

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Especies reactivas del oxígeno (ROS)</b> .....	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
<b>1.2 Catalasa. Generalidades</b> .....	8
<b>1.3 Función señalizadora de las ROS</b> .....	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
<b>1.4 Peróxido de hidrógeno</b> .....	17
1.4.1 Procesos biológicos mediados por peróxido de hidrógeno .....	18
<b>1.5 Transporte iónico en membranas vegetales</b> .....	21
1.5.1 Transporte de sodio en plantas .....	23
1.5.2 Transporte de potasio en plantas .....	27
<b>1.6 Dianas de toxicidad conocidas del litio</b> .....	33
<b>1.7 Etileno, una hormona gaseosa</b> .....	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
<b>1.8 Ácido abscísico. Hormona del estrés abiótico</b> .....	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
<b>1.9 <i>Arabidopsis</i> como sistema modelo</b> .....	46

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

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

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