroxisomal, con lo que puede ser que las enzimas estén especializadas en la eliminación de peróxido de hidrógeno de distinta procedencia. También difieren en que la ascorbato peroxidasa necesita en su acción la presencia de ascorbato y un sistema completo para la regeneración de esta molécula. En cambio la catalasa actúa directamente dismutando el agua oxigenada sin la necesidad de oxidar ningún otro compuesto. Por todo ello, pensamos que en nuestro estudio deben existir tanto conclusiones semejantes, debido a que en ambos estudios se dificulta la eliminación del agua oxigenada, como diferencias significativas debido a todo lo comentado anteriormente.

El último estudio con similitudes al nuestro fue realizado por Vandenberg *et al.*, (2004) en el cual utiliza plantas antisentido de catalasa. Las principales diferencias con este trabajo son que nuestro estudio utiliza un mutante específico del gen 2 de la catalasa mientras el suyo utiliza plantas con una reducida expresión de las 3 catalasas de *Arabidopsis*. Además estos se centran en el estrés con altas intensidades de luz, mientras que nosotros intentamos abarcar otras condiciones de estrés.

A partir de las siguientes líneas discutiremos todos los apartados de la tesis, comentando las posibles conexiones entre los distintos resultados y las semejanzas o diferencias con otros trabajos realizados.

5.1 Aislamiento del mutante *cat2* de *Arabidopsis*.

La genética reversa, es decir aquella que comienza con un mutante en un gen que el investigador previamente conoce y se buscan fenotipos relacionados con la función de este gen, ha conferido una nueva visión a las investigaciones biológicas ya que permite estudiar las funciones de los genes directamente implicados en los procesos biológicos que se quieren estudiar. En la actualidad existen colecciones de mutantes en genes determinados, fáciles de aislar gracias a que están marcados con T-DNAs de secuencia conocida. Es decir, que con una simple PCR se puede llegar a determinar si un individuo es acigoto, heterocigoto u homocigoto para la mutación. La colección elegida para nuestro trabajo fue la del SALK INSTITUTE, se trata de una colección muy completa con 75143 de inserciones distintas en 25567 genes. Además presenta la facilidad de suministrar las semillas de los mutantes a través del NASC.

Nuestro trabajo pretende estudiar los efectos del agua oxigenada en *Arabidopsis*, para ello sólo teníamos que localizar una de las principales enzimas de la planta que detoxifiquen esta molécula y pedir el mutante al SALK INSTITUTE, a partir de ese momento comienza nuestro trabajo. El aislamiento del mutante homocigoto para la mutación *cat2*.

El diseño específico de los cebadores es un asunto primordial para el aislamiento del mutante, ya que las catalasas de *Arabidopsis* son especialmente semejantes entre sí. En caso de no hacer un diseño totalmente específico podría ocurrir que amplificáramos los genes de las otras catalasas sin desearlo. Como aparece en el apartado 4.1.1. realizamos un estudio exhaustivo de las posibles amplificaciones de las otras catalasas de *Arabidopsis* con los cebadores diseñados para *CAT2*.

Tras el aislamiento de los mutantes por PCR, se lleva a cabo una comprobación por “Southern Blot” (figura 4.4), un método de mayor complejidad pero exento de los habituales artefactos que suelen ocurrir tras una amplificación repetitiva de un gen en concreto. El “Southern Blot” confirmó que los dos individuos aislados por PCR eran homocigotos para la mutación.

5.2 Caracterización bioquímica del mutante *cat2-1*.

Como se detalla en los resultados se realizan dos ensayos bioquímicos. En el primero se mide la actividad catalasa de extractos de plantas mutantes y de plantas silvestres. La puesta a punto del ensayo contrajo dificultades en el punto de establecer una concentración adecuada de peróxido de hidrógeno, ya que una cantidad menor que la óptima presentaba problemas de sensibilidad, mientras que superior a la óptima produjo la aparición de burbujas de oxígeno que dificultaban la medición. Los resultados fueron los esperados ya que los extractos del mutante *cat2-1* presentan una reducción drástica en actividad catalasa en comparación con los extractos controles. Esta reducción fue mayor en hojas que en raíz. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de *CAT2* en la producción de la enzima catalasa en el sistema modelo de *Arabidopsis*, siendo más importante en hojas que en raíz (figura 4.6).

El segundo ensayo en el que se determinó la acumulación de peróxido de hidrógeno en plantas del mutante *cat2-1*, también presentó sus dificultades ya que en la literatura no se encuentran métodos cuantitativos totalmente fiables y reproducibles, por lo que optamos por utilizar un método sencillo pero cualitativo. El método consiste en una tinción con DAB, el cual reacciona químicamente con el peróxido de hidrógeno de la planta produciendo un depósito oscuro. Los resultados no fueron cuantitativos pero sí muy ilustrativos. En los controles sólo aparecieron las manchas negras en la zona de corte del peciolo y en los vasos que comunican con esta zona. En cambio en el mutante, aparece prácticamente toda la hoja con el color oscuro producto de la interacción, poniendo de manifiesto la poca capacidad del mutante en la eliminación del agua oxigenada (figura 4.7).

5.3 Complementación del mutante *cat2-1*.

La complementación del mutante es uno de los experimentos esenciales en la realización de la tesis pues nos proporciona un control básico en los fenotipos del mutante *cat2-1*.

La transformación de *Arabidopsis* mediante la infección de *Agrobacterium* es un proceso complicado que a menudo no se limita a la inserción de un T-DNA, sino que puede llegar a producir diferentes mutaciones independientes a la mencionada inserción. En el peor de los casos estas mutaciones pueden producir fenotipos, produciendo errores en la interpretación. Es por ello que se debe utilizar para todos los experimentos, el control de la complementación del mutante, ya que si se produce un fenotipo en el mutante, éste tiene que restablecerse con la planta complementada. En caso contrario, el fenotipo no será debido a la inserción sino a esas mutaciones independientes derivadas del proceso de infección.

En nuestro caso, todos los fenotipos observados en el mutante *cat2-1*, fueron restablecidos con las plantas transgénicas de nuestra construcción de complementación.

5.4 Caracterización fenotípica del mutante *cat2-1*.

5.4.1 Alteraciones morfológicas.

Todas las alteraciones morfológicas observadas en el mutante *cat2-1* son producto de forma directa o indirecta de su gran sensibilidad a estrés oxidativo. Esto pone de manifiesto la relevancia de *CAT2* en la defensa antioxidante de la planta *Arabidopsis*. Por ejemplo se observa una coloración más pálida debida esencialmente al incremento de estrés fotorrespiratorio que sufre la planta, que con el paso del tiempo pasan a ser manchas necróticas blanquecinas en las hojas más antiguas (figura 4.9). Estas manchas debidas a estrés oxidativo, también aparecen en los mutantes antisentido de catalasa en plantas de tabaco (Willekens *et al.*, 1997).

Por otra parte, existe una estrecha relación entre el crecimiento de la planta, estrés oxidativo y auxinas (Pasternak *et al*, 2005). Esta relación queda reflejada con nuestros resultados, ya que el mutante debido a su gran sensibilidad a estrés oxidativo y a un hipotético problema en la síntesis o respuesta de auxinas, según los resultados de la micromatriz, presenta un menor tamaño al del control tanto en plántula como en planta adulta (figura 4.8 y figura 4.9). En el mismo sentido, el adelanto de la floración

que presenta el mutante también es posible explicarlo por la sensibilidad del mutante a estrés oxidativo. El estudio de Kurepa *et al.*, (1998) ya pone de manifiesto la fina correlación entre tiempo de floración y la tolerancia a estrés oxidativa, los mutantes con una floración más tardía también son los que más toleran el estrés oxidativo.

Por último, el mutante presenta una raíz principal de mayor longitud pero con un menor número de raíces secundarias (figura 4.10). Este fenotipo nuevamente puede ser explicado por la alteración del mutante en auxinas y por su insensibilidad a etileno, ya que en un reciente estudio se ha puesto de manifiesto el papel fundamental que tiene el etileno como modulador de las células en división del meristemo de la raíz (Ortega-Matínez *et al.*, 2007).

5.4.2 Sensibilidad a estreses abióticos.

Este apartado podemos estructurarlo en dos partes, una primera en que probamos la sensibilidad del mutante *cat2-1* a diferentes estreses ya comprobados por otros estudios (Chamnonpol *et al.*, 1996; Vandenabeele *et al.*, 2004). Todos los fenotipos observados en nuestra tesis concuerdan con los trabajados realizados anteriormente. El mutante *cat2-1* presenta una marcada sensibilidad a peróxido de hidrógeno (figura 4.12 y figura 4.13), a estrés salino (figura 4.14) y a estrés lumínico (figura 4.15).

En la segunda parte se comprueban la sensibilidad del mutante *cat2-1* a estrés ácido (figura 4.16) y a estrés por congelación (figura 4.17), dos estreses hasta la fecha no estudiados en mutantes en catalasa, aunque probables generadores de estrés oxidativo.

En levadura se conoce que el estrés ácido produce un aumento en la expresión de la catalasa (Giannattasio *et al.*, 2005). La cuestión que planteamos es conocer si este aumento de expresión es simplemente un indicador celular de estrés o si realmente la catalasa es una enzima importante en la lucha contra el estrés ácido. Por ello planteamos el experimento de comprobar si el crecimiento del mutante *cat2-1* está más afectado que el de los controles ante un estrés ácido como es el del ácido acético. El menor tamaño del mutante en condiciones normales introdujo algunas dificultades en el análisis, con lo que tuvimos que calcular la pérdida de peso tras tratamiento teniendo en consideración el peso que alcanza en condiciones normales. El mutante *cat2-1* presenta una clara sensibilidad a estrés por ácido (figura 4.16), ya que tras tratamiento con 2 mM de ácido acético el mutante presenta una pérdida de peso cercana al 70%, mientras que en el

control sólo fue del 40%. Estos resultados apuntan por tanto, que el estrés por ácido de alguna manera produce estrés oxidativo.

El experimento de congelación se planteó por la aparente controversia que existe en la literatura en la cual encontramos que la catalasa es inducida en experimentos por frío (Mittler *et al.*, 2004), pero sin embargo, mutantes de catalasa en tabaco no parecen ser más susceptibles en estrés por frío (Willekens *et al.*, 1997). En los resultados de nuestro experimento, el mutante *cat2-1* presenta una marcada sensibilidad al estrés por congelación, para todas las exposiciones ensayadas. A tiempos cercanos a 20 minutos la planta mutante colapsa y no consigue rebrotar, y en cambio sí lo hacen los controles (figura 4.17).

5.5 *cat2-1* presenta una alteración de la homeostasis de iones.

Este estudio es pionero, ya que es el primero que intenta dilucidar si la homeostasis iónica es modificada por un cambio redox a nivel de planta entera. Existen numerosos trabajos que estudian la participación del agua oxigenada en el transporte de iones en las células oclusivas de los estomas. Por ejemplo, es conocido que el agua oxigenada inactiva los canales de entrada de potasio y activa los canales de calcio de la membrana plasmática de las células oclusivas. Se produce entonces un aumento en el potencial hídrico de las células oclusivas, lo que conlleva una salida del agua y un cierre del estoma (Neill *et al.*, 2002). Por tanto, nuestra intención es dilucidar si esto es un suceso aislado que sólo ocurre en los estomas de la planta o en cambio es un proceso generalizado para todas las células de las plantas.

Según nuestros resultados se trata de un fenómeno que ocurre a nivel de planta entera. De alguna manera, se produce una oxidación de alguno de los transportadores o de los canales de potasio que dificulta la entrada de potasio a la planta (figura 4.25). Curiosamente la mutación *cat2-1* provoca una mayor entrada de otros cationes como el litio (figura 4.18 y 4.22), el sodio (figura 4.19 y 4.23) y la norespermidina (figura 4.20).

Los mecanismos de toma de estos cationes no están todavía aclarados, pero parece que están involucrados canales no selectivos (White, 1999) incluyendo los CNGCs (Gobert *et al.*, 2006). Las tomas iniciales de cationes en las plántulas son debidas esencialmente a la toma que se produce en la raíz, mientras que la acumulación a tiempos largos (días) depende de la carga que se produce al xilema y su posterior translocación a la parte aérea. Los altos niveles de agua oxigenada en el mutante *cat2-1* parece que estimula ambos procesos, en el caso de litio, sodio y noespermidina, mientras que lo inhibe en el caso del potasio. Un posible mecanismo que explique estos efectos opuestos está basado en que al inhibirse el transporte de potasio por agua oxigenada aumentaría el potencial eléctrico de la membrana, lo que aumentaría la entrada en la planta de litio, sodio y noespermedina (Alejandro *et al.*, 2007).

5.6 Resultados explicativos de la tolerancia al litio en *cat 2-1*.

Debido a que el mutante *cat2-1* acumula más sodio, litio y noespermidina que el control silvestre, era esperado que fuera más sensible a estos cationes tóxicos. Realmente, el mutante es más sensible a NaCl (figura 4.14) y noespermidina (figura 4.26). Inesperadamente, el mutante *cat2-1* es más tolerante a litio (figura 4.27), a pesar de la mayor acumulación que presenta a este catión (figura 4.22). Este novedoso fenotipo además fue complementado por transformación con el gen *CAT2* (figura 4.28).

Para explicar la tolerancia planteamos la hipótesis de que el mutante *cat2-1* debería ser tolerante a alguno de los efectos tóxicos del litio. En células animales la diana más importante de la acción del litio es la inositol monofosfatasa, una enzima involucrada en la biosíntesis de inositol. Además los efectos del litio pueden ser contrarrestados por suplementación con inositol (Nahorski *et al.*, 1991). En levaduras, las inositol monofosfatasas son enzimas dispensables (López *et al.*, 1999), siendo la diana más importante de la toxicidad del litio la nucleotidasa Hal2. Esta enzima está involucrada en la asimilación de sulfato y los efectos del litio pueden ser contrarrestados por suplementación con metionina (Murguía *et al.*, 1995). Las plantas contienen ambos tipos de enzimas sensibles a litio (Gil-Mascarell *et al.*, 1999), aunque en este caso la diana más importante de la toxicidad del litio *in vivo* era desconocida. En *Arabidopsis*

las suplementaciones con inositol y metionina son incapaces de contrarrestar la toxicidad del litio, por lo que debe haber otras dianas de toxicidad.

El litio afecta a muchos procesos en plantas pero la inducción de la sintasa de ACC (Liang *et al.*, 1996) y el aumento de la producción de etileno (Naranjo *et al.*, 2003) son particularmente interesantes porque altas concentraciones de esta hormona tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento, además de promover la senescencia celular (Dangl *et al.*, 2000). Como se indica en la figura 4.29. la producción de etileno es incrementada tras tratamiento con litio y disminuida por la mutación *cat2-1*. En presencia de litio la producción de etileno es en el mutante un 30% menor que en los controles y esta disminución podría ser la responsable de su tolerancia a litio.

Otro factor que contribuye es la menor sensibilidad del mutante *cat2-1* a etileno. Como se observa en la figura 4.30 y 4.31 el etileno y su precursor el ACC inhiben el crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis*, además este efecto fue mucho menor en el mutante *cat2-1* (10-15% de reducción de crecimiento) que en plantas control (45% de reducción de crecimiento). Para comprobar la sensibilidad del mutante también se llevó a cabo el experimento denominado “triple respuesta” que consiste en crecer las plántulas en oscuridad y con una atmósfera de etileno o en su defecto un medio con ACC (figura 4.34). Uno de los parámetros a medir en este experimento es la inhibición de la elongación del hipocotilo (Guzmán y Ecker, 1990.). Por los resultados podemos concluir que existe una menor inhibición en el caso del mutante *cat2-1* que en el del control silvestre, aunque aún fue menor en el caso del mutante insensible a etileno *etr1-1* (Van Zhong and Burns, 2003). Para comprobar que el efecto tóxico del ACC es reducido por el aumento de peróxido de hidrógeno celular y no por otra particularidad del mutante *cat2-1*, se crecieron plántulas de *Arabidopsis* en medios con ACC y ACC más H₂O₂. Se comprobó que el crecimiento radicular empleando ACC más una pequeña concentración de H₂O₂ se recupera con respecto al crecimiento con sólo ACC (figura 4.33).

Por otra parte, se conoce que el etileno regula la expresión de muchos genes en plantas (Van Zhong and Burns, 2003.). En nuestro estudio se han comprobado dos genes típicamente inducidos por etileno: *EBP/ERF72* (At3g16770) y *PR4/pre-hevein* (At3g04720). La figura 4.36 ilustra que la inducción de estos dos genes tras exposición en atmósfera de etileno es menor en el mutante *cat2-1* (sobre un 50%) que en el caso del control silvestre. Aunque de nuevo se comprueba que no es un mutante totalmente insensible como lo es *etr1-1* (figura 4.36).

5.7 La toxicidad del litio está mediada por etileno.

La hipótesis de que la toxicidad del litio en *Arabidopsis* está mediada por un aumento en la producción de etileno está apoyado por 3 experimentos. El primero, muestra que el inhibidor de la biosíntesis de etileno denominado AIB (Guzmán y Ecker, 1990) ofrece una protección significativa contra el efecto inhibitorio del litio en el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* (figura 4.37). El segundo y el tercero muestran que los mutantes insensibles *etr1-1* y *ein3-3* (Etheridge *et al.*, 2006) son más tolerantes al crecimiento con litio que el control silvestre (figura 4.39 y 4.40).

Como conclusión, la tolerancia al litio del mutante *cat2-1* puede ser explicada por dos hechos. A) el mutante produce menos etileno y es menos sensible al etileno que el control silvestre. B) la toxicidad del litio está mediada por la inducción de la biosíntesis de etileno.

Además esta sensibilidad del mutante *cat2-1* podría explicar el menor número de raíces secundarias. Uno de los factores de transcripción que promueve el desarrollo lateral de raíces (NAC2) es activado por etileno (He *et al.*, 2005). El mecanismo de la inducción de la biosíntesis de etileno por litio es una incógnita, pero la inhibición de la inositol monofosfatasa y con ello la menor disponibilidad celular de inositol y calcio han sido propuestos como señales que inducen los genes ACS (Liang *et al.*, 1996).

5.8 Sensibilidad a ABA y papel en el cierre de estomas.

Uno de los fenómenos más estudiados en la biología de plantas es el mecanismo por el cual se produce el cierre de estomas. Existen multitud de factores involucrados en este proceso, pero sin duda uno de los más importantes es el que media el ABA a través del peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico. El modelo propone que el ABA dispara la producción de peróxido de hidrógeno via la NADPH oxidasa. Por último el peróxido de hidrógeno sería el encargado de inhibir los canales de entrada de potasio y activar los canales de calcio a través de ABI2 (Neill *et al.*, 2002). Nuestro experimento en concreto, intentó dilucidar si es necesaria la activación de la producción de agua oxigenada a partir de ABA, o en cambio es suficiente una alta concentración de agua oxigenada para producir el cierre de estomas. Las conclusiones son claras, el mutante *cat2-1* presenta una tolerancia a estrés hídrico aún siendo un mutante sensible a estrés oxidativo (figura

4.41), debido a la alta concentración de peróxido de hidrógeno que probablemente produce un mayor cierre de estomas y con ello la planta tiene una menor pérdida de agua.

Por otra parte se conoce que *ABII* codifica una proteína serina/treonina fosfatasa 2C (PP2C.). Este gen fue originalmente identificado en las mutaciones dominantes *abi1-1* y *abi2-1*, que reducen la respuesta de la planta al ácido abscísico. Sin embargo, mutantes recesivos de *ABII* presentan hipersensibilidad a ABA, lo que demuestra que la fosfatasa *ABII* es un regulador negativo de la señal de ABA (Merlot, 2001)

La caracterización de la sensibilidad rédox de *ABII* reveló una fuerte inactivación por peróxido de hidrógeno. Además *ABII* es altamente susceptible a inactivación por óxido de fenilarsina lo que indica que uno de sus residuos de cisteína tienen una gran facilidad de oxidación (Meinhard y Grill, 2001). Con todo estos datos, llegamos a la misma conclusión que nuestros experimentos, el mutante *cat2-1* tiene una mayor sensibilidad al ABA que los controles silvestres (figura 4.42 y 4.43), debido a que el mayor contenido en peróxido de hidrógeno inhibe al regulador negativo de la señal del ácido abscísico *ABII*.

5.9 Análisis transcriptómico en el mutante *cat2-1*.

Los cambios observados en la expresión del mutante *cat2-1* fueron comparados con los trabajos de Vandenabeele *et al*, 2004 en el que se utilizaron plantas antisentido de catalasa, Davletova *et al*, 2005 en el que se utiliza un mutante en una ascorbato peroxidasa citosólica y Desikan *et al*, 2001 en el que se utilizaron plantas a las que se les añadió exógenamente agua oxigenada. Una respuesta general a estrés oxidativo observado en casi todos los trabajos es el aumento de expresión de genes codificantes de glutatión S-transferasa y citocromos P450, reflejando este dato, el importante papel que tienen estas proteínas en la defensa antioxidante. También aparecen sobreexpresadas en casi todos los trabajos genes de inhibidores de proteasas, señalando que la generación de estrés oxidativo produce protección cruzada contra herbívoros. Por último también aparecen sobreexpresadas en casi todos los trabajos proteínas kinasas y los factores de transcripción con dedos de zinc.

Las principales diferencias con otros trabajos son que en el nuestro aparecen sobreexpresados genes de defensinas y reprimidos genes de proteínas de respuesta a

auxinas y en cambio no aparece la sobreexpresión de “heat shock proteins” como ocurre en los otros trabajos. Estas discrepancias podrían ser explicadas por las diferencias en las condiciones experimentales con los otros trabajos. En los experimentos con plantas antisentido de catalasa y con mutantes en ascorbato peroxidasa se utilizan altas intensidades de luz, y en cambio en el nuestro se utilizaron unas intensidades mucho menores. Además la adición exógena de agua oxigenada a la célula podría tener diferentes consecuencias a la generación interna de este antioxidante

La expresión de genes codificantes de transportadores de cationes y proteínas de señalización/biosíntesis de etileno no sufrieron ninguna alteración significativa en el mutante *cat2-1*. Es por ello, que la probable explicación de la homeostasis iónica alterada, la reducida producción de etileno y sensibilidad a esta hormona es proporcionada por una regulación postranscripcional de proteínas relevantes.

5.10 Mecanismos de insensibilidad a etileno del mutante *cat2-1*.

Un posible mecanismo para que el agua oxigenada cause insensibilidad a etileno podría estar basado en la observación de que el mutante del receptor de etileno *etr1-1*, cuya cisteína en la posición 65 es intercambiada por una tirosina, muestra problemas en el cierre de estomas tras tratamiento con agua oxigenada (Desikan *et al.*, 2005). Esto indica que la cisteína 65 de ETR1 es importante para la percepción de agua oxigenada por las células oclusivas (Hancock *et al.*, 2006). Nuestra hipótesis por tanto es, que el mutante *cat2-1*, al acumular agua oxigenada oxide la cisteína 65, haciendo que ETR1 presente una menor sensibilidad a etileno.

Por otra parte, la insensibilidad a etileno del mutante *cat2-1*, apunta a que la acumulación de peróxido de hidrógeno durante las respuestas a estrés podría mitigar los efectos negativos del exceso de etileno generado bajo estas condiciones. Además, aunque el papel fisiológico de la relación entre peróxido de hidrógeno y la señalización por etileno debe seguir bajo estudio, un posible mecanismo de percepción y señalización del agua oxigenada podría ser la pérdida de sensibilidad de etileno debido a una oxidación del receptor del etileno ETR1.

CONCLUSIONES

- Se ha establecido al mutante *cat2-1* como sistema para estudiar los efectos y fenotipos derivados de la alta concentración del peróxido de hidrógeno, tanto en su componente oxidativa como en su función señalizadora en el organismo modelo *Arabidopsis thaliana*.
- Se aisló una línea mutante de inserción de T-DNA en el gen de la catalasa 2 de *Arabidopsis thaliana*. Estas líneas presentan diferentes alteraciones morfológicas fruto de su sensibilidad a estrés oxidativo.
- El mutante *cat2-1* presenta una actividad catalasa en hoja un 80% menor que los controles silvestres. Como consecuencia, el mutante *cat2-1* presenta una mayor acumulación de agua oxigenada.
- El mutante *cat2-1* presenta una alta sensibilidad a diferentes generadores de estrés oxidativo tales como son el peróxido de hidrógeno, el cloruro sódico, la alta intensidad lumínica, el estrés ácido y la congelación.
- El mutante *cat2-1* presenta una alteración de la homeostasis de iones. El mutante presenta menores niveles de potasio, mientras que tiene una mayor entrada a la célula de otros cationes como el litio, el sodio y la norespermidina.
- El mutante *cat2-1* es más tolerante a cloruro de litio porque es menos sensible al etileno y produce menos de esta hormona inhibitoria tras crecimiento con esta sal.

- Gran parte de la toxicidad del litio está mediada por inducir la producción de etileno. La toxicidad del litio fue parcialmente mitigada tras la inhibición de la biosíntesis de etileno con 2-aminoisobutirato. Los mutantes insensibles a etileno *etr1-1* y *ein3-3* son parcialmente tolerantes al crecimiento con cloruro de litio.
- El mutante *cat2-1* presenta una cierta tolerancia a estrés por sequía, debido a su mayor sensibilidad a ABA. Esta sensibilidad podría explicarse por inactivación oxidativa de la proteína fosfatasa ABI1.
- El análisis transcriptómico del mutante *cat2-1* revela una importante inducción de las defensas antioxidantes de la planta, así como una protección cruzada contra hervívoros debido a la inducción de inhibidores de proteasas. Por otra parte, la principal represión se produce en genes de proteínas de respuesta a auxinas.
- La expresión de genes codificantes de transportadores de cationes y proteínas de señalización/biosíntesis de etileno no sufrieron ninguna alteración significativa en el mutante *cat2-1*. Por tanto, la alteración de la homeostasis iónica, la reducida producción de etileno y menor sensibilidad a esta hormona debe estar proporcionada por una regulación postranscripcional de proteínas relevantes.

CONCLUSIÓN FINAL

El aumento de la concentración de agua oxigenada en el mutante *cat2-1* de *Arabidopsis* conduce tanto a una mayor sensibilidad a estrés oxidativo como a un cambio en la regulación de ciertos procesos biológicos como son la mayor producción y la menor sensibilidad a etileno, mayor sensibilidad a ABA y un profundo cambio tanto transcriptómico como en la homeostasis iónica a nivel de planta entera.

BIBLIOGRAFÍA

Abel S, Nguyen MD, Chow W and Theologis A. (1995) ACS4, a primary indolacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. *J. Biol. Chem.*270:19093-19099.

Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.

Alejandro S, Rodríguez PL, Bellés JM, Yenush L, García Sánchez MJ, Fernández JA, Serrano R. (2007) An *Arabidopsis* quiescin-sulfhydryl oxidase regulates cation homeostasis at the root symplast-xylem interface. *EMBO J.* 26 (13): 3203-15.

Alonso JM, Stepanova AN et al. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.

Amtmann A, Fischer M, Marsh ML, Stefanovic A, Sanders D, Schachtman DP. (2001). The wheat cDNA LCT1 generates hypersensitivity to sodium in a saltsensitive yeast strain. *Plant Physiol.*126, 1061-1071.

Apel K, Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.

Apse MP, Sottosanto J, Blumwald E. (2003) Ion homeostasis in *Arabidopsis thaliana*: role of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters. *Plant J.* 36:229-239.

Apse MO, Sottosanto JB and Blumwald. (2003). Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant J.* 36:229-239.

Apse MP, Blumwald E. (2007) Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters* 581:2247-2254.

Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:601-39.

Baker A, Graham I. (2002) Plant Peroxisomes. Biochemistry, Cell Biology and Biotechnical Applications. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.*

Bañuelos MA, Klein RD, Alexander-Browman, SJ and Rodríguez-Navarro A. (1995) A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J.* 14:3021-3027.

Beers EP, McDowell JM. (2001) Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol.* 4:561-567.

Beyer WF and Fridovich I. Catalases-with and without heme. In: Simic, M.G.; Taylor, K.A.; Ward, J.F.; Von Sonntag, C., eds. Oxygen radicals in Biology and Medicine. New York: Plenum Press; 1987:651-661.

- Bleecker AB and Kende.** (2000) Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:1-18.
- Bleecker AB, Esch JJ, Hall AE, Rodríguez FI, Binder B.** (1998) The ethylene-receptor family from *Arabidopsis*: structure and function. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353:1405-1412.
- Blumwald E, Poole RJ.** (1985) Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of beta vulgaris. *Plant Physiol.* 78:163-167.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR.** (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53:1367-76.
- Brett CL, Donowitz M, Rao R.** (2005) Evolutionary origins of eukariotic sodium/proton exchangers. *AM. J. Physiol. Cell Physiol.* 288:223-239.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, et al.** (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 12:323-37.
- Cellier F, Conejero G, Ricaud I, Luu DT, Lepetit M, Gosti F y Casse F.** (2004) Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H⁺ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis. *Plant J.* 39:834-846.
- Chamnongpol S, Willekens H, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D.. and Van Camp W.** (1996) Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J.* 10:491-503.
- Charrier B, Champion A, Henry Y, and Kreis M.** (2002) Expression profiling of the whole *Arabidopsis* Zhaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiology* 130: 577-590.
- Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G et al.** (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell.* 14:214-29.
- Chen YF, Etheridge N, Schaller GE.** (2005) Ethylene signal transduction. *Ann Bot* 95:901-915.
- Conklin PL, Williams EH, Last RL.** (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9970-74.
- Conrath U, Chen Z, Ricigliano J, Klessig D.** (1995) Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7143-7147.
- Creissen G, Firmin j, Fryer M, Kular B, Leyland N, et al.** (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* 11:1277-92.

Crozier A, Kamiya Y, Bishop G, Yokota T. (2000) Biosíntesis of hormones and elicitor molecules. En: *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. Buchanan, Grissem y Jones. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland.

Cutler AJ and Krochko JE. (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* 4:472-478.

Czempinski K, Zimmermann S, Ehrhardt T, and Muller-Rober B. (1997) New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *EMBO J.* 16:2565-2575.

Czempinski K, Gadeke N, Zimmerman S, Müller-Röber, B. (1999) Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *J. Exp. Bot.* 50:955-966.

Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlaaach and Mittler R. (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:268-281

Davies DD. (1986) The fine control of cytosolic pH. *Physiolo. Plant.* 67:702-706.

Davies C, Shin R, Liu W, Thomas MR and Schactman DP. (2006) Transporters expressed during grape berry (*vitis vinifera* L.) development are associated with an increase in berry size and berry potassium accumulation. *J. Exp. Bot.* 57:3209-3216.

Davison PA, Hunter CN, Horton P. (2002) Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* 418:203-6.

Delaunay A, Isnard A, Toledano MB. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* 19:5157-66.

Dangl JL, Dietrich RA, Thomas H. (2000) Senescence and programmed cell death. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan B, Grissem w, Jones R. eds.) American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, pp.1044-1100.

Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB. (2006) Rective Oxygen Species and Reactive Nitrogen species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signalling. *Plant Physiology.* 141:330-335.

De Paepe A, Vuylsteke M, Van Hummelen P, Zabeau M, Van Der Straeten D. (2004) Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray análisis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant J.* 39:537-559.

Desikan R, Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ. (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* 127:159-72.

Desikan R, Hancock JT, Bright J, Harrison J, Weir I, Hooley T, and Neill SJ. (2005) A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 137:831-834.

Dreyer I, Antunes S, Hoshi T, Müller-Röber B, Palme K, Pongs O, Reintanz B, Hedrich R. (1997) Plant K⁺ channel α -subunits assemble indiscriminately. *Biophys. J.* 72:2143-2150.

Dietz KJ, Sauter A, Wichert K, Messdaghi D, Hartung W. (2000) Extracellular beta-glucosidase activity barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *J Exp Bot* 51:937-944.

Doyle DA, Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT and MacKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.

Duroux L, Welinder KG. (2003) The peroxidase gene family in Plants: A Phylogenetic Overview. *Journal of molecular evolution.* 57:397-407.

Ecker JR. (2004) Reentry of ethylene MPK 6 module. *Plant Cell* 16: 3169-3173.

Elstner EF. (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In Active Oxygen/oxidative Stress in Plant Metabolism, eds. EJ Pelland, KL Steffen. Pp.13-25. Rockville, MD: Am. Soc. Plant Physiol.

Epstein E, and Bloom AJ. (2005) Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. 2nd edn, Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.

Essah PA, Davenport RJ, Tester M. (2003) Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 307-318.

Etheridge N, Parson Hall B, Schaller GE. (2006) Progress report: ethylene signalling and responses. *Planta.* 223:387-391.

Fernández JA y Maldonado JM. (2000) Absorción y transporte de nutrientes minerales, pp 99-112. En: Fundamentos de fisiología vegetal Editores: Azcón-Bieto J y Talón M. McGraw-Hill.

Flores HE and Gaston AW. (1982) Analysis of Polyamines in Higher Plants By High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiol.* 69:701-706.

Forment J, Naranjo MA, Roldán M, Serrano R, Vicente O. (2002) Expresión of *Arabidopsis* SR-like splicing proteins confers SALT tolerance to yeast and transgenic plants. *The Plant Journal* 30:511-519.

Frugoli JA, Zhong HH, Nuccio ML, McCourt P, McPeck MA, Thomas TL and McClung CR. (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* 112:327-336.

Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, and Tanaka Y. (2004) Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* 45:146-159.

Gagne JM, Smalle J, Gingerich DJ, Walker JM, Yoo SD, Yanagisawa S, Vierstra RD. (2004) *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *PNAS USA* 101(17):6803-6808.

Gao ZY, Chen YF, Randlett MD, Zhao Xc, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE. (2003). Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signalling complexes. *J Biol Chem* 278:34725-34732.

Gasch A, Spellman P, Kao C, Harel O, Eisen M, et al. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11:4241-57.

Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL and Fink GR. (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and avp1, can function in cation detoxification in yeast. *PNAS USA* 96: 1480-1485.

Ge L, Liu, JZ, Wong WS, Hsiao WLW, Chong K, Xu ZK, Yang SF, Kung SD and Li N. (2000) Identification of a novel multiple environmental factor-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene, NT-ACS2, from tobacco. *Plant Cell Environ.* 23:1169-1182.

Giannattasio S, Guargnella N, Corte-Real M, Pasarella S, Marra E. (2005) Acid Stress adaptation protects *Sacharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene* 354:93-98.

Gierth M, Mäser P. (2007) Potassium transporters in plants. Involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters* 581:2348-2356.

Gietl, C. (1996) Protein targeting and import into plant peroxisomes. *Physiol. Plant.* 97:599-608.

Gil-Mascarell R, López-Coronado JM, Bellés JM, Serrano R and Rodríguez PL. (1999) The *Arabidopsis* HAL2-like gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase. *Plant J.* 1:373-383.

Gobert A, Park G, Amtman A, Sanders D and Maathius FJM. (2006) *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non selective ion transporter involved in germination and cation transport. *J. Exp. Bot.* 57: 791-800.

Gupta R, Luan S. (2003) Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiology* 132:1149-1152.

Guzmán P, Ecker JR. (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2:513-523.

Hall D, Evans AR, Newbury JJ, and Pritchard J. (2006) Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 57:1201-1210.

Hancock J, Desikan R, Harrison J, Bright J, Hooley R, and Neill S. (2006) Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. *J. Exp. Bot.* 57:1711-1718.

Haro R, Sainz L, Rubio F, Rodríguez-Navarro A. (1999) Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expresión of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 31:511-520.

Harwood AJ. (2005) Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hipotesis revisited. *Molecular Psychiatry* 10:117-126.

Hass C, Lohrmann J, Abrecht V, Sweere U, Hummel F, Yoo SD, Hwang I, Zhu T, Schafe E, Kudla J, Harter K. (2004) The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 23:3290-302.

He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY. (2005) AtNAC2, atranscription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J.* 44:903-916.

Heibert T, Steinkamp T, Hinnah S, Schwarz M, Flügge U, Weber A, Wagner R. (1995) Ion channels in the chloroplast envelope membrane. *Biochemistry* 34:15906-15917.

Higinbotham N. (1973) Electropotentials of plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 24, 25-46.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H. (2001) A large family of class III plant peroxidises. *Plant Cell Physiol* 42:462-468.

Hirayama T and Shinozaki K. (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA.

Horie T, Yoshida K, Nakayama H, Yamada K, Oiki S, and Shinmyo A. (2001) Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza Sativa*. *Plant J.* 27: 129-138.

Horie T, Schroeder JI. (2004) Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol.* 136: 2457-2462.

Huang D, Jaradat MR, Wu W, Ambrose SJ, Ross AR, Abrams SR, Cutler AJ. (2007) Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signalling in *Arabidopsis*. *Plant J* 50:414-428.

Hwang I, Chen HC, Sheen J. (2002) Two component Signal transduction Pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129:500-515.

Jespersen HM, Kjaegard IV, Ostegaard L, Welinder KG. (1997) From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem J.* 326:305-310.

- Jonak C, Ökresz L, Bögre L, Hirt H.** (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:415-24.
- Joo JH, Bae YS, Lee JS.** (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology* 126:1055-1060.
- Karin M, Liu Z, Zandi E.** (1997) AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:240-246.
- Kato Y., Sakaguchi M, Mori Y, Saito K, Nakamura T, Bakker EP, Sato Y, Goshima S, and Uozumi N.** (2001) Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the *Arabidopsis thaliana* Na⁺/K⁺ translocating AtHkt1 protein, a member of the superfamily of K⁺ transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6488-6493.
- Kende H.** (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:283-307.
- Kevin LC, Wang HL and Ecker J.** (2002) Ethylene Biosynthesis and signalling networks. *The Plant Cell Supplement* S131-S151.
- Kim EJ, Kwak JM, Uozumi N, and Schroeder JI.** (1998) *AtKup1*: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* 10:51-62.
- Kurepa J, Smalle J, Van Montagu M, Inzé D.** (1998) Oxidative stress tolerance and longevity in *Arabidopsis*: the late-flowering mutant gigantean is tolerant to paraquat. *The Plant Journal* 14(6) 759-764.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen.** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *PNAS* 97:2940-2945.
- Laurie S, Feeney KA, Maathius FJM, Heard PJ, Brown SJ, Leigh RA.** (2002) A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.* 32, 139-149.
- Lebaudy A, Véry AA, Sentenac H.** (2007) K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters* 581:2357-2366.
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I.** (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerisation rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126:1109-1120.
- Leng Q, Mercier RW, Hua BG, Fromm H. and Berkowitz GA.** (2002) Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol.* 128: 400-410.
- Leung J and Giraudat J.** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49:199-222.

- Li X, Borsics T, Harrington HM, Cristopher DA.** (2005) Arabidopsis ArCNGC10 rescues potassium channel mutants of E.coli, yeast and *Arabidopsis* and is regulated by calcium/calmodulin and cyclic GMP in E.coli. *Funct. Plant Biol.* 32: 643-653.
- Liang X, Shen NF and Theologis A.** (1996) Li(+)-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*10:1027-1036.
- Liu H, Colavitti R, Rovira I, Finkel T.**(2005) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circulation research* 97:967-974.
- Liu X, Yue Y, LiB, Nie Y, Li W, Wu W-H, Ma L.** (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315:1712-1716.
- Lohrmann J, Harter K.** (2002) Plant two-component signalling systems and the role of response regulators. *Plant Physiology* 128:363-369.
- Lopez F, Leube M, Gil-Mascarell R, Navarro-Aviño JP and Serrano R.** (1999) The yeast inositol monophosphatase is a lithium- and sodium-sensitive enzyme encoded by a non-essential gene pair. *Mol. Microbiol.* 31:1255-1264.
- Martínez-Cordero MA, Vicente M, Francisco R.** (2004) Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Mol. Biol.* 56:413-421.
- Mäser P, Eckelman B, Vaidyanthan R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M, Yamagami M, Yamaguchi K, Nishimura M, Uozumi N, Robertson W, Sussman MR and Schroeder JI.** (2002) Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Lett.* 531:157-161.
- Maser P, Hosoo Y, Goshima S, Horie T, Eckelman B, Yamada K, Yoshida K, Bakker EP, Shinmyo A, Oiki S, Schoereder JI, and Uozumi N.** (2002) Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6428-6433.
- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, et al.** (2001) Phylogenetic Relationships within Cation Transporters Families of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126:1646-1667.
- Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR, Schaller GE.** (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:3007-3018.
- Masuda CA, Xavier MA, Mattos KA, Galina, A. And Montero-Loeli M.** (2001) Phosphoglucomutase is an in vivo lithium target in yeast. *The Journal of Biological Chemistry.* 276:37794-37801.

- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L.** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6:8271-76.
- McRobbie EAC.** (2006) Control of volume and turgor in stomatal guard cells. *J. Membr. Biol.* 210:131-142.
- McClung CR.** (1997) Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free radical Biology & Medicine* 23:489-496.
- Mehler AH.** (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*
- Meinhard M, Grill E.** (2001) Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 508:443-446.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley S, Koorneef M.** (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282:662-682.
- Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A and Giradaut J.** (2001) The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant Journal.* 25(3):295-303.
- Meyerowitz EM.** (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* 56:263-269.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F.** (2004) Reactive oxygen gene networks of plants. *Trends Plant Sci.* 10:490-498.
- Moon H, Lee B, Choi G, et al.** (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants PNAS 100:358-363.
- Morán JF, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Tejo, P.** (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194:346-352.
- Moussatche P and Klee HJ.** (2004) Autophosphorylation activity of the *Arabidopsis* ethylene receptor multigene family. *J Biol Chem.* 279:48734-48741.
- Murguía JR, Bellés JM, and Serrano R.** (1995) A salt sensitive 3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science* 267:232-234.
- Nahorski SR, Ragan CI, Challiss RAJ.** (1991) Lithium and the phosphoinositide cycle: an example of uncompetitive inhibition and its pharmacological consequences. *Trends Pharmacol. Sci.* 12:297-303.
- Naranjo MA, Romero C, Bellés JM, Montesinos C, Vicente O, Serrano R.** (2003) Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. *Planta* 217:417-424.

Neill S, Desikan R, Hancock J. (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5:388-395.

Nieves-Cordones M, Martínez-Cordero MA, Martínez V, and Rubio F. (2007) An NH_4^+ -sensitive component dominates high-affinity K^+ uptake in plants. *Plant Science* 172:273-280.

Nilson SE, and Assmann SM. (2007) The control of transpiration. Insights from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143, 19-27.

Noctor G, Foyer CH. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 49:249-279.

Nublat A, Desplans J, Casse F, and Berthomieu P. (2001) *sas1*, an *Arabidopsis* mutant overaccumulating sodium in the shoot, shows deficiency in the control of the root radial transport of sodium. *Plant Cell* 13:125-137.

Olsen L and Harada JJ. (1995) Peroxisomes and their assembly in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:123-146.

O'Malley RC, Rodríguez FI, Esch JJ, Binder BM, O'Donnell P, Klee HJ, Bleecker AB. (2005) Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and tomato. *Plant J.* 41:651-659.

Ohnishi M, Fukuda-Tanaka S, Hoshino A, Takada J, Inagaki Y and Iida S. (2005) Characterization of a novel Na^+/H^+ antiporter gene *InNHX2* with *inNHX1*, which is responsible for blue flower coloration by increasing the vacuolar pH in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol.* 46:259-267.

Orozco-Cárdenas M and Ryan CA. (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6553-6557.

Ortega-Martínez O, Pernas M, Carol RJ, Dolan L. (2007) Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* Root. *Science* 317:507-510.

Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H. A MAPK pathway mediates ethylene signalling in plants. *EMBO J.* 22:1282-1288.

Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langerbartels C, Sandermann H and Kangasjarvi. (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis* *rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide dependent cell death. *Plant Cell* 12:1849-1862.

Pandey S, Zhang W, Assmann S. (2007) Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters* 581: 2325-2336.

Pardo JM, Cubero B, Leidi EO and Quintero FJ. (2006) Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 57:1181-1199.

Pasternak T, Petters G, Cambergs R, Jansen MK. (2005) Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ and cellular level. *Journal of Experimental Botany* 56:1991-2001.

Platten JD, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bonhert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin HX, Luan S, Maser P, Pantoja O, Rodríguez-Navarro A, Schatman DP, Schroeder JI. (2006) Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends. Plant. Sci.* 11:372-374.

Priest DM, Ambrose SJ, Vaistij FE, Elias L, Higgins GS, Ross ARS, Abrams SR, Bowles DJ. (2006) Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 46:492-502.

Qiu QS, Barkla BJ, Vera-Estrella R, Zhu JK, And Schumaker KS. (2003) Na⁺/H⁺ exchange activity un the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132, 1041-1052.

Raines CA, Lloyd JC, Longstaff M, Bradley D, and Dyer T. (1988) Chloroplast fructose-1,6-biphosphatase: the product of a mosaic gene. *Nucleic acids research.* 16:7931-42.

Rausell A, Kanhonou R, Yenush L, Serrano R, Ros R. (2003) The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *The Plant Journal* 34:257-67.

Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD. (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 438:290-294.

Sagi M, Fluhr R. (2006) Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases. *Plant Physiology* 141:336-340.

Saqib M, Zorb C, Rengel Z, and Scubert S. (2005) The expression of the endogenous vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters in roots and shoots correlates positively with the salt tolerance of wheat (*Triticum aestivium* L.). *Plant Sci.* 169:959-965.

Santa-Maria GE, Rubio F, Dubcovsky J, and Rodríguez-Navarro A. (1997) The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell* 9:2281-2289.

Scandalios JG. The antioxidant enzyme genes Cat and Sod of maize: Regulation, functional significance, and molecular biology. In: Rattazi, M.C.; Scandalios, J.G.; Whitt, G.S.; eds. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*. New York: Alan R. Liss; 1987:19-43.

Schachtman DP, Schroeder JI. (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370:655-658.

Scheyer M, Bakker EP. (1993) Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K⁺-uptake protein kup from *Escherichia coli* is composed of a

hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *J. Bacteriol.* 175:6925-6931.

Schwacke R, Schneider A, van der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flügge UI, and Kunze R. (2003) ARMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol.* 131:16-26.

Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F and Grignon C. (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256:663-665.

Serrano R and Rodríguez-Navarro A. (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 399-404.

Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY et al. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443:823-826.

Shi H, Ishitani M, Kim C, and Zhu JK. (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *PNAS USA* 97:6896-6901.

Smith AT, Veitch NC. (1998) Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr Opin Chem Biol* 2:269-278.

Song CP, Guo Y, Qiu Q, Lambert G, Galbraith DW, Jagendorf A, Zhu JK. (2004) A probable Na⁺ (K⁺)/H⁺ exchanger on the chloroplast envelope functions in pH homeostasis and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 101:10211-10216.

Stedtle E. (2000) Water uptake by roots: effects of water deficit. *J. Exp. Bot.* 51:1531-1542.

Sunarpi, Horie T, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, Horie R, Chan WY, Leung HY, Hattori K, Konomi M, Osumi M, Yamagami M, Schroeder JI, Uozumi N. (2005) Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* 44:928-938.

Sweetlove LJ, Heazlewood JL, Herald V, Holtzapffel R, Day DA, et al. (2002) The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J.* 32:891-904.

Sze H, Padmanaban S, Cellier F, Honys D, Cheng NH, Bock KW, Conejero G, Li X, Twell D, Ward JM and Hirschi KD. (2004) Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K⁺ homeostasis in pollen development. *Plant Physiol.* 136: 2532-2547.

Taiz L and Zeiger E. (2002) *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc.

Tester M, and Davenport R. (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91:503-527.

- Tholeman, Vor der Bruggen M, Maser P, Nakamura T, Schroeder JI, Kobayashi H, Uozumi N, Bakker EP.** (2005) All four putative selectivity filter glycine residues in KtrB are essential for high affinity and selective K^+ uptake by the KtrAB system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* 280:41146-41154.
- Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi A, Bakker EP, Nakamura T, and Schroeder JI.** (2000) The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na^+ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* 122:1249-1259.
- Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langerbartels C, Seidlitz H, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D, Van breusegem F.** (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39:45-58.
- Vallejo AJ, Peralta ML, Santa-Maria GE.** (2005) Expresión of potassium-transporter coding genes, and kinetics of rubidium uptake, along a longitudinal axis. *Plant Cell Environ.* 28:850-862.
- Van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H.** (2003) Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 423:773-777.
- Van Zhong G, Burns JK.** (2003) Profiling ethylene-regulated gene expression in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Plant Mol Biol* 53:117-131.
- Varin L, Marsolais F, Richard M, Rouleau M.** (1997) Biochemistry and molecular biology of plant sulfotransferases. *FASEB J.* 11:517-525.
- Venema L, Quintero FJ, Pardo JM, Donaire JP.** (2002). The *Arabidopsis* Na^+/H^+ exchanger catalyzes low affinity Na^+ and K^+ transport in reconstituted vesicle. *J. Biol. Chem.* 277, 2413-2418.
- Venema K, Belver A, Marín-Manzano MC, Rodríguez-Rosales MP, and Donaire JP.** (2003) A novel intracellular K^+/H^+ antiporter related to Na^+/H^+ antiporters is important for K^+ ion homeostasis in plants. *J. Biol. Chem.* 278:22453-22459.
- Verslues PE, Zhu JK.** (2007) New developments in abscisic acid perception and metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 10:447-452.
- Véry A, Sentenac H.** (2003) Molecular mechanism and regulation of K^+ transport in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 54:575-603.
- Vogel JP, Woeste KE, Theologis A and Kieber JJ.** (1998) Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4766-4771.
- Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F.** (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol Biol.* 49(5):515-32.

Walker DJ, Leigh RA, Miller AJ. (1996) Potassium homeostasis in vacuolated plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10510-10514.

White PJ. (1999) The molecular mechanism of sodium influx to root cells. *Trends Plant Sci.* 4:245-246.

Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W. (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J.* 16:4806-4816.

Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7:1357-1368.

Wu YY, Chen GD, Meng QW and Zheng CC. (2004) The cotton GhNHx1 gene encoding a novel putative tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol.* 45:600-607.

Xiong L, Lee B, Ishitani M, Lee H, Zhang C, Zhu JK. (2001) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signalling in *Arabidopsis*. *Genes and development* 15:1971-1984.

Xiong L, Lee H, Huang R, Zhu JK. (2004) A single amino acid substitution in the *Arabidopsis* FIERY/HOS2 protein confers cold signalling specificity and lithium tolerance. *The Plant Journal* 40:536-545.

Yamaguchi T, Fukuda-Tanaka S, Inagaki Y, Saito N, Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, Kusumi T, Iida S. (2001) Genes encoding the vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol.* 42, 451-461.

Yamaguchi T and Blumwald E. (2005) Developing salt tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci.* 12:615-620.

York JD, Ponder JW, Majerus, PW. (1995) Definition of a metal-dependent/Li⁺ inhibited phosphomonoesterase protein family based upon a conserved three-dimensional core structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:5149-5153.

Zheng M, Aslund F, Storz G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279:1718-21.

Zhong HH, Young JC, Pease EA, Hangarter RP and McClung CR. (1994) Interactions between light and the circadian clock in the regulation of *CAT2* Expression In *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 104: 889-898.

Zhong HH.(1996) Regulation of *Arabidopsis* catalase expression by light and the circadian clock. Ph.D. Thesis, Dartmouth College.

Zhou R and Cheng L. (2004) Biochemical characterization of cytosolic fructose-1,6-biphosphatase from apple leaves. *Plant Cell Physiol.* 45:879-86.

ANEXOS

Cebadores

Secuencias de los cebadores empleados en este trabajo.

cat2f:

5'-GCTTGCCAATTTTCGACAGGG-3'

cat2r:

5'-CAACACCATACGTCCAACAGG-3'

cat2r':

5'-CAGGGTGGTGGGAGAAGAAG-3'

tdna1:

5'-GCTTTACGGCACCTCGACCC-3'

tdna2:

5'-CGGCTTGTCCCGCGTCATCG-3'

cat2f'':

5'-CGACACCCACACTTGATACAACG-3'

cat2r'':

5'-GCACTCATAGCCATAGGTGGTGGATG-3'

pr4f:

5'-CGAACTTGTCCCGTAACAT-3'

pr4r:

5'-GCCGCAAGAAGCTTGACCAC-3'

AtEBPf:

5'-GGAGGCAGTGAAGAAGGAGC-3'

AtEBPr:

5'-CCACCTAGGAAACGGACTC-3'

Tubf:

5'-CCTGATAACTTCGTCTTTGG-3'

Tubr:

5'-GTGAACTCCATCTCGTCCAT-3'

Act8f:

5'-AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT-3'

Act8r:

5'-GAGGATAGCATGTGGAAGTGAGAA-3'