



Universidad Politécnica de Valencia
Departamento de Biotecnología

TESIS DOCTORAL

NUEVOS GENES REGULADORES DE LA TOLERANCIA AL ESTRÉS ABIÓTICO EN ARABIDOPSIS.



DIRECTORES:

Ramón Serrano Salom
Jesús Muñoz Bertomeu

FÉLIX MARTÍNEZ MACÍAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología



Nuevos genes reguladores de la tolerancia a estrés
abiótico en Arabidopsis

AUTOR:

Félix Martínez Macías

DIRECTORES:

Dr. Ramón Serrano Salom

Dr. Jesús Muñoz Bertomeu

Valencia, 30 de enero de 2015

D. Ramón Serrano Salom, Doctor Ingeniero Agrónomo y Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia

D. Jesús Muñoz Bertomeu, Doctor en Biología y Profesor Asociado de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia

CERTIFICAN: que la presente Tesis Doctoral titulada “**Nuevos genes reguladores de la tolerancia a estrés abiótico en Arabidopsis**”, presentada para optar al grado de Doctor en Biotecnología, ha sido realizada bajo nuestra dirección por el Ingeniero Técnico Agrícola FÉLIX MARTÍNEZ MACIAS

Fdo. Ramón Serrano Salom

Fdo. Jesús Muñoz Bertomeu

A mis padres Félix y Soledad

AGRADECIMIENTOS

Desde que empecé la tesis no he parado de imaginarme cómo será el momento de la presentación, cómo me sentiré una vez haya finalizado o las palabras que utilizaré para agradecer a todas esas personas que de una forma u otra, son responsables de que yo esté a punto de vivir este momento. Y es que para mí, haber podido realizar la tesis, es un logro que vivo con mucha emoción.

Creo que para ser justo debo empezar por mi familia y, en concreto, por mis padres Félix y Soledad. Son esas personas que no dejan de cuidarme y apoyarme en todo lo que hago, pese a haber cumplido los 30. Sin su ilusión y perseverancia porque sus hijos estudiaran una carrera, quizás este momento nunca hubiera llegado. Y junto a ellos han estado siempre mis hermanos Noelia y Rubén, que siempre me han acompañado en todas esas aventuras que la vida nos ofrece. Incluso he sido tío durante la tesis del pequeño gran Joelito (sin la aportación de Juanmota no hubiera sido posible). ¡Gracias por todo eso que significa ser una familia!

Otra parte fundamental en todo esto la ocupa Ramón, uno de mis directores. Mi primer contacto con él fue como profesor del Máster del IBMCP, en esas clases únicas que solo él podía darnos. Siempre recordaré el día que me llamó para comunicarme que yo era el seleccionado para hacer la tesis en su laboratorio. ¡Siempre te estaré agradecido! Y junto a él Mariche, uniendo siempre de forma excepcional al grupo del 1.10, dejándonos formar parte de su vida fuera del laboratorio, integrándonos en su familia. Gracias a los dos por toda vuestra humildad y generosidad. Mi paso por el laboratorio 1.10 comenzó el 8 de septiembre de 2010, a la par que Jesús, mi otro director. Gracias a su pasión por la ciencia creo que nadie podrá encontrar un error en este documento jejeje ☺. Empezamos juntos y enseguida formamos un buen equipo, cuando todavía Regina, Gaetano y Enric eran estudiantes de doctorado (ahora ya doctores). También estaba Lola, quien resultó ser mi compañera de poyata durante algún tiempo, y con la que junto a Marcos, formamos más tarde el trío de los “mutantes de TOR”. Y sobre enero de 2011 llegó Edu, que aunque llevo “con el pelo engominado y aires de pocos amigos” (una muy mala primera impresión, ya que resultó ser todo lo contrario), ha sido una pieza fundamental en estos cuatro años. En este repaso del 1.10 no puedo olvidarme de Laura Muñoz, quien compartió conmigo el comienzo en el laboratorio, e Irene, quien ha compartido conmigo el final de este ciclo. Los periodos más difíciles y los más importantes. Gracias a todos por haberme enseñado algo durante estos años!!!

Y como hacer la tesis no significa dejar de vivir... tuve la gran suerte de encontrarme en el camino con un fantástico grupo. Un grupo sano y sencillo, formado por estudiantes de Máster que querían ser doctores. Toda una generación con ganas e ilusión por formar parte del mundo de la investigación. Sin el mundo “tupper”, sin el equipo de limpieza, sin las cenas de “másters”, sin las noches en Murray... nunca

hubiera sido lo mismo. Y ahí está Ceci, Laura, Patri, Rafa, CristiCodes, Juanvi y Vanesa... hasta formé un equipo cineforum con Ceci y Laura!! Cuantas cosas he aprendido!! ☺ Gracias a todos por cuidar de este grupo dentro y fuera del IBMCP. Y gracias a todos los amigos que he ido amasando durante estos treinta años, amigos de quart, del cole, de la uni y de la efvida... Gracias por estar siempre!!!

Durante la tesis, no solo me tropecé con los “másters”, mi tesis ha estado llena de encuentros y buenos momentos por los pasillos. Otra persona importante ha sido Sofia, mi breve pero fiel profesora de italiano, gracias por enseñarme entre otras cosas a hacer “orecchiette”... que grandes momentos amiga!!! Y entre los viajes al fitotron, al labo de al lado, a por hielo, a la cámara de 4º, no puedo olvidar a Vicent, Sara, Guillem... a Sandra, que terminó el proyecto en el labo cuando yo empecé la tesis, a Liliam, a Juanvi del piso de abajo!!!! Gracias a todos por esos ratos divertidos. También realizaron grandes aportaciones a esta tesis los responsables de algunos de los servicios del IBMCP. Eugenio, Marisol y Lorena, cuanto me habéis ayudado y enseñado!!! Gracias también por esas charlas técnicas y no técnicas en alguno de los casos, sin vuestra ayuda, algunos de los experimentos se me habría atragantado.

Una de las grandes sorpresas al empezar en el IBMCP, fue mi elección como representante de personal no doctor. Fue una tarea sencilla pero necesaria, una tarea que compartí con Lynne, que aunque es la directora de la tesis de una amiga, ha sido una fiel consejera en muchos momentos de la tesis. Gracias por tu tiempo!! Y gracias también a todas esas personas que han tenido un gesto agradable en la entrada del Instituto, en la sala de comer, por el pasillo... porque han sido muchas horas y eso siempre ayuda.

Y si echo la vista atrás, el comienzo real de mi “era biotecnológica” tuvo lugar durante mi estancia en Bahía Blanca, Argentina, gracias a la beca PROMOE. Con la ayuda inestimable del grupo de Viviana Echenique, pude iniciarme en la ingeniería genética de plantas de la mano de Marina Díaz.

Finalmente, pero no por ello menos importante, quiero agradecer el apoyo incondicional de mi diseñador de portadas favorito. A Ivancio, porque formamos un gran equipo. Gracias!!!

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xxi
RESUMEN	xxv
RESUM	xxvii
ABSTRACT	xxix
1-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1- Importancia de la biotecnología.....	1
1.2- El concepto de estrés abiótico.....	5
1.2.1- El problema de la salinidad.....	6
1.2.2- El problema de la sequía.....	7
1.2.3- El problema de la temperatura.....	10
1.2.3.1- Proteínas de choque térmico.....	11
1.2.3.2- Factores de transcripción de choque térmico.....	12
1.2.3.3- Proteínas con elevada homología a proteínas inducibles por choque térmico.....	14
1.3- Efectos fisiológicos del estrés abiótico sobre las plantas.....	15
1.3.1- Estrés osmótico.....	16
1.3.2- Toxicidad iónica y desequilibrio electroquímico.....	17
1.3.3- Estrés oxidativo.....	18
1.3.4- Alteración en la homeostasis del pH	20
1.3.5- Deficiencia en la toma de K ⁺	21
1.3.6- Disminución del crecimiento.....	22
1.4. Métodos de tolerancia frente al estrés hídrico/osmótico.....	23
1.4.1- Producción de osmoprotectores.....	23
1.4.2- Cierre estomático.....	25
1.5- Estrategias para la identificación de genes involucrados en la tolerancia a estrés.....	28
1.5.1- Ciencias “Omicas”	28
1.5.2- Estrategias de genética directa.....	29
1.5.3- Estrategias de genética reversa.....	34
1.5.4- Expresión heteróloga en arabidopsis	34

1.6- <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo para la identificación de genes responsables de la tolerancia a estrés abiótico en plantas.....	35
2- OBJETIVOS.....	37
3- MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1- Material biológico.....	39
3.1.1- <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
3.1.1.1- Pérdida de función por inserción de T-DNA.....	39
3.1.1.2- Activación transcripcional.....	42
3.1.1.3- Ecotipos silvestres.....	43
3.1.1.4- Mutantes.....	44
3.1.2- <i>Nicotiana benthamiana</i>	45
3.1.3- <i>Escherichia coli</i>	45
3.1.4- <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
3.1.5- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
3.2- Vectores de clonación y transformación.....	47
3.3- Medios de cultivo.....	52
3.3.1- Medio Murashige-Skoog para el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	52
3.3.2- Medio para el crecimiento de bacterias.....	52
3.3.2.1- Medio LB (Luria-Bertani).....	52
3.3.2.2- Medio SOC (<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>)..	52
3.3.2.3- Medio SOB (<i>Super Optimal Broth</i>).....	53
3.3.3- Medios para el crecimiento de levadura.....	53
3.3.3.1- Medio YPDA (<i>Yeast Peptone Dextrose Adenine</i>).....	53
3.3.3.2- Medio SD (<i>Synthetic Dextrose</i>).....	53
3.3.4- Sustancias termolábiles de selección.....	54
3.4- Manipulación y crecimiento de <i>A. thaliana</i>	55
3.4.1- Esterilización de semillas.....	55
3.4.1.1- Método húmedo.....	55
3.4.1.2- Método seco.....	55
3.4.2- Cultivo <i>in vitro</i> en medio sólido.....	56
3.4.3- Cultivo <i>in vitro</i> en medio líquido.....	56
3.4.4- Cultivo en invernadero.....	56
3.4.4.1- Solución nutritiva.....	57
3.4.5- Transformación genética mediante inmersión floral.....	57

3.4.5.1- Manipulación y obtención de líneas puras transgénicas T ₃	57
3.4.6- Rastreo de mutantes.....	58
3.5- Manipulación y crecimiento de <i>Nicotiana benthamiana</i>	59
3.5.1- Cultivo en invernadero.....	59
3.5.2- Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	60
3.6- Manipulación y crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	61
3.6.1- Preparación y transformación de células competentes.....	61
3.6.1.1-Preparación de células competentes DH5α para choque térmico.....	61
3.6.1.2-Transformación de células competentes DH5α por choque térmico.	62
3.7- Manipulación y crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	62
3.7.1- Preparación y transformación de células competentes.....	63
3.7.1.1-Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
3.7.1.2- Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
3.8- Manipulación y crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
3.8.1- Preparación de células competentes para choque térmico.....	63
3.8.2- Transformación de células competentes por el método de alta eficiencia.....	64
3.8.3- Transformación de células por el método “Lazy bones”.....	64
3.8.4- Ensayos de crecimiento en medio sólido.....	64
3.9- Aislamiento de ácidos nucleicos.....	65
3.9.1- Extracción a pequeña escala de ADN genómico de <i>A. thaliana</i>	65
3.9.2- Aislamiento a gran escala de ADN genómico de <i>A. thaliana</i>	65
3.9.3- Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	66
3.9.4- Extracción de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	66
3.9.5- Preparación de la genoteca de <i>A. thaliana</i> en células de <i>E. coli</i>	67
3.9.6- Aislamiento de ARN de <i>A. thaliana</i>	67
3.10- Análisis de ácidos nucleicos.....	68
3.10.1- Cuantificación de ácidos nucleicos.....	68
3.10.2- Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	68
3.10.2.1- Purificación de ADN desde gel de agarosa.....	69
3.10.3- Electroforesis de ARN bajo condiciones no desnaturalizantes.....	69

3.10.4- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	70
3.10.4.1- Diseño de los oligonucleótidos.....	71
3.10.4.2- Purificación de productos de PCR.....	71
3.10.5- Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.....	72
3.10.6- Ligación de moléculas de ADN.....	72
3.10.7- Comprobación de la presencia del T-DNA.....	72
3.10.7.1- Análisis Southern blot.....	72
3.10.7.2- Marcaje radioactivo de sondas.....	73
3.10.8- Análisis de la expresión génica.....	74
3.10.8.1- Síntesis de cDNA para PCR semicuantitativa y a tiempo real.....	74
3.10.8.2- RT-PCR semicuantitativa.....	74
3.10.8.3- qRT-PCR.....	74
3.10.8.4- Análisis de la expresión génica mediante micromatrices de oligonucleótidos.....	75
3.10.9- Diseño y obtención de las construcciones plasmídicas para experimentos de transformación de plantas y levaduras.....	83
3.10.9.1- Clonaje de la región genómica de <i>Candida tropicalis</i> en el vector binario pBIN19.....	83
3.10.9.2- Fusión del promotor del gen <i>CtHSR1</i> al gen delator de la β -glucuronidasa.....	83
3.10.9.3- Clonaje de la secuencia codificante del gen <i>CtHSR1</i> en el vector binario pGPTVII-UBQ10.....	85
3.10.9.4- Sistema de clonaje Gateway.....	85
3.10.9.5- Clonaje de la secuencia codificante del gen <i>CtHSR1</i> para el rastreo de doble híbrido en levadura.....	86
3.10.10- Secuenciación de ADN.....	86
3.11- Análisis de proteínas por Western blot.....	87
3.11.1- Preparación de minigeles.....	87
3.11.2- Preparación de la muestra.....	87
3.11.3- Electroforesis.....	88
3.11.4- Transferencia de proteínas desde gel a membrana.....	88
3.11.5- Tinción de proteínas transferidas a papel de membrana	89

3.11.6- Detección inmunológica de proteínas fijadas en papel de membrana	89
3.12- Rastreo de doble híbrido.....	90
3.13- Procedimientos utilizados para la caracterización fenotípica y fisiológica.....	91
3.13.1- Ensayos de germinación y crecimiento.....	91
3.13.2- Determinación de la tolerancia a la sequía.....	91
3.13.3- Determinación de la apertura estomática.....	91
3.13.4- Determinación del área y densidad estomática.....	92
3.13.5- Determinación del potencial osmótico de extracto de hoja.....	92
3.13.6- Determinación del contenido hídrico relativo.....	92
3.13.7- Determinación de cationes.....	93
3.13.8- Determinación de la concentración de prolina mediante un método colorimétrico.....	93
3.13.9- Determinación de parámetros fotosintéticos mediante equipo portátil de medición.....	95
3.13.10- Determinación de azúcares solubles.....	95
3.13.11- Determinación de ácido indolacético, ácido abscísico y ácido jasmónico.....	96
3.14- Técnicas Histológicas.....	96
3.14.1- Inclusión de muestras en parafina.....	96
3.14.2- Obtención de cortes histológicos.....	97
3.15- Técnicas de imagen.....	97
3.15.1- Fotografía a bajo aumento.....	97
3.15.2- Microscopía óptica.....	98
3.15.2.1- Microscopía de campo brillante.....	98
3.15.2.2- Nomarski, microscopía diferencial de contraste de interferencia	98
3.15.2.3- Microscopía de fluorescencia.....	99
3.15.3- Microscopía confocal.....	99
3.16- Ensayos de expresión del gen reportero <i>GUS</i>	100
3.16.1- Análisis cualitativo de actividad β -glucuronidasa mediante ensayo <i>GUS</i>	100
3.16.2- Análisis cuantitativo de actividad β -glucuronidasa mediante	

ensayo MUG.....	100
3.16.2.1- Extracción de proteínas.....	101
3.16.2.2- Cuantificación de proteínas por el método Bradford.....	101
3.16.2.3- Hidrólisis de MUG.....	101
3.16.2.4- Cuantificación de la actividad.....	101
3.17- Análisis estadísticos.....	102
3.17.1- Determinación estadística mediante la prueba “t” de Student.....	102
3.17.2- Determinación estadística del número de inserciones de T-DNA..	102
4.- RESULTADOS.....	105
4.1- GENÉTICA DIRECTA.....	105
4.1.1- Condiciones del rastreo.....	105
4.1.2- Rastreo primario para el aislamiento de mutantes tolerantes a NE..	106
4.1.3- Rastreo secundario para la confirmación de mutantes tolerantes a NE.....	107
4.1.4- Tolerancia a BASTA/kanamicina.....	108
4.1.5- Determinación del nivel de heterocigosis en los mutantes seleccionados.....	110
4.1.6- Tolerancia a noespermidina.....	111
4.1.7- Mutantes confirmados.....	114
4.1.8- Confirmación de la presencia de T-DNA en los mutantes y determinación del número de inserciones.....	115
4.2- EXPRESIÓN DE <i>CtHSRI</i> EN ARABIDOPSIS.....	120
4.2.1-Análisis bioinformático del factor de transcripción <i>CtHSRI</i> de <i>Candida tropicalis</i>	120
4.2.2- Caracterización cualitativa de la funcionalidad del promotor de <i>CtHSRI</i> en arabidopsis.....	125
4.2.3- Caracterización cuantitativa de la funcionalidad del promotor de <i>CtHSRI</i>	130
4.2.4- Localización subcelular del factor <i>CtHSRI</i> expresado en plantas.....	131
4.2.5- Obtención de plantas transgénicas que expresan la región codificante del gen <i>CtHSRI</i> bajo diferentes promotores.....	132
4.2.5.1- Caracterización genética y fenotípica de plantas expresasoras del gen <i>CtHSRI</i> bajo su propio promotor.....	133

4.2.5.2-	Caracterización genética y fenotípica de plantas sobreexpresoras del gen <i>CtHSR1</i> bajo el promotor del gen <i>UBQ10</i>	136
4.2.5.3-	Caracterización genética y fenotípica de plantas sobreexpresoras del gen <i>CtHSR1</i> bajo el control del promotor constitutivo <i>35S</i>	137
4.2.6-	Caracterización de la respuesta a Ácido Abscísico de las plantas que expresan el gen <i>CtHSR1</i> bajo su propia región reguladora.....	142
4.2.7-	Cuantificación hormonal de las plantas que expresan el gen <i>CtHSR1</i> bajo su propia región reguladora.....	146
4.2.8-	Caracterización de parámetros fotosintéticos en las plantas que expresan el gen <i>CtHSR1</i> bajo su propia región reguladora.....	148
4.2.9-	Caracterización del balance hídrico de las plantas que expresan el gen <i>CtHSR1</i> bajo su propia región reguladora.....	149
4.2.10-	Caracterización del ajuste osmótico de las plantas que expresan el gen <i>CtHSR1</i> bajo su propia región reguladora.....	151
4.2.11-	Análisis transcriptómico de las plantas que expresan el gen <i>CtHSR1</i> bajo su propia región reguladora.....	157
4.2.12-	Rastreo de doble híbrido en levadura para la identificación de interactores del factor de transcripción <i>CtHSR1</i> en arábido... ..	164
5.-	DISCUSIÓN.....	169
5.1-	El rastreo de mutantes.....	169
5.2-	Expresión heteróloga del gen <i>CtHSR1</i> en arábido... ..	172
5.2.1-	Tolerancia a la sequía.....	173
5.2.2-	Respuesta hormonal.....	174
5.2.3-	Apertura estomática.....	176
5.2.4-	Balance hídrico y ajuste osmótico.....	177
5.2.5-	Respuesta transcripcional.....	178
5.2.6-	Modelo para la tolerancia a la sequía mediada por el gen <i>CtHSR1</i>	180
6-	CONCLUSIONES.....	183
6.1-	Genética directa.....	183
6.2-	Expresión del factor <i>CtHSR1</i> en arábido... ..	183
7-	BIBLIOGRAFÍA.....	187
8.-	ANEXOS.....	211

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Crecimiento de la población mundial durante el periodo comprendido entre 1950 y 2050. Población mundial, desglosada por principales grupos de desarrollo, zonas y por variante de proyección (ONU, 2007).

Tabla 1.2. Tabla 1.2. Definición gradual del nivel de sequia (Adaptada de Falkenmark y Widstrand, 1992).

Tabla 3.1. Reactivos necesarios en una reacción de PCR.

Tabla 3.2. Longitudes de onda de excitación y emisión (nm) para diferentes moléculas empleadas en este trabajo.

Tabla 4.1.1. Colecciones, número de líneas y concentración óptima de norespermidina empleados en el rastreo primario de mutantes.

Tabla 4.1.2. Mutantes putativos (población S_1) identificados en el rastreo primario de tolerancia a norespermidina. Se muestra entre paréntesis el porcentaje de individuos seleccionados, respecto del total de líneas empleadas.

Tabla 4.1.3. Mutantes putativos marcados (población S_2) identificados en el rastreo secundario de tolerancia a BASTA/Kanamicina.

Tabla 4.1.4. Número de mutantes confirmados (población S_2) en el rastreo secundario de tolerancia a NE y a BASTA/Kanamicina.

Tabla 4.2.1. Resultado de la búsqueda en la base de datos del TAIR, de proteínas con homología de secuencia al DBD del CtHSR1 mediante Blastp.

Tabla 4.2.2. Valores de tasa de fijación neta de CO_2 (A_n , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conductividad estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tasa de transpiración (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y eficiencia cuántica efectiva del PSII (PhiPS2) en plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan el gen *HRS1* y su control silvestre COL-0. Cada valor es media de 5 determinaciones en plantas diferentes \pm SE. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Tabla 4.2.3. Valores de tasa de fijación neta de CO_2 (A_n , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conductividad estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tasa de transpiración (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y eficiencia cuántica efectiva del PSII (PhiPS2) en mutantes de pérdida de función del gen *WRKY33* en *Arabidopsis thaliana* y su control silvestre COL-0. Cada valor es media de 10 determinaciones en plantas diferentes \pm SE. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Perspectiva en la demanda mundial de alimentos entre el periodo comprendido entre el 1964 y el 2030 (A) y perspectiva de la producción mundial de alimentos entre el periodo comprendido entre el 1961 y el 2030 (B) (FAO, 2002).

Figura 1.2. Perspectivas de cosechas y situación alimentaria (FAO, 2011b).

Figura 1.3. Superficie agrobiotecnológica mundial, 1996-2010 (James, 2010).

Figura 1.4. Mapa mundial mostrando las principales causas de degradación del suelo (FAO, 2007a).

Figura 1.5. Mapa mundial mostrando los suelos afectados por diferentes tipos y niveles de contaminación salina (www.clubgreen.nl).

Figura 1.6. Mapa mundial mostrando la distribución geográfica de los suelos con escasez de agua, desde súper áridos hasta semi húmedos (MA, 2005).

Figura 1.7. Mecanismos de acción y respuesta al estrés térmico (Adaptada de Sachin y col., 2007).

Figura 1.8. Elemento HSE de unión al ADN (Sorger, 1991).

Figura 1.9. Estructura de los HSF y de los dominios presentes en los factores de la clase A, B y C de arabidopsis. DBD: dominio de unión a ADN. HRA/B: dominio de trimerización. NLS: dominio de localización nuclear. AHA: dominio de activación transcripcional. NES: dominio de exportación nuclear (Adaptada de Nover y col., 2001).

Figura 1.10. Modelo de interacción entre los trímeros formados entre los HSF y la secuencia diana de los HSE (Adaptada de Morimoto y col., 1990).

Figura 1.11. Funciones de los genes de respuesta y tolerancia al estrés, inducidos por sequia (Adaptada de Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Figura 1.12. Modelo de señalización y respuesta al estrés oxidativo (Adaptada de Mittler, 2002).

Figura 1.13. Metabolismo de la prolina indicando las enzimas implicadas en la síntesis y en la degradación de este aminoácido (Adaptado de Motoaki y col., 2007; Funck y col., 2010; Szabados y Savoure, 2010).

Figura 1.14. Mecanismo de apertura y cierre estomático mediado por ácido abscísico (Adaptada de Tae-Houn y col., 2010).

Figura 1.15. Vías de señalización del cierre estomático mediado por ácido abscísico

y por ácido jasmónico (Adaptado de Munemasa 2007).

Figura 1.16. Distribución geográfica de *Arabidopsis thaliana*. Los puntos destacados en rojo indican lugares donde se han aislado plantas de esta especie. Modificado de Redei (1970).

Figura 3.1. T-DNA insertado mediante transformación por agroinfiltración en el ecotipo silvestre WS-2 de *Arabidopsis thaliana*, en la colección donada al NASC por el Dr. Ken Feldmann (Forsthoefel y col., 1992).

Figura 3.2. Mapa de restricción del plásmido pBR322, necesario para la realización del rescate plasmídico en los mutantes de la colección de Feldmann (<http://en.wikipedia.org/wiki/PBR322>).

Figura 3.3. T-DNA insertado mediante transformación por agroinfiltración en el ecotipo silvestre WS-4 de *Arabidopsis thaliana*, en la colección donada al NASC por el Dr. Georges Pelletier (Bouchez y col., 1993).

Figura 3.4. Plásmido pSKI015 mostrando el T-DNA insertado mediante transformación por agroinfiltración en los ecotipos silvestres COL-7, COL-2 y C-24 de *Arabidopsis thaliana*, en la colección donada al NASC por el Dr. Detlef Weigel, los Drs. C. Somerville y W. Scheible, y los Drs. H. Koiwa, R. Bressan y S. Yokoi, respectivamente (Weigel y col., 2000).

Figura 3.5. Plásmido multicopia YEp351 para la expresión de genes en levadura (imagen extraída de <https://benchling.com/benchling/yeast-plasmids/yep351/>).

Figura 3.6. Plásmido binario pBin19 para la transformación de arábidopsis (imagen extraída de <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/jacob-daniela-2003-07-15/HTML/chapter6.html>).

Figura 3.7. Plásmido pCR8/GW/TOPO para el clonaje de fragmentos de ADN por recombinación mediante el sistema GATEWAY (<http://www.b2b.invitrogen.com>).

Figura 3.8. Plásmido binario pMDC32 para la transformación de arábidopsis, que emplea el sistema de clonaje GATEWAY, por recombinación con el vector TOPO (<http://genocon.org>).

Figura 3.9. Esquema del casete de transformación perteneciente al vector binario pMDC43 para la transformación de arábidopsis. Se trata de un plásmido que emplea el sistema de clonaje GATEWAY, por recombinación con el vector TOPO (Curtis y Grossniklaus, 2003).

Figura 3.10. Esquema del casete de transformación perteneciente al vector binario

pMDC83 para la transformación de *arabidopsis*. Se trata de un plásmido que emplea el sistema de clonaje GATEWAY, por recombinación con el vector TOPO (Curtis y Grossniklaus, 2003).

Figura 3.11. Plásmido pGPTVII/pUBQ10 para el clonaje de fragmentos de ADN bajo el control del promotor de ubiquitina 10 (Imagen cedida por el Prof. J. Kudla).

Figura 3.12. Plásmido binario pCAMBIA1303 empleado en la transformación de *arabidopsis* (<http://www.yrgene.com/product/vector/15791>).

Figura 3.13. Plásmido pGBKT7 empleado en el ensayo de doble híbrido en levadura (http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100004746).

Figura 3.14. Plásmido pACT2, empleado en el ensayo de doble híbrido en levadura (imagen extraída de <https://www.addgene.org/11343/>).

Figura 3.15. Diagrama del rastreo realizado en el presente trabajo. Observamos los apartados de los que consta un rastreo de mutantes de estas características.

Figura 3.16. Esquema correspondiente a la sección transversal de una hoja de *N. benthamiana* (<http://trabajandoporunmundoverde.blogspot.com.es/2010/03/tipos-de-hojas.html>).

Figura 3.17. Esquema del método de clonaje de la fusión génica entre diferentes fragmentos del promotor el gen *CtHSR1* al gen delator de la β -glucuronidasa. A) Esquema del clonaje inicial en el plásmido binario pBIN19. B) Esquema del clonaje de un fragmento de 2000pb del promotor de *CtHSR1* y el gen *GUS*. C) Esquema del clonaje del promotor completo de *CtHSR1* y el gen *GUS*.

Figura 3.18. Esquema del montaje para la realización de la transferencia de proteínas a filtros de membrana.

Figura 3.19. Diagrama de la primera reacción que tiene lugar durante la determinación de la concentración de prolina mediante el método colorimétrico. (Adaptado de http://es.wikipedia.org/wiki/Ninhidrina#mediaviewer/File:Ninhydrin_Reaction_Mechanism.svg).

Figura 3.20. Diagrama de la segunda reacción que tiene lugar durante la determinación de la concentración de prolina mediante el método colorimétrico. (Adaptado de http://es.wikipedia.org/wiki/Ninhidrina#mediaviewer/File:Ninhydrin_Reaction_Mechanism.svg).

Figura 4.1.1. Germinación en medio MS tras 7 días de cultivo, en placas suplementado con 0 (A), 3,5 (B), 4 (C), 4,5 (D), 5 (E) y 6 (F) mM de norespermidina para la colección del Dr. Chris Somerville y el Dr. Wolf Scheible.

Figura 4.1.2. Mutante putativo aislado en el rastreo primario a los 6 días de cultivo en medio MS suplementado con 6mM de NE para la colección de C. Somerville y W. Scheible.

Figura 4.1.3. Germinación en medio de cultivo MS de distintas líneas mutantes de la colección de K. Feldmann y su control silvestre (WS-2).

Figura 4.1.4. Germinación en medio de cultivo MS suplementado con el herbicida BASTA, de distintas líneas mutantes de la colección de INRA-Versailles tolerantes a NE (I1, I2, I34, I4, I3, I6, I170) y su control silvestre (WS-4).

Figura 4.1.5. Relación de tolerancia a BASTA/kanamicina, en las líneas mutantes seleccionadas para cada colección de mutantes.

Figura 4.1.6. Germinación en medio MS suplementado con 4mM de NE a los 7 días tras la siembra, de dos mutantes tolerantes a norespermidina (NE) y sus controles, para la colección de Weigel (Mutante W14 y su control silvestre COL-7) y para la colección de Feldmann (Mutante F9 y su control silvestre WS-2).

Figura 4.1.7. Porcentaje de germinación en medio MS suplementado con norespermidina (4mM) de las líneas mutantes seleccionadas para la colección de Somerville, y su control silvestre (COL-2), tras 5 días de cultivo. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.1.8. Porcentaje de germinación en medio MS suplementado con norespermidina (4mM) de las líneas mutantes seleccionadas para la colección de Feldmann, y su control silvestre (WS-2), tras 7 días de cultivo. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.1.9. Porcentaje de germinación en medio MS suplementado con norespermidina (4mM) de las líneas mutantes seleccionadas para la colección de INRA-Versailles, y su control silvestre (WS-4), tras 7 días de cultivo. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.1.10. Porcentaje de germinación en medio MS suplementado con norespermidina (4mM) de las líneas mutantes seleccionadas para la colección de Weigel, y su control silvestre (COL-7), tras 8 días de cultivo. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.1.11. A) Análisis Southern blot de los candidatos seleccionados para la colección de C. Somerville y W. Scheible, empleando la sonda 35S. B) Análisis Southern blot de los candidatos seleccionados para la colección de C. Somerville y W. Scheible, empleando la sonda BAR. COL-2: Control silvestre.

Figura 4.1.12. Análisis Southern blot de los candidatos seleccionados para la colección de INRA-Versailles, empleando la sonda GUS. WS-4: Control silvestre.

Figura 4.1.13. Análisis Southern blot de los candidatos seleccionados para la colección de Feldmann, empleando la sonda NOS. WS-2: Control silvestre.

Figura 4.1.14. Análisis Southern blot de los candidatos seleccionados para la colección de Weigel, empleando la sonda BAR. COL-7: Control silvestre. M: Marcador 1Kb. A: 1 minuto de exposición, B: 3 minutos de exposición.

Figura 4.1.15. Diferentes posibilidades para la inserción del T-DNA en la colección de Weigel, Somerville y Scheible (A) en el genoma. B) una sola inserción; C) dos inserciones en sentido opuesto “tipo 1”; D) dos inserciones en el mismo sentido; y E) dos inserciones en sentido opuesto “tipo 2”.

Figura 4.2.1. Estructura de la proteína codificada por el gen *CtHSR1* de *Candida tropicalis*, según la base de datos de Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), formada solamente por un dominio HSF. En la parte superior se muestran el tamaño de la proteína en aminoácidos.

Figura 4.2.2. Alineamiento múltiple del dominio de unión a ADN (DBD) de los factores de transcripción inducibles por choque térmico en arabisopsis con las proteínas HSF1 de levadura y *CtHSR1* de *Candida tropicalis*. Los colores indican las propiedades fisicoquímicas de las proteínas; el rojo, verde y azul corresponden a residuos hidrofóbicos, hidrofílicos y polares con carga, respectivamente. El asterisco (*) indica si hay alineamiento correcto entre los residuos, los dos puntos (:) indican residuos superpuestos con propiedades estructurales y fisicoquímicas similares, el punto (.) indica que no hay superposición entre todas las proteínas alineadas y la línea (-) indica que en esa posición no existen aminoácidos para ser alineados.

Figura 4.2.3. Alineamiento múltiple de los factores de transcripción inducibles por choque térmico en arabisopsis, con el factor HSF1 de levadura y el *CtHSR1* de *Candida tropicalis*, mostrando la región perteneciente al dominio de trimerización. Los colores indican las propiedades fisicoquímicas de las proteínas; el rojo, verde y azul corresponden a residuos hidrofóbicos, hidrofílicos y polares con carga, respectivamente. El asterisco (*) indica si hay alineamiento correcto entre los

residuos, los dos puntos (:) indican residuos superpuestos con propiedades estructurales y fisicoquímicas similares, el punto (.) indica que no hay superposición entre todas las proteínas alineadas y la línea (-) indica que en esa posición no existen aminoácidos para ser alineados.

Figura 4.2.4. Región genómica de 5,8kb, aislada en un rastreo de una genoteca para la identificación de genes de halotolerancia (modificado de Ali y col., 2001).

Figura 4.2.5. Análisis cualitativo de la expresión del gen *GUS*, bajo diferentes fragmentos reguladores de 2000 (A-F) y 3000 (G-L) pares de bases, del promotor del gen *CtHSRI* tras 7 días de desarrollo. A, E, F, H, J y L son hipocotilos; B y D muestran raíces; C, G, I y K muestran cotiledones.

Figura 4.2.6. Análisis cualitativo de la expresión del gen *GUS*, bajo el promotor completo de 3000 pares de bases del gen *CtHSRI* en diferentes estadios de desarrollo.

Figura 4.2.7. Observación de la expresión del gen *GUS* bajo el promotor del gen *CtHSRI* en raíz de arábidopsis mediante la técnica Nomarsky. A) Esquema de visualización de una sección transversal de raíz de arábidopsis. B) Fotografía Nomarsky de la sección longitudinal de raíz de arábidopsis con señal *GUS*. La barra indica una longitud de 50µm.

Figura 4.2.8. Observación al microscopio de la expresión del gen *GUS* bajo el promotor del gen *CtHSRI* en secciones transversales de tallo de arábidopsis. A) Esquema de una sección transversal de tallo floral en arábidopsis (Boyko y col., 2006). B) Sección transversal de tallo de arábidopsis de una línea control tras la realización de un ensayo de tinción *GUS*. C) Sección transversal de tallo de arábidopsis de una línea que expresa el gen *GUS* bajo el control del promotor de *Candida*, tras la realización de un ensayo de tinción *GUS*.

Figura 4.2.9. Observación al microscopio de la expresión del gen *GUS* bajo el promotor del gen *CtHSRI* en secciones transversales de hipocotilo de arábidopsis. A: estructura celular de una sección de hipocotilo de arábidopsis (Ilegems y col., 2010). B: Sección transversal de hipocotíleo de arábidopsis de una línea que expresa el gen *GUS* bajo el control del promotor de *CtHSRI*, tras la realización del ensayo histoquímico. Ph: floema, xy: xilema, p: periciclo, e: endodermis, c: cambium.

Figura 4.2.10. Análisis cuantitativo de la expresión del gen *GUS* inducido por el promotor de 3000 pares de bases del gen *CtHSRI* de *Candida*, bajo diferentes estímulos como NaCl, manitol y calor. Cada valor representa la media \pm SE de 3

replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.11. Análisis cualitativo de la localización subcelular del gen *CtHSRI* de *Candida tropicalis*, mediante microscopia confocal en células epidérmicas de *Nicotiana benthamiana*, transformadas con la construcción pMDC83-*CtHSRI*. Se muestra de izquierda a derecha la fluorescencia debida a la tinción de núcleos con DAPI, la fluorescencia de la proteína GFP, las fotografías tomadas en rango visible, y finalmente la combinación de las tres anteriores. Las barras indican una longitud de 50 μ m.

Figura 4.2.12. Electroforesis en gel de agarosa del producto de una PCR semicuantitativa del transgén *CtHSRI* para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo toda su región reguladora. COL-0: control silvestre. En esta reacción se ha utilizado como control endógeno el gen *PP2AA3*, uno de los tres genes que codifican la subunidad reguladora de 65kDa de la proteína fosfatasa PP2A. El producto de PCR fue amplificado durante 30 ciclos.

Figura 4.2.13. Caracterización fenotípica en relación con la tolerancia a sequia en las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo toda su región reguladora, respecto a su control silvestre. A) indica el peso fresco en condiciones control. B) indica el peso seco en condiciones control. C) indica el peso fresco tras el tratamiento de sequia. D) indica el peso seco tras el tratamiento de sequia. E) fotografía del aspecto de las plantas en condiciones control, antes de la toma de datos y F) fotografía del aspecto de las plantas tras el tratamiento de sequia, antes de la toma de datos. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.14. Análisis de aparición de cotiledones verdes tras la germinación para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo toda su región reguladora. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.15. Electroforesis en gel de agarosa del producto de una PCR semicuantitativa del transgén *CtHSRI* para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo el promotor de ubiquitina10. COL-0: control silvestre. En esta reacción se ha utilizado como control endógeno el gen *PP2AA3*, uno de los tres genes que codifican la subunidad reguladora de 65kDa de la proteína fosfatasa PP2A. El

producto de PCR fue amplificado durante 30 ciclos.

Figura 4.2.16. Caracterización fenotípica en relación con la tolerancia a sequía en las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo el promotor de ubiquitina10, respecto a su control silvestre. A) indica el peso fresco en condiciones control. B) indica el peso seco en condiciones control. C) indica el peso fresco tras el tratamiento de sequía. D) indica el peso seco tras el tratamiento de sequía. E) fotografía del aspecto de las plantas en condiciones control, antes de la toma de datos y F) fotografía del aspecto de las plantas tras el tratamiento de sequía, antes de la toma de datos. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.17. Análisis de aparición de cotiledones verdes tras la germinación para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo el control del promotor del gen *UBQ10*. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.18. Electroforesis en gel de agarosa del producto de una PCR semicuantitativa del transgén *CtHSRI* para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo el promotor constitutivo *35S*. COL-0: control silvestre. En esta reacción se ha utilizado como control endógeno el gen *PP2AA3*, uno de los tres genes que codifican la subunidad reguladora de 65kDa de la proteína fosfatasa PP2A. El producto de PCR fue amplificado durante 25 ciclos.

Figura 4.2.19. Caracterización fenotípica en relación con la tolerancia a sequía en las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo el promotor constitutivo *35S*, respecto a su control silvestre. A) indica el peso fresco en condiciones control. B) indica el peso seco en condiciones control. C) indica el peso fresco tras el tratamiento de sequía. D) indica el peso seco tras el tratamiento de sequía. E) fotografía del aspecto de las plantas en condiciones control, antes de la toma de datos y F) fotografía del aspecto de las plantas tras el tratamiento de sequía, antes de la toma de datos. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.20. Análisis de aparición de cotiledones verdes tras la germinación para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo el promotor constitutivo *35S*. Cada

valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.21. Ensayo de germinación en presencia de diferentes concentraciones de ácido abscísico para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor, y su control silvestre COL-0. Las medidas se tomaron a los 6 días después de la siembra. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. En ningún caso se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.22. Ensayo de crecimiento en presencia de 0 y $10 \mu\text{M}$ de ácido abscísico, para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor, y su control silvestre COL-0 durante 21 días de crecimiento. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su tratamiento control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.23. Ensayo de apertura estomática en ausencia y presencia de ácido abscísico, para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a las plantas control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.24. Medidas de la densidad y área estomática en condiciones normales, para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a las plantas control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.25. Contenido en ABA de las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor, respecto a su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 determinaciones biológicas, de COL-0 o de tres líneas independientes. No se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.26. Contenido en JA de las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor, respecto a su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 determinaciones biológicas, de COL-0 o de tres líneas independientes. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.27. Contenido en IAA de las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor, respecto a su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 determinaciones biológicas, de COL-0 o de tres líneas independientes. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.28. Medida del potencial osmótico en extractos de hojas de arábidopsis para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.29. Medida del contenido hídrico relativo en hojas de arábidopsis para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.30. Medida del contenido en sodio (A) y potasio (B), de extractos de hojas de arábidopsis en condiciones normales, para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.31. Medida del contenido en azúcares totales en extracto de hojas de arábidopsis para la línea 14-3 que expresa el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Se muestra un cromatograma típico de mediciones por HPLC, con los picos de absorción a diferentes tiempos (RT minutos), y en su interior se muestra una tabla con los datos obtenidos para cada línea analizada (mM). Estos datos son media \pm SE de 3 determinaciones biológicas.

Figura 4.2.32. Medida de la concentración de prolina en las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.33. Medida de la concentración de prolina tras tratamiento de sequía, en las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor y su control

silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.34. Análisis de expresión mediante qRT-PCR de los genes involucrados en el metabolismo de prolina, en las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.35. Comparación de los niveles de expresión de los genes de síntesis de prolina *P5CS1* y *P5CR*, respecto al nivel de expresión del gen de degradación de prolina *PDH2* en las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.36. Clasificación funcional de las categorías sobrerrepresentadas, como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor.

Figura 4.2.37. Validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real de algunos genes inducidos mediante el análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Figura 4.2.38. Comparación mediante diagramas de Venn de los genes inducidos, obtenidos como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, con los genes inducidos y reprimidos bajo tratamiento osmótico, inducido durante 3h con 300mM de manitol.

Figura 4.2.39. Comparación mediante diagramas de Venn de los genes inducidos, obtenidos como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, con los genes inducidos y reprimidos, bajo tratamiento oxidativo inducido por metil viológeno 10 μ M durante 3h.

Figura 4.2.40. Comparación mediante diagramas de Venn de los genes inducidos, obtenidos como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, con los genes inducidos y reprimidos, bajo tratamiento con calor inducidos durante 3h a 38°C.

Figura 4.2.41. Comparación mediante diagramas de Venn de los genes inducidos, obtenidos como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, con los genes inducidos (A) y reprimidos (B), bajo tratamiento con calor, osmótico y oxidativo, inducidos mediante los tratamientos anteriormente indicados.

Figura 4.2.42. Comparación mediante diagrama de Venn de los genes inducidos, obtenidos como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, con los genes inducidos mediante la pérdida de función del gen *WRKY33*, en arábidopsis.

Figura 4.2.43. Western blot para las colonias de la cepa AH109 que expresan el gen *CtHSR1*, mediante incubación con anticuerpos específicos para el epítopo myc. Se muestra también la tinción con Direct Blue, correspondiente con el control de carga.

Figura 4.2.44. Ensayo de crecimiento en medio SD sólido selectivo de las líneas control y el clon DH41 obtenido mediante el rastreo de doble híbrido en levadura. SD-2: Medio sólido SD sin leucina y triptófano. SD-3: Medio sólido SD sin leucina, triptófano e histidina. SD-4: Medio SD sólido sin leucina, triptófano, histidina y adenina.

Figura 4.2.45. Estructura de los dominios proteicos presentes en la proteína de 763 aminoácidos codificada por el gen At1g33680 de arábidopsis, según la base de datos de PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>).

Figura 4.2.46. Ensayo de crecimiento en medio sólido, de las líneas control y el clon DH41 obtenido mediante el rastreo de doble híbrido y el ensayo de doble híbrido dirigido con el clon DH41 en levadura. SD-2: Medio sólido SD sin leucina y triptófano. SD-3: Medio sólido SD sin leucina, triptófano e histidina. SD-4: Medio SD sólido sin leucina, triptófano, histidina y adenina.

Figura 5.1. Vías de señalización mediadas a través de ácido jasmónico y ácido abscísico. Extraído y adaptado de Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007.

Figura 5.2. Mecanismo de acción propuesto para la tolerancia a la sequía mediada por el *CtHSR1*.

INDICE DE ABREVIATURAS

35S	Promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor
AAA	Bombas de Protones asociadas a actividades celulares
ABA	Acido Abscísico
<i>abi2-1</i>	Mutante de una proteína fosfatasa insensible a ácido abscísico
AcLiTE	Acetato de litio, Tris-EDTA
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APS	Persulfato de amonio
APX1	Isoforma citosólica de una ascorbato peroxidasa
ARN	Ácido ribonucleico
AtGolS2	Galactinol sintasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin trifosfato
<i>BAR</i>	Gen de resistencia a BASTA
BASTA	Glufosinato de amonio
BLAST	Herramienta de alineamiento de secuencias
bZIP	Dominio básico de cremallera de leucinas
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
CAT1	Isoenzima catalasa
CDK	Kinasa dependiente de ciclina
cDNA	DNA complementario
CNGC	Canales activados por nucleótidos cíclicos
COI1	Receptor de ácido jasmónico
<i>coi1</i>	Mutante de pérdida de función del receptor de ácido jasmónico
Col	Ecotipo silvestre Columbia de <i>Arabidopsis</i>
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DAPI	Fluoroforo 4',6-diamidino-2-fenilindol
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
DBD	Dominio de unión a ADN
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
<i>DIN6</i>	Gen inducible por oscuridad, asociado a senescencia en <i>Arabidopsis thaliana</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreitol

dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EMS	Etil metano sulfonato
<i>ERD15</i>	Gen inducible por deshidratación en <i>Arabidopsis thaliana</i>
EtAcNa	Etanol Acetato de sodio
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación
GAL4	Factor de transcripción inducible por galactosa
GFP	Proteína verde fluorescente
GR1	Isoforma plastidial de una glutation reductasa
GUS	β glucuronidasa
H ⁺ -ATPasa	Bomba de Protones Protón-ATPasa
HPT II	Higromicina fosfotransferasa II
HSE	Elemento de unión de los factores de transcripción inducibles por choque térmico
HSF	Factor de transcripción inducible por choque térmico
HSF1	Factor de transcripción inducible por choque térmico de levadura
HSP	Proteínas inducibles por choque térmico
HSR	Proteínas con elevada homología a las proteínas inducibles por choque térmico
HSR1	Factor de transcripción relacionado con los HSF de <i>Candida tropicalis</i>
HTH	Dominio proteico de doble hélice
IAA	Ácido indolacético
ICK1	Inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas
INRA	Instituto Nacional de Investigación Agronómica (Francia)
J11	Proteína chaperona tipo J
JA	Ácido jasmónico
Kan	Kanamicina
KAT1	Transportador de potasio en <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>lap3</i>	Mutante de fosfatasa ácida 3 de baja actividad
LB	Borde izquierdo del T-DNA
LB	Medio rico de crecimiento de bacterias
LEA	Proteína abundante en la embriogénesis tardía
MAE	Tampón de electroforesis de RNA
MAP	Proteína quinasa activada en la mitosis
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico

MOPS	Ácido 2-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	ARN mensajero
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
<i>mtlD</i>	Gen que codifica una Manitol-1 fosfato deshidrogenasa de <i>Escherichia coli</i>
MU	Producto de hidrólisis de MUG 4-metilumbeliferona
MUG	Ácido 4-metilumbeliferil β -D-glucurónico
NADP ⁺	Forma oxidada de la Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Forma reducida de la Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Center
NE	Noespermidina
<i>nptII</i>	Gen de la neomicina fosfotransferasa II
OMG	Organismos modificados genéticamente
ONU	Organización de las Naciones Unidas
P5C	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato de <i>Arabidopsis thaliana</i>
P5CDH	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>
P5CR	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato reductasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>
P5CS	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>par1-1D</i>	Mutante dominante resistente a poliaminas 1-1
PCI	Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Prolina deshidrogenasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>
PEG	Polietilenglicol
PP2A	Proteína fosfatasa de tipo 2A
PP2AA3	Subunidad 3 de la proteína fosfatasa 2A
PSE	Tampón de hibridación de ácidos nucleicos
pst1	Mutante fotoautotrófico de tolerancia a sales
PVP	Polivinil Pirrolidona
QB	Tampón de extracción de proteínas para cuantificación de actividad GUS
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
QSO2	Quiescina sulfidril oxidasa 2
RB	Borde derecho del T-DNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rRNA	ARN ribosomal
SA	Ácido salicílico

SD	Medio mínimo de crecimiento de levaduras
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SE	Error estándar
<i>SEN1</i>	Gen asociado a senescencia en <i>Arabidopsis thaliana</i>
sHSP	Pequeñas proteínas de choque térmico
SIGnAL	Instituto de análisis genómicos Salk
SKOR	Canal de K ⁺ rectificador de salida de la estela
SOB	Medio rico de crecimiento de bacterias
SOC	Medio rico de crecimiento de bacterias SOC suplementado con glucosa
ssDNA	ADN de esperma de salmón
<i>sto1</i>	Mutante de tolerancia a la sal de <i>Arabidopsis thaliana</i>
TAE	Tampón de electroforesis de ácidos nucleicos con base de ácido acético
TAIR	Base de datos de <i>Arabidopsis</i>
TBE	Tampón de electroforesis de ácidos nucleicos con base de ácido bórico
TBS	Tampón salino para incubaciones con anticuerpo
TCES	Tampón de extracción de ARN
T-DNA	Fragmento que se integra durante la transformación de plantas mediante <i>A. tumefaciens</i>
TE	Tampón-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
T _m	Temperatura de anillamineto de híbridos de ácidos nucleicos
Tris	Hidroximetil amoniometano
<i>UBQ10</i>	Gen de síntesis de ubiquitina
WRKY	Familia de factores de transcripción de respuesta a estrés biótico y abiótico
WS	Wassilewskija
YNB	Sales nitrogenadas para el crecimiento de levadura
YPD	Medio rico de crecimiento de levaduras

RESÚMENES

RESUMEN

El estrés abiótico y más concretamente la salinidad y la sequía son problemas ambientales que poseen un gran impacto sobre la producción mundial de alimentos, especialmente en las zonas semiáridas, como es el caso de la Comunidad Valenciana. Durante los últimos años, numerosos estudios tratan de mitigar estos daños producidos sobre la agricultura, pero hasta el momento no ha habido grandes avances. En este momento se dispone de muy pocos cultivares agronómicos tolerantes a la salinidad y la sequía, por lo que es necesario seguir avanzando en el conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos que permiten superar estas condiciones de estrés.

Por ello, en este trabajo se inicia un estudio de genética directa, en el que a partir de diferentes colecciones de mutantes en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, se realiza un rastreo para identificar mutantes con tolerancia a cationes tóxicos. En nuestro caso, hemos planteado un abordaje mediante el uso de norespermidina a muy bajas concentraciones, una poliamina no metabolizable capaz de causar un efecto tóxico, pero no osmótico en nuestros ensayos. Se propone que este polication entra en la célula mediante algún sistema no identificado, pero fuertemente dependiente del potencial eléctrico de la membrana plasmática. Como este parámetro biofísico está determinado por las actividades relativas de la bomba H^+ -ATPasa, y del transporte de K^+ y aniones, la tolerancia a norespermidina permite identificar reguladores de todos estos transportadores. En el rastreo de mutantes se han empleado 109972 líneas mutantes (unas 700000 semillas) pertenecientes a 3 colecciones de mutantes de activación transcripcional y 2 colecciones de mutantes de pérdida de función en *Arabidopsis thaliana*. De esta forma, se han obtenido una gran cantidad de mutantes confirmados tolerantes a este polication, con porcentajes de germinación entre 2 y 6 veces la germinación de sus controles.

Además, también se ha realizado en esta tesis un estudio de genética reversa en sistema heterólogo utilizando el gen *CtHSR1* de *Candida tropicalis*, para evaluar el efecto de este factor de transcripción en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Este gen fue aislado en un rastreo para la identificación de genes de halotolerancia en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de una genoteca de la cepa NCYC2512 de *Candida tropicalis*. Mediante la obtención de plantas sobreexpresoras del gen *CtHSR1* bajo su propia región reguladora, hemos podido caracterizar un nuevo mecanismo de tolerancia a la sequía mediado por el factor CtHSR1. Estas plantas mostraron

tolerancia en estadios tempranos de desarrollo a la germinación inhibida por NaCl y manitol, así como tolerancia a la sequía inducida durante 14 días en invernadero en plantas adultas. También se observaron diferencias en el potencial osmótico en condiciones normales de crecimiento en las líneas transgénicas, lo que nos llevo a identificar un aumento del contenido en prolina de entre 1,4 y 1,8 veces, respecto a su control silvestre. Además, el análisis transcriptómico y la cuantificación hormonal de las líneas que expresan el factor CtHSR1 revelaron la activación de múltiples factores de transcripción de respuesta a estrés, así como un aumento en el contenido total de ácido jasmónico, hormona involucrada en la tolerancia frente al estrés biótico.

Por lo tanto, el trabajo realizado en esta tesis doctoral supone un avance en la identificación de nuevos componentes en las vías de regulación de la tolerancia al estrés abiótico en plantas.

RESUM

L'estrés abiòtic i concretament la salinitat i la sequera són problemes ambientals que posseïxen un gran impacte sobre la producció mundial d'aliments, especialment en les zones semiàrides, com és el cas de la Comunitat Valenciana. Durant els últims anys, nombrosos estudis tracten de disminuir estos danys produïts sobre l'agricultura, però fins al moment no han hagut grans avanços. En este moment es disposa de molt pocs cultius agronòmics tolerants a la salinitat i la sequera, per la qual cosa és necessari continuar avançant en el coneixement de les bases moleculars dels mecanismes que permeten superar estes condicions d'estrés.

Per això, en este treball s'inicia un estudi de genètica directa, en el que a partir de diferents col·leccions de mutants en l'espècie model *Arabidopsis thaliana*, es realitza un rastreig per a identificar mutants amb tolerància a cations tòxics. En el nostre cas, hem plantejat un abordatge per mitjà de l'ús de noespermidina a molt baixes concentracions, una poliamina no metabolitzable capaç de provocar un efecte tòxic, però no osmòtic en els nostres assajos. Es proposa que este policatió entra en la cèl·lula per mitjà d'algun sistema no identificat, però fortament dependent del potencial elèctric de la membrana plàsmica. Com este paràmetre biofísic està determinat per les activitats relatives de la bomba H⁺-ATPasa, i del transport de K⁺ i anions, la tolerància a noespermidina permet identificar reguladors de tots estos transportadors. En el rastreig de mutants s'han emprat 109972 línies mutants (unes 700000 llavors) pertanyents a 3 col·leccions de mutants d'activació transcripcional i 2 col·leccions de mutants de pèrdua de funció en *Arabidopsis thaliana*. D'esta manera, s'ha obtingut una gran quantitat de mutants confirmats tolerants a este policatió, amb percentatges de germinació entre 2 i 6 vegades la germinació dels seus controls.

A més, també s'ha realitzat en esta tesi un estudi de genètica reversa en sistema heteròleg utilitzant el gen *CtHSR1* de *Candida tropicalis*, per avaluar l'efecte d'este factor de transcripció en l'espècie model *Arabidopsis thaliana*. Este gen va ser aïllat en un rastreig per a la identificació de gens de halotolerància en el rent *Saccharomyces cerevisiae*, a partir d'una genoteca del cep NCYC2512 de *Candida tropicalis*. Per mitjà de l'obtenció de plantes sobreexpresores del gen *CtHSR1* baix la seua pròpia regió reguladora, s'ha pogut caracteritzar un nou mecanisme de tolerància a sequera regulat pel factor CtHSR1. Estes plantes van mostrar tolerància a la germinació inhibida per NaCl i manitol, així com tolerància a sequera induïda durant 14 dies en plantes

adultes crescudes en hivernacle. També es van observar diferències en el potencial osmòtic en condicions normals de creixement en les línies transgèniques, la qual cosa ens porta a identificar un augment del contingut en prolina d'entre 1,4 i 1,8 vegades, respecte al seu control silvestre. A més, l'anàlisi transcriptòmic i la quantificació hormonal de les línies que expresen el factor CtHSR1 van revelar l'activació de múltiples factors de transcripció de resposta a estrés, així com un augment en el contingut total d'àcid jasmònic, hormona involucrada en la tolerància front a l'estrés biòtic.

Per tant, el treball realitzat en esta tesi doctoral suposa un avanç en la identificació de nous components en les vies de regulació de la tolerància a l'estrés abiòtic en plantes.

ABSTRACT

Abiotic stress, and more specifically salinity and drought, are environmental problems that have huge impact on global food production, especially in semi-arid areas such as the Mediterranean countries including the Valencia region. Little progress has been made in the development of crops tolerant to drought and salinity. The problem has two aspects: tolerance to toxic cations such as sodium and tolerance to osmotic stress.

In order to approach the first one we have screened tagged-mutant collections in the model plant *Arabidopsis thaliana* to identify lines tolerant to toxic cations. We have used as toxic cation norspermidine, a non-physiological polyamine that only acts as a toxic cation because it has no osmotic effects at the concentrations employed. This polycation enters the cell through unidentified system strongly dependent on the electrical potential of the plasma membrane. As this biophysical parameter is determined by the relative activities of the H⁺-ATPase pump and secondary ion transport of K⁺ and anions, norspermidine tolerant mutants could allow us to identify regulators of these transporters. We have screened 110,000 mutant lines (around 700,000 seeds) from 3 transcriptional activation mutant collections and 2 loss of function mutant collections in *Arabidopsis thaliana*. In this way, we have obtained numerous confirmed mutants tolerant to this polycation, with 2 - 6 fold germination percentage than the control line.

In order to approach tolerance to osmotic stress, we have expressed the *CtHSR1* gene from *Candida tropicalis* in the model plant *Arabidopsis thaliana* to evaluate its effect on plant drought tolerance. This gene was isolated from a gene library of *Candida tropicalis* strain NCYC2512 by screening for the identification of halotolerant genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arabidopsis* transgenic plants expressing *CtHSR1* from its own promoter exhibited tolerance to osmotic stress in two different assays: seed germination inhibited by NaCl and manitol and drought tolerance of adult plants in the greenhouse. Differences in osmotic potential were observed under normal growth conditions in the transgenic lines and we measure an increase in proline content between 1.4 and 1.8 fold, compared to control plants. Transcriptomic analysis indicated that *CtHSR1* induces multiple transcription factors involved in response to stress. Hormone analysis detected an increase of jasmonic acid, hormone involved in biotic stress tolerance.

INTRODUCCIÓN

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Importancia de la biotecnología

A medida que la población mundial aumente durante la primera mitad de este siglo, hasta alcanzar los 9000 millones de personas aproximadamente (Tabla 1.1; ONU, 2007), la demanda mundial de alimentos se duplicará, con el problema de que al mismo tiempo los cultivos podrían usarse también para producir bioenergía y para otros fines industriales (Figura 1.1; FAO, 2002).

Tabla 1.1. Crecimiento de la población mundial durante el periodo comprendido entre 1950 y 2050. Población mundial, desglosada por principales grupos de desarrollo, zonas y por variante de proyección (ONU, 2007).

	Población			Población en 2050			
	(en millones de hab.)			(en millones de hab.)			
Zonas principales	1950	1975	2007	Baja	Media	Alta	Constante
Mundo	2535	4076	6671	7792	9191	10756	11858
Regiones desarrolladas	814	1048	1223	1065	1245	1451	1218
Regiones en desarrollo	1722	3028	5448	6727	7946	9306	10639

La demanda de productos agrícolas producirá como resultado una presión creciente sobre los ya escasos recursos agrícolas. En ese momento, la agricultura se verá obligada a competir con los núcleos urbanos en crecimiento por la tierra y el agua, así como también tendrá que ser de utilidad en otros grandes frentes: la adaptación al cambio climático, la ayuda para conservar los hábitats naturales, la protección de especies en peligro de extinción y el mantenimiento de un alto nivel de biodiversidad (FAO, 2009).

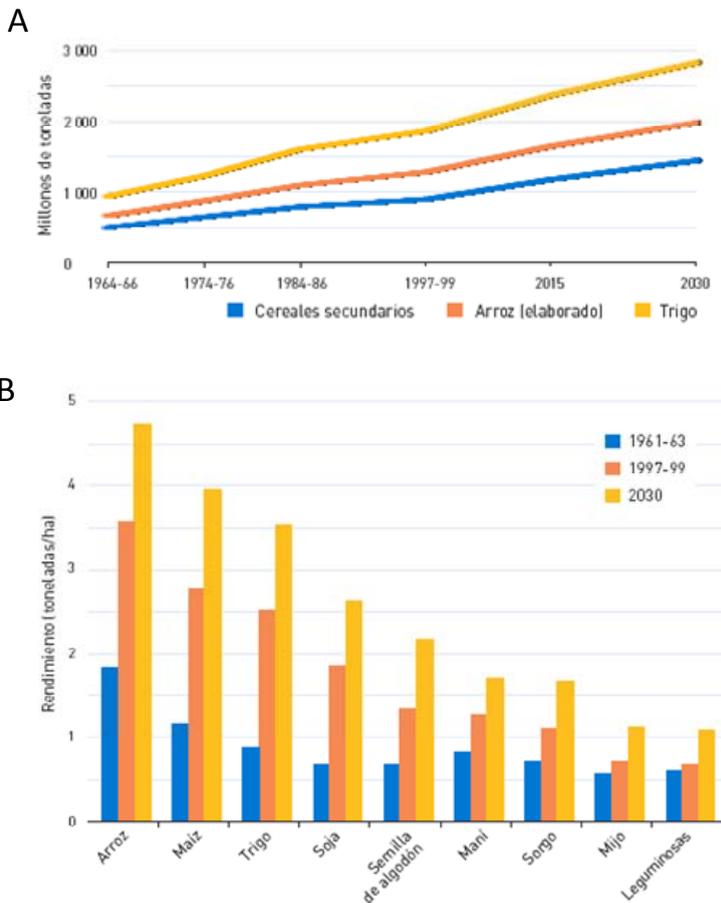


Figura 1.1. Perspectiva en la demanda mundial de alimentos entre el periodo comprendido entre el 1964 y el 2030 (A) y perspectiva de la producción mundial de alimentos entre el periodo comprendido entre el 1961 y el 2030 (B) (FAO, 2002).

Como si eso no fuera suficientemente difícil, en la mayoría de las regiones la población disminuirá en las zonas rurales y un número incluso menor se dedicará a la agricultura. Por lo tanto, serán precisas nuevas tecnologías para producir más en una superficie menor de tierra, con menos mano de obra (FAO, 2009), ya que en la actualidad, numerosos países ya necesitan asistencia alimentaria (Figura 1.2; FAO, 2011).

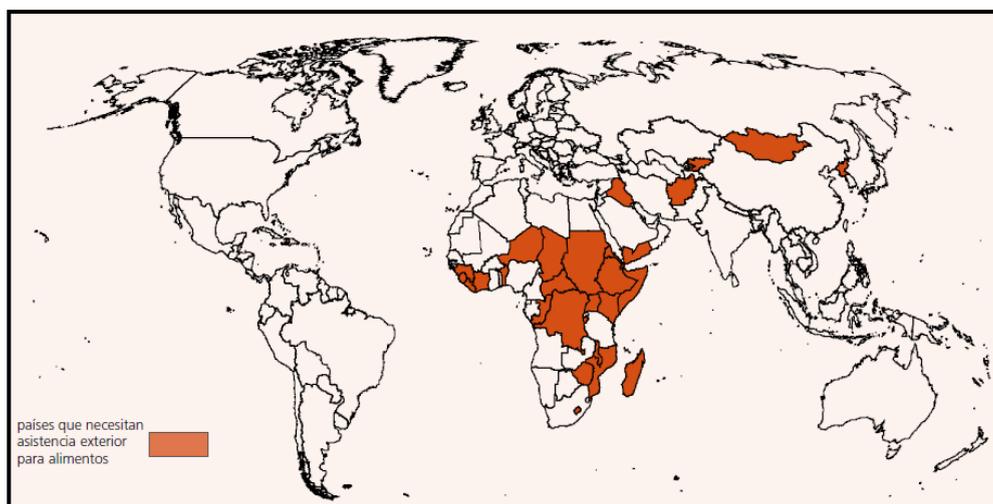


Figura 1.2. Perspectivas de cosechas y situación alimentaria (FAO, 2011).

El aumento de la tierra cultivada, el incremento de la frecuencia de las cosechas (mediante riego) y el aumento de los rendimientos son tres mecanismos empleados para el aumento de la producción en los cultivos, aunque parece que todos están llegando a su límite.

A lo largo de la historia, el hombre ha introducido mejoras en las plantas de cultivo a través de la selección, mejora de vegetales y la hibridación (como la polinización controlada de plantas). La biotecnología vegetal es una extensión de esta tradición con una diferencia muy importante, ya que permite la transferencia de una mayor cantidad de información genética de una manera más precisa, controlada y en un periodo menor de tiempo.

Al contrario que el método tradicional de mejora de plantas, que incluía el cruce incontrolado de cientos o miles de genes, la biotecnología vegetal permite la transferencia selectiva de un gen o unos pocos genes deseables. Gracias a su mayor precisión, esta técnica permite que los mejoradores puedan desarrollar variedades con caracteres específicos y sin incorporar aquellos no deseables.

Muchos de estos caracteres introducidos en las nuevas variedades proporcionan a las plantas resistencia a insectos y enfermedades que pueden destruir el cultivo. Otros incorporan mejoras tanto nutricionales como organolépticas, por ejemplo tomates con un contenido mayor de sólidos solubles o semillas oleaginosas que producen aceites con un contenido menor de grasas saturadas.

Estas mejoras en los cultivos pueden contribuir a producir una abundante oferta de alimentos y a proteger nuestro medio ambiente para las futuras generaciones.

Y yo me pregunto: ¿por qué cuando algunas personas oyen hablar de biotecnología o de organismos modificados genéticamente (en adelante OMGs), sienten que algo “no va bien”? Debe ser que la desinformación ha contribuido a crear una fuerte oposición frente a los transgénicos.

En primer lugar hay que entender que la biotecnología se define como una aplicación tecnológica que utiliza o manipula organismos vivos, o sus derivados, para la obtención de productos o procesos de valor para el ser humano.

Este año se cumple el 19º aniversario de la comercialización de OMGs, que se plantaron por primera vez en 1996. Los considerables beneficios económicos, ambientales y sociales que ofrece este tipo de cultivos ha llevado a millones de agricultores de todo el mundo a seguir aumentando la superficie agrobiotecnológica.

Se ha avanzado en varios frentes importantes: la superficie acumulada de 1996 a 2010 alcanzó un hito mundial histórico; el número de hectáreas agrobiotecnológicas registró un importante incremento interanual (Figura 1.3); se alcanzó el récord de países productores de cultivos biotecnológicos; y aumentó el número de agricultores que plantaron este tipo de cultivos en todo el mundo; la cifra de crecimiento mundial refleja una mayor estabilidad y confianza en la adopción de los OMGs, ya que se han establecido de manera permanente (James, 2010).

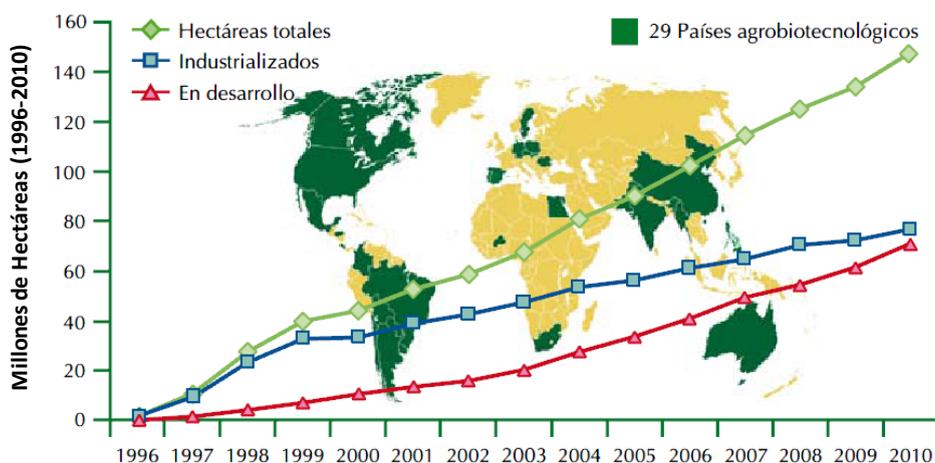


Figura 1.3. Superficie agrobiotecnológica mundial en el periodo 1996-2010 (James, 2010).

Estos datos son muy importantes, puesto que los OMGs ya contribuyen a resolver algunos de los principales problemas que se plantean en la sociedad actual, como la seguridad y la autosuficiencia alimentaria, la sostenibilidad, la lucha contra la pobreza y el hambre, y la mitigación de algunos de los retos asociados al cambio climático y al calentamiento global. Los OMGs encierran un enorme potencial de cara al futuro (James, 2010).

1.2- El concepto de estrés abiótico

Definimos como estrés abiótico a los efectos sobre el metabolismo celular, que provocan una alteración sobre la fisiología y el desarrollo de las plantas. Este tipo de estrés está producido principalmente por factores ambientales tales como la luz, la temperatura, el agua y la concentración de iones en el suelo, y contribuyen junto a otros factores a la degradación del suelo impidiendo su uso como tierras cultivables (Figura 1.4).

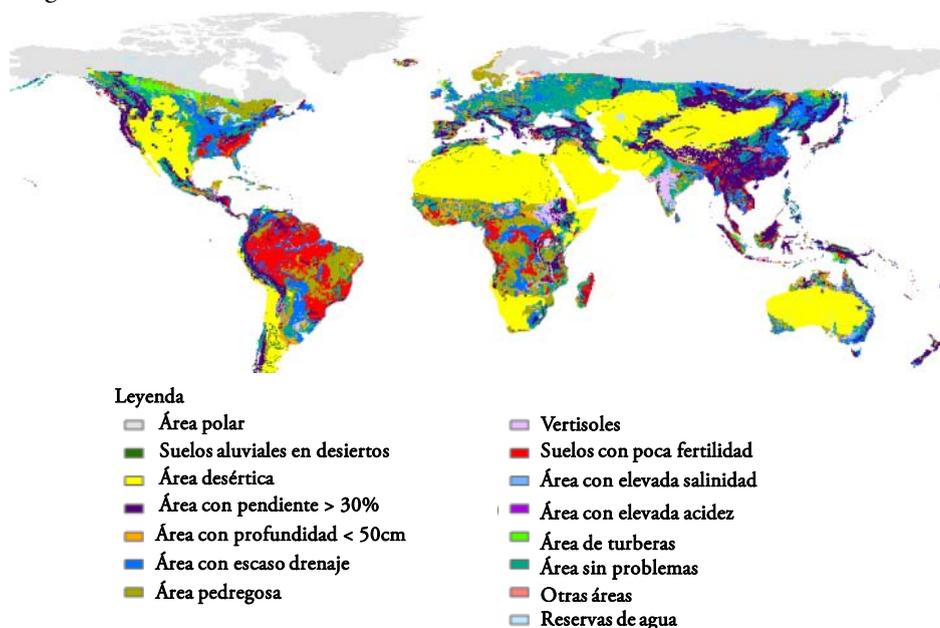


Figura 1.4. Mapa mundial mostrando las principales causas de degradación del suelo (FAO, 2007a).

La salinidad de los suelos, junto con la sequía y la temperatura, son factores abióticos que conllevan graves consecuencias para la agricultura, ya que limitan la producción de los cultivos e impiden el potencial uso agrícola de suelos no cultivados, o contaminados previamente (Flowers, 2004).

1.2.1- El problema de la salinidad

Un suelo se define como salino cuando la conductividad eléctrica del extracto de saturación es de al menos 4dS/m, lo que equivale a una concentración de NaCl (la sal más común en los suelos) de 40mM que genera una presión osmótica de 0,2MPa (Munns y Tester, 2008). La salinidad afecta a $\sim 10^9$ ha de la superficie terrestre total (Tester y Davenport, 2003), habiéndose estimado que un 20% de la superficie agrícola y un 50% de la superficie de regadío se encuentran salinizadas (Yokoi y col., 2002; Figura 1.5).

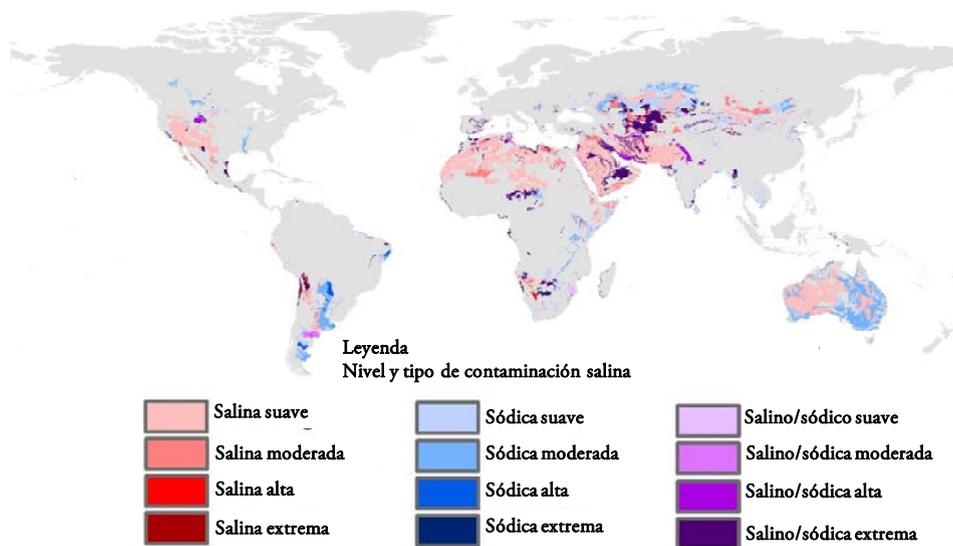


Figura 1.5. Mapa mundial mostrando los suelos afectados por diferentes tipos y niveles de contaminación salina (www.clubgreen.nl).

La salinización de los suelos se produce de forma natural por la meteorización de rocas o por la deposición de sales oceánicas arrastradas con el viento y el agua (Munns y Tester, 2008). En regiones áridas y semiáridas, la alta insolación y la baja pluviometría contribuyen a concentrar las sales en el suelo y sólo mediante el cultivo en regadío se puede mejorar la productividad agrícola. También existe una contaminación antrópica, que puede ser resultado de unas malas prácticas agrícolas, o de la sobreexplotación de los recursos hídricos, produciendo el fenómeno conocido como intrusión salina.

Una posible solución al problema de la baja productividad de los cultivos en suelos salinos es el uso de cultivares halotolerantes. En la naturaleza existen especies halófitas, que resisten concentraciones salinas de hasta 500mM, y glicófitas, que son sensibles a alta salinidad e incluyen a la mayoría de especies cultivadas. En general, ambos tipos de especies comparten mecanismos de resistencia a estrés osmótico y sólo se diferencian en el perfil de expresión de los genes implicados. Por ejemplo, la especie halófito *Thelungiella halophila* O.E. Schultz, cuyo genoma muestra una homología del 90-95% con el de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heinh (en adelante arabidopsis), expresa constitutivamente más de 40 genes que en arabidopsis sólo se expresan en condiciones de estrés (Taji y col., 2004).

La investigación en mejora de la tolerancia al estrés abiótico se dirige a la mejor comprensión de los efectos causados por el estrés, tanto a nivel celular como de organismo completo, así como de las respuestas adaptativas de las plantas frente a dicho estrés. Para ello es necesario identificar tanto los componentes que determinan la tolerancia, como los elementos reguladores de éstos.

1.2.2- El problema de la sequía

La Tierra posee aproximadamente 1400 millones de km³ de agua, de los que solo un 0,003% es considerado como recursos disponibles, pudiendo ser utilizados para uso doméstico, agricultura o industria. La agricultura es la actividad con mayor requerimiento, siendo en torno al 70% del agua disponible. Por ejemplo, una tonelada de cereal necesita un aporte de agua durante su desarrollo de entre 1000 y 3000 m³ (FAO, 2007b). Por este motivo, la falta de agua es una de las principales limitaciones para la productividad de los cultivos, ya que los suelos semisecos o secos, constituyen el 41,3% de la superficie mundial terrestre (Figura 1.6).

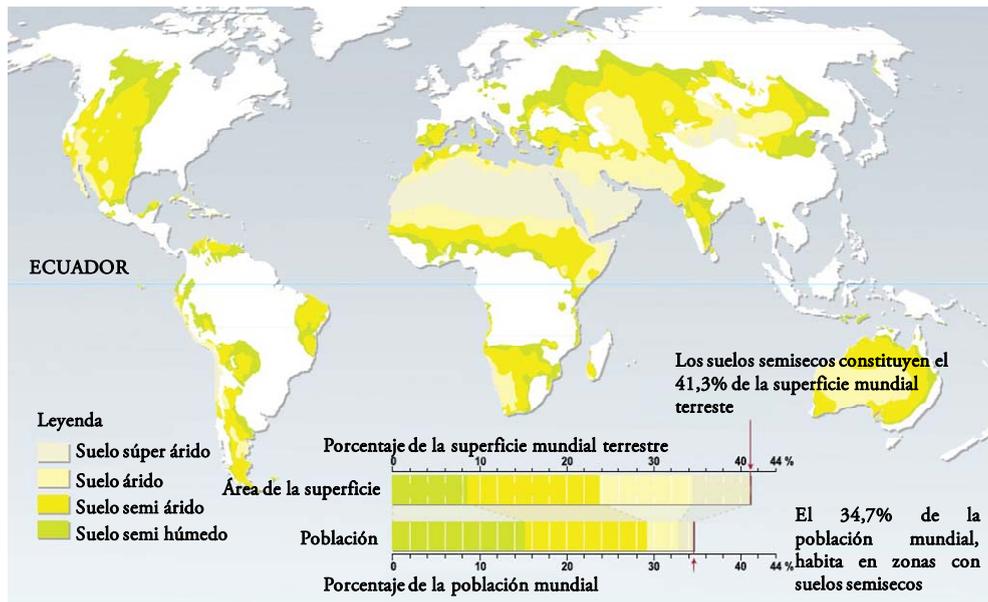


Figura 1.6. Mapa mundial mostrando la distribución geográfica de los suelos con escasez de agua, desde súper áridos hasta semi húmedos (MA, 2005).

En el trabajo realizado por Meigs (1953), se desarrollo un sistema de clasificación en el que se consideraban zonas extremadamente áridas, aquellas en las que hubieran doce meses seguidos sin lluvias, zonas áridas en las que las precipitaciones anuales fueran menores a 250mm, y regiones semiáridas, en las que las lluvias anuales fueran entre 250 y 500mm. En la actualidad, uno de los indicadores más conocidos para la sequía es el índice Falkenmark (Falkenmark, 1989). Este índice se define como la cantidad de agua renovable per capita, disponible para uso humano. Basado en el uso del agua *per capita*, este índice establece 4 categorías denominadas sin estrés, con estrés hídrico, con sequía, y absolutamente seco (Tabla 1.2; Falkenmark y Widstrand, 1992).

Tabla 1.2. Definición gradual del nivel de sequía (Adaptada de Falkenmark y Widstrand, 1992).

Agua renovable (m ³ /persona.año)	Nivel de sequía
<500	Sequía absoluta
500 – 1000	Escasez crónica de agua
1000 - 1700	Estrés hídrico normal
>1700	Estrés hídrico ocasional

Esta clasificación de la escasez de agua se basa principalmente en estimaciones del número de personas que pueden vivir razonablemente con una determinada cantidad de recursos hídricos. Este indicador es ampliamente utilizado porque se puede calcular fácilmente para todos los países del mundo y en todos los años, gracias a la base de los datos sobre recursos hídricos (FAO- AQUASTAT, 2013) y de población (ONU, 2009).

La mayoría de las plantas necesitan agua disponible para un correcto crecimiento y desarrollo, pero existen especies capaces de soportar ciertos niveles de sequía. Esto permite clasificar las especies según el grado de tolerancia a diferentes niveles de humedad, desde los ambientes acuáticos (hidrófitas) hasta los áridos (xerófitas). La mayoría de especies cultivadas necesitan un nivel bajo de humedad pero de forma continuada (mesófilas), bien porque son incapaces de mantener el contenido hídrico celular, o porque carecen de un sistema radicular apropiado para suelos semiáridos.

Normalmente, las plantas toleran niveles de deshidratación aproximadamente del 30%, pudiendo recuperar su contenido hídrico sin efectos irreversibles sobre su desarrollo. Las especies que toleran la sequía, pueden sobrevivir con unos niveles de deshidratación del 90% aproximadamente, hidratándose correctamente después cuando hay agua para continuar con su desarrollo.

Una especie muy estudiada como modelo para la tolerancia a la sequía es *Craterostigma plantagineum*, también conocida como la planta de resurrección (Bartels y Salamini, 2001). La diferencia entre esta especie tolerante a la sequía y otras especies sensibles, como por ejemplo *arabidopsis*, no parece ser la presencia de genes diferenciales entre ambas especies, sino el patrón de expresión de dichos genes (Hilbricht y col., 2002, Deng y col., 2002).

1.2.3- El problema de la temperatura

Las temperaturas superiores o inferiores a la óptima, tienen como consecuencia directa una reducción en el crecimiento que puede llegar a provocar incluso la muerte celular. Esto se debe a diferentes factores entre los que se encuentran la pérdida de la homeostasis celular y la alteración de los lípidos de membrana. Estos cambios en la membrana plasmática, provocan mayor fluidez de la misma, interfiriendo en procesos celulares. Además, a elevadas temperaturas, se produce una disminución en la funcionalidad de muchas proteínas, llegando incluso a desnaturalizarlas. La alteración proteica y de membrana, induce la producción de especies reactivas de oxígeno, que provocan en la célula daño oxidativo que se traduce finalmente en una reducción de la eficiencia fotosintética, así como una reducción en la fijación de CO₂ (Larkindale y col., 2005).

El conocimiento de la respuesta de las plantas al estrés térmico comenzó con el trabajo de Ritossa (1962), empleando la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Ritossa observó que tras aumentar la temperatura, aparecían engrosamientos en cromosomas politénicos de células de glándulas salivales de la mosca de la fruta. Diez años después, Tissieres y colaboradores (1974), descubrieron que dichos engrosamientos eran debidos a cambios transcripcionales que permitieron identificar las proteínas de choque térmico o HSPs (del inglés, *Heat Shock Proteins*). Muchas de estas proteínas de choque térmico poseen función chaperona y ayudan en el plegamiento de otras proteínas recién sintetizadas para alcanzar una correcta funcionalidad (Boston y col., 1996). En los últimos años, se ha observado que la respuesta celular frente al estrés térmico no solo es llevada a cabo por HSPs, sino que intervienen múltiples vías de señalización mediadas por hormonas [como el ABA(ácido abscísico), ácido salicílico o etileno], cationes (Ca²⁺) o compuestos reactivos del oxígeno (H₂O₂; Figura 1.7; Sachin y col., 2007).

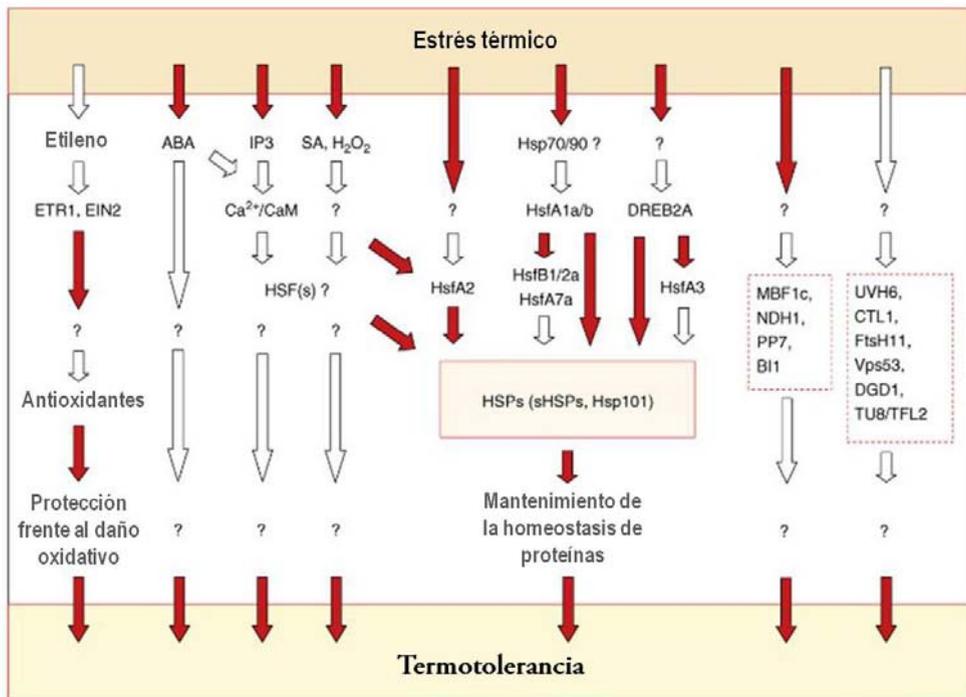


Figura 1.7. Mecanismos de acción y respuesta al estrés térmico (Adaptada de Sachin y col., 2007).

1.2.3.1- Proteínas de choque térmico

Los primeros estudios realizados revelaron la importancia de las proteínas de choque térmico principalmente por dos razones: se encuentran altamente conservadas en la mayoría de organismos, y muchas de ellas son esenciales para el funcionamiento celular (Schlesinger, 1990). Estas proteínas se clasifican según su peso molecular en kDa, y podemos encontrar las HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y proteínas con un menor peso denominadas sHSP (del inglés, *small Heat Shock Proteins*) (Vierling, 1991).

La familia HSP70 de levadura es la más estudiada, y comprende 9 miembros que se localizan en tres compartimentos celulares diferentes; núcleo, mitocondria y retículo endoplasmático. Estas proteínas, son necesarias para la traslocación de proteínas sintetizadas en el citoplasma hasta compartimentos como la matriz mitocondrial, retículo endoplasmático, cloroplasto o lisosoma (Schlesinger, 1990).

Las proteínas HSP60s fueron las primeras proteínas denominadas “chaperonas moleculares”, y se encuentran principalmente en cloroplastos y mitocondrias. Una de las funciones que desarrollan en el cloroplasto es la de ayudar en el correcto ensamblaje de la Rubisco, holoenzima compuesta por 16 subunidades (Vierling, 1991).

El tercer grupo de proteínas es el de las HSP90s, que son altamente fosforiladas en residuos de serina y treonina, y se localizan principalmente en el citoplasma. Algunas de ellas están asociadas a las proteínas que conforman el citoesqueleto, actina y tubulina, y aunque su función no ha sido identificada, su actividad chaperona podría explicar dicha interacción (Schlesinger, 1990).

Las más grandes son las HSP100, que son hexámeros de proteínas tipo AAA (del inglés *ATPases Associated with diverse cellular Activities*), con capacidad de unión e hidrólisis de ATP, e involucradas en la remodelado de proteínas (Neuwald y col., 1999), mientras que las sHSP son las más pequeñas, con un peso molecular entre 16 y 42kDa, que forman complejos oligoméricos de 200 a 750kDa (Van Montfort y col., 2002).

Todas estas proteínas de respuesta a estrés térmico se transcriben en todos los organismos eucariotas del mismo modo. En los promotores de estas HSPs, existen elementos reguladores de la respuesta transcripcional al estrés térmico (en adelante HSE, del inglés *Heat Shock Element*), que son reconocidos por factores de transcripción altamente conservados que se denominan HSFs (del inglés, *Heat Shock Factor*; Nover y col., 2001).

1.2.3.2- Factores de transcripción de choque térmico

Como hemos visto, la respuesta frente al estrés térmico es mediada a través de HSFs, que reconocen elementos del ADN en los promotores de las proteínas de choque térmico. Estos elementos de unión denominados HSE, fueron descritos como una secuencia palindrómica de 5 nucleótidos nGAAn identificada en el promotor de la HSP83 de *Drosophila* (Sorger, 1991; Figura 1.8).

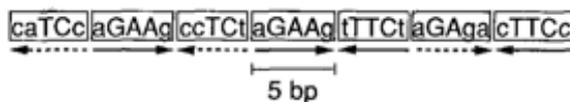


Figura 1.8. Elemento HSE de unión al ADN (Sorger, 1991).

En arábidopsis, existen 21 HSFs, que se clasifican en 3 subclases: A, B y C (Figura 1.9). Aunque la presencia de estos factores de transcripción en plantas es muy superior que en otros organismos como vertebrados, donde solo existen cuatro HSFs, en *Drosophyla melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* solo existe un HSFs, o en el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la que solo se encuentra un HSFs y 3 proteínas con elevada homología denominadas HSR (del inglés, *Heat Shock Related*), su estructura se encuentra conservada en eucariotas.

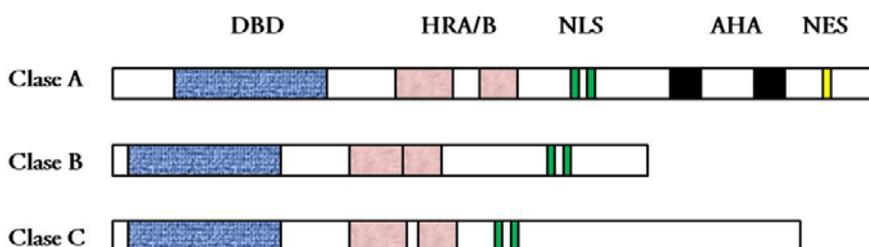


Figura 1.9. Estructura de los HSF y de los dominios presentes en los factores de la clase A, B y C de arábidopsis. DBD: dominio de unión a ADN. HRA/B: dominio de trimerización. NLS: dominio de localización nuclear. AHA: dominio de activación transcripcional. NES: dominio de exportación nuclear (Adaptada de Nover y col., 2001).

En el extremo N-terminal, se encuentra el dominio de unión a ADN o DBD (del inglés, *DNA Binding Domain*), compuesto por 3 hélices alfa, y 4 láminas beta. La parte hidrófoba de esta estructura, asegura un correcto posicionamiento del dominio HTH (del inglés, *Helix Turn Helix*), necesario para el reconocimiento del HSE (Nover y col., 2001). Otra de las características principales en la estructura de los factores de transcripción inducibles por choque térmico, es su naturaleza oligomérica. En el trabajo de Sorger y Nelson (1989) donde estudiaron el factor de transcripción HSF1 de *Saccharomyces cerevisiae*, observaron que esta proteína formaba trímeros cuando se encontraba en solución o unida a ADN. Esta estructura, al igual que el motivo estructural conocido como cremallera de leucina, se basa en la presencia de una leucina (aminoácido hidrófobo) cada 7 residuos. En plantas, este dominio se encuentra en el extremo C-terminal del DBD, y ambos dominios se encuentran unidos mediante una zona flexible con una longitud de 9 a 39 residuos aminoacídicos para la clase A, de entre 50 y 78 para la clase B, y de 14 a 49 para la clase C. El dominio de trimerización posee una estructura específica dependiendo de la clase a la que pertenezca.

De este modo, los dominios de trimerización de los HSFs de la clase B, poseen una estructura similar al resto de factores de transcripción de otras especies, mientras que los pertenecientes a la clase A y C, poseen una mayor longitud, incorporando secuencias aminoacídicas de 21 y 7 residuos, respectivamente (Nover y col., 2001; Figura 1.9). La formación de trímeros permite una mayor afinidad entre el HSF y HSE, ya que la zona de contacto entre proteína/ADN aumenta (Sorger, 1991; Figura 1.10).



Figura 1.10. Modelo de interacción entre los trímeros formados entre los HSF y la secuencia diana de los HSE (Adaptada de Morimoto y col., 1990).

1.2.3.3- Proteínas con elevada homología a proteínas inducibles por choque térmico

Tal y como se describe en el apartado anterior, los factores de transcripción activados por choque térmico poseen unos dominios concretos necesarios para su correcta funcionalidad, como es el DBD y el dominio de trimerización. De igual forma, existen proteínas que poseen una elevada homología de secuencia con estos HSF, pero no en todos sus dominios a las que se denominan HSR (del inglés, *Heat Shock Related*; Landsman y Wolffe, 1995). En esta tesis doctoral, se ha empleado una proteína con elevada homología al DBD de los HSFs, concentrada principalmente en los primeros 80 aminoácidos desde el extremo C-terminal llamada CtHSR1 (del inglés, *Heat Shock Related 1*; Ali y col., 2001). En este caso, a diferencia del resto de factores de transcripción de respuesta a calor, carece del dominio de trimerización propio de estos factores, por lo que la afinidad al HSE se verá disminuida, y quizás sea necesaria la interacción con otras proteínas para unirse al ADN y activar la transcripción.

Se han identificado diferentes proteínas HSR, involucradas en procesos celulares importantes como la importación postraduccional de P5CS (Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintasa) en levadura (Hiroshi y col., 1988) y en la relajación de músculos lisos de tráquea y arteria carótida dependiente de nucleótidos cíclicos en vacas (Arthur y col., 1997). También se han identificado proteínas HSR inhibitoras de la proliferación tumoral, inducida mediante metilcolantreno, un inductor tumoral químico en ratones (Ullrich y col., 1986). Además, la familia de factores de transcripción ETS compuesta por 29 genes en humanos y 28 en ratón, poseen un dominio de unión al ADN con elevada homología al de los HSFs. Estos factores de transcripción ETS, están involucrados en numerosos procesos biológicos como el desarrollo de diferentes tejidos, la activación y crecimiento de los linfocitos T y la progresión del cáncer (Lansmann y Wolffe, 1995).

Por lo tanto, parece que existen multitud de proteínas con elevada homología a proteínas de choque térmico, funcionalmente importantes en eucariotas. Por este motivo, el estudio de proteínas HSR, podría llevar a la identificación de nuevos caracteres de tolerancia a diferentes enfermedades en humanos, o a diferentes tipos de estrés en plantas.

1.3- Efectos fisiológicos del estrés abiótico sobre las plantas

A diferencia de otros organismos eucariotas las plantas son organismos sésiles, y la imposibilidad de movimiento cuando las condiciones del medio no son las adecuadas, las obliga a desarrollar mecanismos de respuesta frente a todo tipo de estreses: fitófagos, plagas, temperatura, sequía, salinidad, etc. Los cambios fisiológicos producidos por los distintos factores abióticos en plantas derivan de sus componentes principales: el estrés osmótico y la toxicidad iónica. Además de estos efectos primarios, existe un conjunto de efectos secundarios derivados de los anteriores como el estrés oxidativo, la pérdida de la homeostasis iónica o de pH, deficiencias en la absorción de iones como el potasio (K^+) y disminución del crecimiento celular (Munns y Tester, 2008).

1.3.1- Estrés osmótico

La falta de agua y el exceso de sales provocan una drástica reducción en el potencial osmótico del suelo, dificultando la absorción de agua por las plantas. En unas horas, la falta de agua causa una reducción transitoria en el crecimiento de hojas y raíces. Se produce una alteración en las relaciones hídricas de las células, ya que éstas responden a la falta de agua en el citosol (necesaria para las reacciones metabólicas) aportándola desde la vacuola. De este modo, las células pierden turgencia y reducen su expansión.

Además, las plantas minimizan la deshidratación cerrando los estomas para evitar la pérdida por evapotranspiración. El cierre estomático disminuye la toma de CO₂, lo que disminuye la fijación de esta molécula mediante la fotosíntesis (Munns, 2002).

Unas proteínas encargadas de contrarrestar el componente osmótico del estrés hídrico y salino son las LEA (del inglés, *Late Embryogenesis Abundant*), y se inducen siempre en episodios de estrés (Munns y col., 2002). La sobreexpresión constitutiva de proteínas LEA de cebada mejoró la halotolerancia en plantas transgénicas de arroz (Xu y col., 1996). Durante episodios de estrés, también se induce la biosíntesis de canales y enzimas de detoxificación, así como de moléculas señalizadoras como el ABA, que impulsarán la transcripción de genes de tolerancia frente al estrés (Figura 1.11).

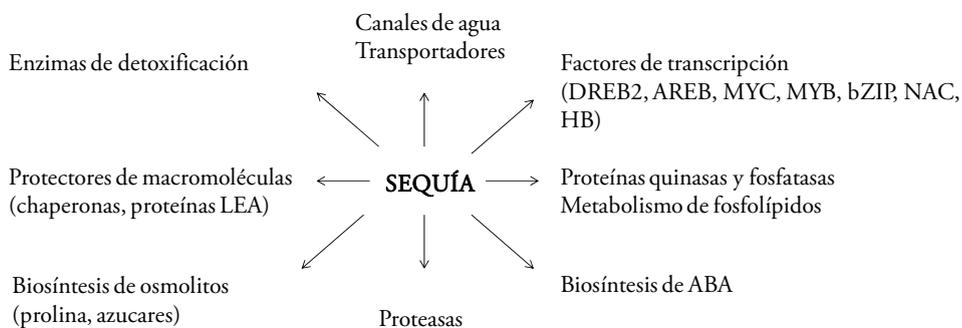


Figura 1.11. Funciones de los genes de respuesta y tolerancia al estrés, inducidos por sequía (Adaptada de Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

1.3.2- Toxicidad iónica y desequilibrio electroquímico

La salinidad también provoca un desequilibrio iónico a nivel intracelular. La homeostasis es la tendencia de un organismo a mantener su estado interno de equilibrio a pesar de los cambios en su entorno. En condiciones normales, en la célula existe un flujo continuo de entrada y salida de iones, regulado de manera que la concentración de cada ion, resultante de este flujo neto, se ajusta a los requerimientos celulares.

En estas condiciones el pH en el citosol se mantiene en torno a la neutralidad, y las concentraciones de Na^+ y cloro (Cl^-) varían entre 1 y 10mM, las de potasio entre 100 y 200mM, las de magnesio (Mg^{2+}) alrededor de 1mM, y las de calcio (Ca^{2+}) entre 100 y 200nM (Niu y col., 1993).

Por lo tanto, de forma general, las células tienden a acumular principalmente K^+ y Mg^{2+} en el citosol, mientras que otros iones como Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} y H^+ son expulsados al apoplasto o compartimentados en la vacuola. Las proteínas encargadas del transporte de iones a través de la membrana plasmática o del tonoplasto y su regulación juegan un papel fundamental en el mantenimiento de esta homeostasis iónica. Para una mejor comprensión del transporte de iones a nivel celular, debemos distinguir entre transporte de alta y de baja afinidad.

El transporte de alta afinidad es el que media la toma de iones cuando la concentración extracelular de éstos es del orden μM , mientras que el de baja afinidad media la toma en el orden mM (Epstein y col., 1963). Estos mecanismos son mediados por dos tipos de proteínas de membrana que posibilitan el transporte de iones en contra de su gradiente de concentración (transporte activo secundario): canales y transportadores. Los canales utilizan el potencial de membrana para energizar el transporte de iones y los transportadores el gradiente de pH y, si no son electroneutros, el potencial de membrana (negativo dentro). Los canales se caracterizan por una "puerta" que regula su actividad (no están siempre activos), permitiendo el acceso del ligando al sitio de unión, simultáneamente, desde las dos caras de la membrana. Los transportadores permiten la entrada del ion mediante un cambio conformacional en su estructura que libera el ion transportado en la otra cara de la membrana (Ames y Lecar, 1992).

Aunque inicialmente los canales se asociaban al mecanismo de baja afinidad y los transportadores al de alta, estudios posteriores parecen indicar que ambos pueden mediar una incorporación bifásica de iones (Dalton, 1984; Fu y Luan, 1998).

El exceso de NaCl en el medio durante episodios de estrés salino causa fuertes efectos sobre la homeostasis iónica que la célula debe reestablecer para asegurar un crecimiento y funcionamiento metabólico adecuado (Binzel y col., 1989). Dada la similitud en entre el Na⁺, el K⁺ y Mg²⁺, el primero actúa como inhibidor competitivo en los sitios específicos de enzimas que requieren la unión de K⁺ o Mg²⁺.

En este sentido, la célula necesita mantener sistemas de expulsión de Na⁺, ya que concentraciones de este catión superiores a 100mM en el citoplasma inhiben procesos bioquímicos y fisiológicos (Serrano, 1996). Así, procesos celulares esenciales como la síntesis de proteínas, el procesado del ARN o el metabolismo de azúcares se ven fuertemente afectados por la presencia de altas concentraciones de Na⁺ (Marschner, 1995; Forment y col., 2002). Además, concentraciones salinas superiores a 400mM rompen el equilibrio electrostático necesario para el mantenimiento de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas, produciendo la inhibición de la mayor parte de la actividad enzimática por desnaturalización (Wyn-Jones y Pollard, 1983).

1.3.3- Estrés oxidativo

El estrés abiótico, y principalmente el estrés térmico, el oxidativo y el hídrico, produce daños oxidativos derivados de la sobreacumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) como los radicales superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Los valores normales de producción de especies reactivas de oxígeno en la célula son de 240 $\mu\text{M/s}$ de O_2^- y unos niveles constantes de H_2O_2 en el cloroplasto de 0,5 μM (Polle, 2001), pero bajo diferentes estreses pueden verse aumentados causando daños oxidativos en lípidos de membrana plasmática, proteínas y ácidos nucleicos (Hernández y col., 2001).

De forma general, las ROS han sido siempre consideradas subproductos de procesos aeróbicos (Asada y Takahashi, 1987), como son el transporte de electrones en cloroplastos y mitocondrias o la oxidación de metabolitos, aunque en los últimos años se han identificado nuevas fuente de ROS como las NADPH oxidasas y peroxidasas (Dat y col, 2000).

Uno de los posibles mecanismos de respuesta frente al estrés osmótico es a través de la activación de quinasas tipo MAP (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) y factores de transcripción que regulan procesos celulares de síntesis o degradación de ROS, la fotosíntesis o la producción de HSPs. También la señalización de ROS produce la activación de quinasas con dominio tipo calmodulina (quinasas con dominio de unión a calcio), capaces de inducir o reprimir diversos factores de transcripción de respuesta a estrés oxidativo (Figura 1.12; Mittler, 2002).

Los azúcares solubles también están directamente relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno durante la respiración mitocondrial o la fotosíntesis, e involucrados en procesos antioxidantes como son la síntesis de carotenoides y la ruta de las pentosas fosfato, en la que se produce NADPH necesario en la detoxificación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 ; Couée y col., 2006).

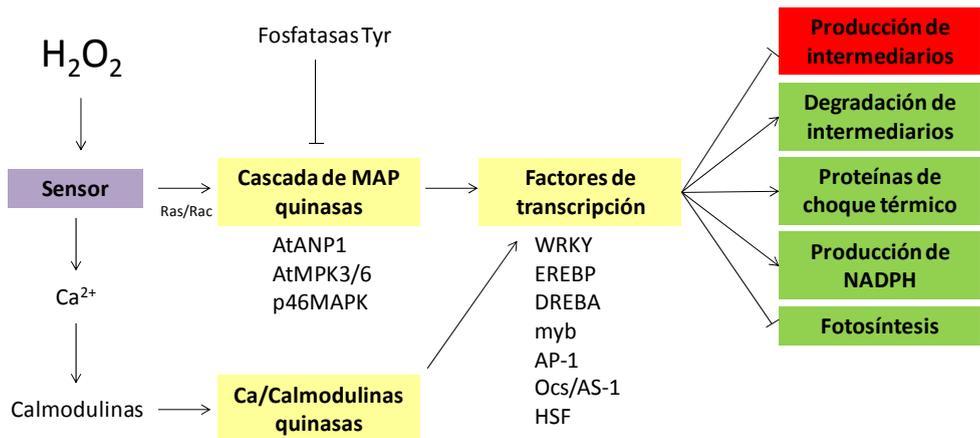


Figura 1.12. Modelo de señalización y respuesta al estrés oxidativo (Adaptada de Mittler, 2002).

Mediante la producción de plantas transgénicas que sobreexpresan algunas de las enzimas detoxificadoras de ROS como la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa o glutatión reductasa se consiguió una mejora de la tolerancia a la salinidad (Bohnert y Sheveleva, 1998). También la sobreexpresión de genes de síntesis de manitol, fructanos, trehalosa, ononitol, prolina, glicina-betaína y ectoína produce plantas transgénicas halotolerantes, especialmente si la síntesis se dirige al cloroplasto que es la principal fuente de ROS (Shen y col., 1997; Zhu, 2001).

Además, pretratamientos con ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), cloruro de calcio (CaCl), H₂O₂ y ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico, precursor del etileno), confieren mayor tolerancia al estrés térmico (Larkindale y Huang, 2004). Otro de los mecanismos de tolerancia frente al estrés oxidativo es la síntesis de proteínas protectoras como las osmotinas y dehidrinas, que mantienen la estructura de las proteínas en condiciones de elevada salinidad (Munns y col., 2002).

A menudo los osmolitos compatibles se acumulan a concentraciones demasiado bajas como para permitirles participar en el reajuste osmótico, por lo que se cree que su papel se centra en la degradación de ROS y la protección de las estructuras celulares frente a daños oxidativos (Hong y col., 2000; Zhu, 2001), como es el caso del manitol, donde la sobreexpresión de genes de síntesis en trigo no fue suficiente para contribuir al ajuste osmótico en condiciones de sequía, pero sí para contribuir a la detoxificación de radicales superóxido e hidroxilo (Abebe y col., 2003). Las plantas transgénicas superproductoras de osmolitos muestran una mayor tolerancia a todo tipo de estreses abióticos que generan ROS: frío, congelación, calor y sequía (Rhodes y Hanson, 1993). Por ejemplo, plantas de arroz que sobreexpresan genes de biosíntesis de trehalosa, muestran un menor daño oxidativo en el fotosistema II durante episodios de sequía y salinidad (Garg y col., 2002). También la síntesis de poliaminas se induce en presencia de estrés y parece proteger a las células mediante la degradación de radicales libres (Mansour, 2000). Finalmente, la identificación en arábidoopsis del mutante hiperresistente a estrés salino y oxidativo *pst1* (del inglés, *Photoautotrophic Salt Tolerance 1*) pone de manifiesto la importancia de la protección frente al daño oxidativo para mejorar la tolerancia al estrés salino, ya que esta mutación conlleva la inactivación de un regulador negativo de la respuesta a este tipo de estrés (Tsugane y col., 1999).

1.3.4- Alteración en la homeostasis del pH

El mantenimiento de la homeostasis de H⁺ en las células tiene una gran relevancia, dado que son muchos los procesos fisiológicos que dependen de él. Los cambios en el pH tienen efectos sobre la estructura tridimensional de las enzimas y sobre el estado de ionización de aminoácidos con grupos polares (Trivedi y Danforth, 1966). Además, la actividad de las enzimas es sensible al pH, variando alrededor de un óptimo, propio de cada una.

El pH tiene también importancia en el transporte de solutos a través de las membranas celulares. En plantas y hongos existe un transporte activo primario, mediado por la acción de bombas de protones, que utilizan la hidrólisis de ATP como energía (H^+ -ATPasas) para generar un gradiente de H^+ . Este gradiente representa energía almacenada que se emplea en el transporte de otros solutos en contra de sus gradientes de concentración (transporte activo secundario) (Palmgren, 2001).

El transporte activo secundario es fundamental en procesos como la entrada de nutrientes en las células (nitratos, fosfatos o sulfatos), la acumulación de K^+ en contra de su gradiente de concentración o la tolerancia a cationes tóxicos como el Na^+ (Palmgren, 2001). Además, en algunos casos el pH se puede considerar como un mensajero intracelular, ya que sus variaciones pueden transmitir información y provocar respuestas a nivel celular (Felle, 2001).

Los procesos que provocan perturbaciones en el pH celular son numerosos. Algunos de ellos son el transporte activo secundario (muchas veces acoplado al co-transporte con H^+), procesos metabólicos, como por ejemplo la nutrición del nitrógeno (Raven, 1987), y la respuesta a factores externos o estreses, como la anaerobiosis, el paso de luz a oscuridad o temperaturas extremas que afectan a las membranas (Felle, 2001).

1.3.5- Deficiencia en la toma de K^+

El potasio es uno de los iones inorgánicos más importantes a nivel intracelular, con una concentración en torno a 90mM en plantas. El Na^+ compite con el K^+ por los sitios de unión a los sistemas de transporte de alta y baja afinidad, contribuyendo a disminuir el cociente $K^+:Na^+$ de la célula (Rains y Epstein, 1967; Maathuis y col., 1996). Los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGC) se han propuesto como un posible mecanismo de entrada de iones Na^+ en la raíz (Amtmann y Sanders, 1999; Rus y col., 2004). También se ha observado que el Na^+ es capaz de inhibir los sistemas de toma de K^+ de alta y baja afinidad (Qi y Spalding, 2004; Nieves-Cordones y col., 2007).

Además, la acumulación de Na^+ en la célula produce despolarización de la membrana plasmática, impidiéndose la entrada pasiva de K^+ a la vez que se favorece su salida. Finalmente, la síntesis de solutos compatibles usados en la osmoprotección celular consume mucho ATP, que ya no puede ser utilizado para el transporte activo de K^+ de alta afinidad (Shabala y Cuin, 2007).

La sequía también dificulta la toma de K^+ por la raíz, ya que inhibe el desarrollo del sistema radicular e inhibe la difusión del K^+ en el suelo. En condiciones de sequía, el aumento del contenido hídrico aumenta de forma proporcional la difusión de K^+ en el suelo, así como la toma del ión por la planta (Mackay y Barber, 1985). El potasio, tiene claros efectos sobre la activación enzimática, la síntesis de proteínas, la fotosíntesis, el movimiento estomático y el contenido hídrico (Marschner, 1995). Como hemos visto anteriormente, el Na^+ compite con el K^+ por los sitios de unión a los sistemas de transporte de alta y baja afinidad, contribuyendo a disminuir el cociente $\text{K}^+:\text{Na}^+$ de la célula. Aunque las concentraciones de K^+ en el suelo oscilan entre 0,2 y 10mM, el K^+ representa entre un 2 y un 10% o más del peso seco de toda la planta. Al ser compatible a concentraciones elevadas con la estructura de las proteínas, es el catión más abundante en el citosol (100mM), donde juega un papel fundamental en procesos tan básicos como la neutralización eléctrica de las cargas de grupos aniónicos, el control de la polarización de la membrana celular y la osmorregulación (Chiu y col., 2002). Además, las plantas tratadas con exceso de K^+ muestran tolerancia a la sequía, presentando mayores índices de potencial hídrico y turgencia celular, y menor potencial osmótico en *Vigna radiata* (Nandwal y col., 1998), maíz (Premachandra y col., 1991), y trigo (Pier y Berkowitz, 1987; Sen Gupta y col., 1989).

1.3.6- Disminución del crecimiento

Generalmente, la división y el crecimiento celular se inhiben durante episodios de estrés. Al parecer, se debe a una reducción en la actividad de kinasas dependientes de ciclinas (en adelante CDKs), como consecuencia de la supresión de la transcripción de ciclinas y CDKs, y la inducción de inhibidores (Schuppler y col., 1998).

El ácido abscísico acumulado ante los estreses hídrico y salino induce la expresión del inhibidor de CDKs ICK1 (del inglés, *Inhibitor Cyclin-dependent protein Kinase 1*), que detiene la división celular, aunque permite la endorreplicación del ADN (Wang y col., 1998; Weinl y col., 2005). La sobreexpresión de este inhibidor produce plantas transgénicas más pequeñas y con alteraciones morfológicas (Wang y col., 2000). En el mutante de arábidopsis *sto1* (del inglés, *Salt Tolerance 1*), identificado por su mayor tolerancia al estrés salino y osmótico, la acumulación de ICK1 debida a NaCl es menor (Ruggiero y col., 2004).

1.4. Métodos de tolerancia frente al estrés hídrico/osmótico

1.4.1- Producción de osmoprotectores

Muchos de los cambios metabólicos que tienen lugar durante episodios de sequía o salinidad, se deben principalmente a la acumulación de sustancias osmoprotectoras como azúcares y aminoácidos, que mantienen la turgencia celular y mejoran la estabilidad de proteínas y estructuras celulares (Bartels y Sunkar, 2005; Funck y col., 2010). La producción de azúcares como la galactosa y rafinosa, incrementada mediante la sobreexpresión del gen *AtGals2* (del inglés, *Galactinol Synthase 2*) en arábidopsis, resultó en un incremento en la tolerancia frente a sequía (Taji y col., 2002). La expresión en trigo del gen *mtlD* (del inglés, *mannitol-1-phosphate dehydrogenase*) de *E. coli*, responsable de la síntesis de manitol, produjo tolerancia de esta especie de interés agronómico frente a la sequía y la salinidad (Gupta y Kaur, 2005), ya que parece actuar reduciendo la concentración de radicales hidroxilo y protegiendo estructuras de macromoléculas celulares (Motoaki y col., 2007). También la trehalosa, un disacárido de la glucosa, se acumula durante episodios de estrés en hongos, bacterias, vertebrados y plantas (Bartels y Sunkar, 2005).

Otra de las moléculas osmoprotectoras sintetizadas por la célula para combatir episodios de estrés, es la prolina. Se trata de un aminoácido involucrado en numerosos procesos, como el ajuste osmótico, la señalización de estrés, la estabilización de estructuras celulares y la reducción de radicales libres, actuando finalmente como depósito energético.

Durante la síntesis de prolina (Figura 1.13), se emplea NADPH para reducir el glutamato a P5C (Δ^1 -Pirrolina-5-carboxilato), por lo que aumenta la cantidad de NADP⁺ disponible. Durante episodios de estrés hídrico, el fotosistema I se reduce, hecho perjudicial para el buen funcionamiento de la cadena de electrones. De este modo, si obtenemos un ratio elevado NADP⁺/NADPH, mejoramos la eficiencia fotosintética (Hare y Cress, 1997). Además, también se ha demostrado que la prolina es un agente protector de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, ya que previene la peroxidación de lípidos de membrana, reduciendo las ROS (Molinari y col., 2007)

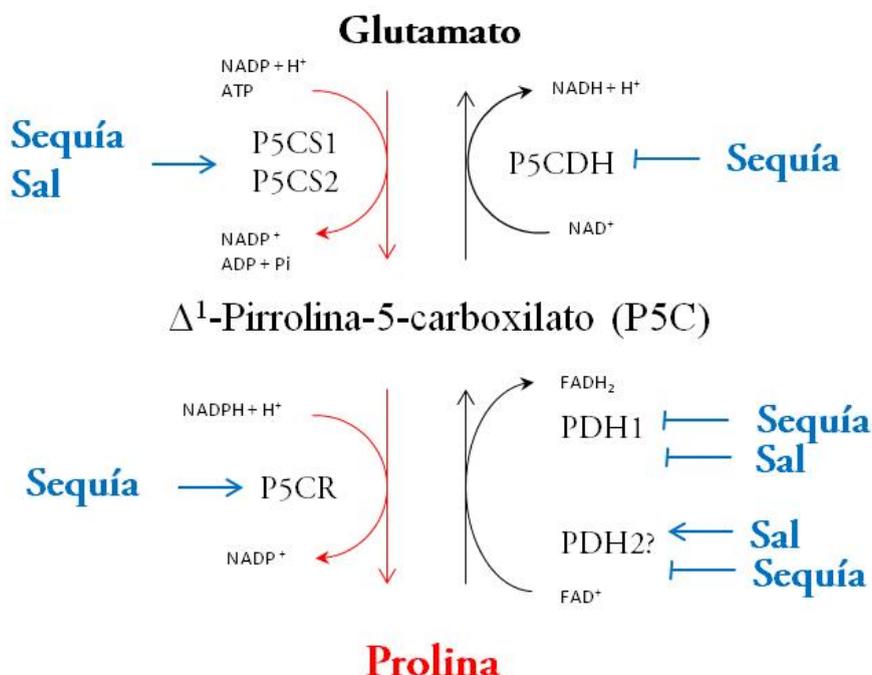


Figura 1.13. Metabolismo de la prolina indicando las enzimas implicadas en la síntesis y en la degradación de este aminoácido (Adaptado de Motoaki y col., 2007; Funck y col., 2010; Szabados y Savouré, 2010).

Así, una reducción en el contenido de prolina en arabisopsis, mediante la represión del gen *P5CS*, responsable de la síntesis de este osmolito, resultó en una menor tolerancia a la sequía (Nanjo y col., 1999a).

Por el contrario, plantas que sobreexpresan este mismo gen *P5CS*, son capaces de tolerar mejor la falta de agua, ya que la concentración de este osmolito se ve aumentada (Bartels y Sunkar, 2005). No siempre el aumento en el contenido de este aminoácido es beneficioso, como se observó en el trabajo de Nanjo y col. (2003), el incremento de prolina mediante la represión total del gen *PDH* (Prolina deshidrogenasa), encargado de la degradación de prolina, provocó un exceso de este aminoácido que resultó tóxico en arábidopsis. El nivel de prolina no solo es determinado por la acción de los genes *P5CS* y *PDH*. Borsani y colaboradores (2005) modificaron el nivel de prolina mediante silenciamiento por ARN del gen *P5CDH* (Δ^1 -Pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa), encargado de la degradación de P5C a glutamato.

1.4.2- Cierre estomático

El cierre de estomas es otra respuesta empleada por las plantas para reducir la pérdida de agua en condiciones de sequía. Los estomas, son pequeños poros situados en la epidermis de la hojas que permiten el intercambio de gases dentro y fuera de la planta. Estos poros, deben estar lo suficientemente abiertos como para asegurar un flujo continuo de CO₂ necesario en la fotosíntesis, y lo suficientemente cerrados como para evitar posibles pérdidas de agua por transpiración. Los estomas se forman por dos células guarda, y el transporte de agua e iones dentro y fuera de estas células, permite la apertura o cierre de los estomas (Pandey y col., 2007). Este mecanismo está controlado por el nivel de ABA, principal hormona señalizadora del estrés abiótico en plantas, y por otras hormonas vegetales como auxinas, citoquininas, etileno, brasinosteroides, jasmónico y ácido salicílico, moléculas señalizadoras del estrés biótico en plantas (Acharya y Assmann, 2009).

El ABA, es una hormonal vegetal involucrada en numerosos procesos celulares relacionados con el desarrollo y la supervivencia. Esta hormona fue aislada por diversos grupos en la década de los 60, observando claros efectos de esta molécula sobre la inhibición del desarrollo de yemas de abedul (Eagles y Wareing, 1963), y sobre la abscisión de hojas en plántulas de algodón (Ohkuma y col., 1963).

No solo se demostró que el ácido abscísico tenía efectos directos sobre la abscisión de hojas y la inhibición del desarrollo, sino que también se le atribuyó a esta hormona funciones en la maduración del embrión, en la dormición y desecación de la semilla, en la germinación, en la regulación de la expresión génica y en la respuesta al estrés ambiental (Leung y Giradaut, 1998; Rock, 2000).

Existen procesos dependientes e independientes del ABA, cuya concentración endógena se ve afectada principalmente por sequía o salinidad. Esta concentración es dependiente de la biosíntesis y el catabolismo de esta hormona, cuyas bases moleculares fueron identificadas por Nambara y Marion-Poll (2005). El ABA es una hormona esencial en la respuesta a diferentes estreses mediante el cierre estomático, la expresión de genes inducibles por estrés y cambios metabólicos (Motoaki y col., 2007). Cuando las células guarda detectan un aumento en los niveles de ABA, expulsan aniones y potasio al exterior celular, y provocan la conversión de malato a almidón (MacRobbie, 1998).

El ABA también induce la entrada de calcio al citosol de la células guarda, lo que induce la activación de canales de aniones, provocando una depolarización de la membrana que induce a su vez la salida de potasio de las células guarda. Todo este proceso reduce la concentración osmótica intracelular, lo que disminuye la turgencia de las células guarda y produce el cierre estomático en situaciones de estrés mediada por ABA (Tae-Houn y col., 2010; Figura 1.14). La implicación del calcio como segundo mensajero del cierre estomático mediado por ABA queda demostrada en el trabajo de Siegel y colaboradores (2009). En este trabajo, la inhibición de la entrada de calcio en las células guarda, redujo el cierre estomático mediado por ABA un 70%.

Otro de los mecanismos que favorece el cierre de estomas mediado por ABA, es la internalización mediante endocitosis del transportador de potasio KAT1 (del inglés, *K⁺ transporter of Arabidopsis thaliana*). Esta internalización del transportador, reduce la entrada de potasio a la célula, limitando la apertura estomática (Sutter y col., 2007). No solo el ABA es capaz de mediar el cierre estomático durante episodios de estrés. El ácido jasmónico, una fitohormona derivada de ácidos grasos, actúa como molécula señalizadora de la respuesta a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico como son heridas, exposición a ozono, sequía, y el ataque de patógenos y plagas. El metil-jasmonato, un derivado del ácido jasmónico, es capaz de inducir el cierre de estomas mediante la producción de ROS y NO.

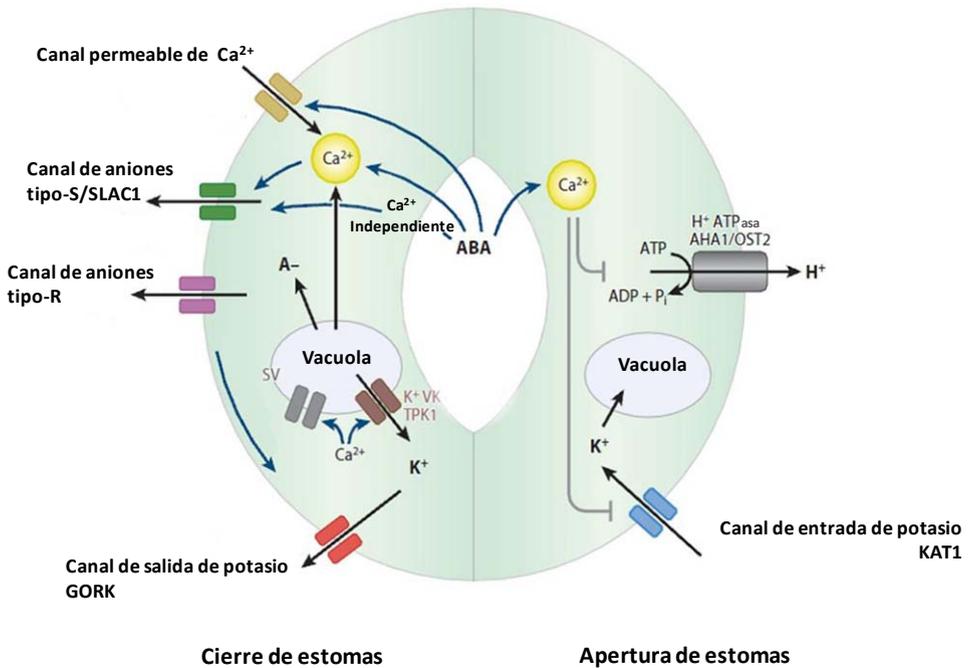


Figura 1.14. Mecanismo de apertura y cierre estomático mediado por ácido abscísico (Adaptada de Tac-Houn y col., 2010).

Estas moléculas oxidantes inducen la entrada de calcio en las células guarda, y la salida de aniones y potasio, lo que provoca finalmente el cierre de las células oclusivas (Munemasa y col., 2007; Suhita y col., 2004). Este mecanismo actúa a través del gen *COI1* (del inglés, *Coronative Insensitive protein 1*), en la vía de señalización mediada por jasmónico, ya que mutantes *abi2-1* (del inglés, *ABA insensitive 2-1*), inhiben el cierre estomático mediado por ABA y jasmónico, y mutantes *coi1* inhiben el cierre estomático mediado por jasmónico (Munemasa y col., 2007; Suhita y col., 2004; Figura 1.15). Además del ácido jasmónico, hay otras hormonas capaces de dirigir el cierre estomático a través de la producción de ROS. El ABA, es capaz de aumentar la expresión de ROS mediante la regulación de genes como *CAT1*, *APX1* y *GRI* (del inglés *Catalase 1*, *L*-ascorbate peroxidase 1, y *Glutathion reductase 1* respectivamente), genes involucrados en las vías de degradación de especies reactivas del oxígeno (Zhang y col., 2006).

Por otro lado, también ha quedado demostrado que el cierre de estomas mediado por ABA es dependiente de la actividad NAPDH oxidasa (Torres y Dangl, 2005).

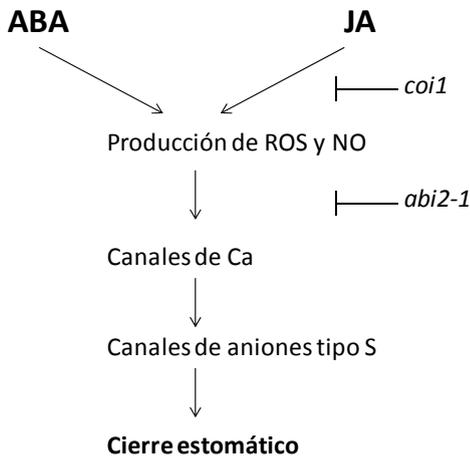


Figura 1.15. Vías de señalización del cierre estomático mediado por ácido abscísico y por ácido jasmónico (Adaptado de Munemasa 2007).

1.5- Estrategias para la identificación de genes involucrados en la tolerancia a estrés

Existen varias estrategias para la identificación de genes involucrados en la tolerancia a estrés en las plantas:

1.5.1- Ciencias “Omicas”

La transcriptómica, metabolómica o proteómica, analizan desde una perspectiva global el perfil de expresión génica, de metabolitos o proteínas traducidas en una situación determinada. Este tipo de estrategias aportan mucha información, señalando procesos o genes que pueden ser relevantes para, como en nuestro caso, la tolerancia a estrés. Las hipótesis realizadas en base a esta información, deberán ser contrastadas mediante posteriores estudios aplicando, por ejemplo, estrategias de genética reversa.

1.5.2- Estrategias de genética directa

Las estrategias de genética directa se basan en la selección, en una población dada, del individuo que posee el carácter o fenotipo deseado, y el estudio posterior del gen o ruta causante de dicha respuesta. En este tipo de estrategias se emplea la variación natural, o la inducida mediante agentes mutagénicos, como el EMS (Etil Metano Sulfonato), los rayos ultravioleta, los transposones o el T-DNA. En el caso de emplear la variación inducida por agentes mutagénicos, se generan colecciones de mutantes, sobre las que se realizan rastreos en busca del fenotipo deseado. Una vez identificado el mutante, se procederá al análisis genético y funcional que determine el gen responsable del fenotipo observado.

Inserción de T-DNA

Se define como T-DNA, a los fragmentos de ADN derivados de la región del plásmido Ti que contienen bordes con las 25 pares de bases específicas que permiten la transferencia desde *Agrobacterium tumefaciens* a plantas. Una ventaja de este método de tipo de mutagénesis respecto a la generada mediante EMS o los transposones es que la inserción es estable con el paso de las generaciones (Kconz y col., 1992). Otra de las ventajas de este método es que el T-DNA insertado contiene secuencias específicas para la identificación de las regiones flanqueantes, y por lo tanto, para una fácil identificación de los genes afectados mediante la inserción.

Sin embargo, la generación de plantas transgénicas es un trabajo tedioso en el cual es necesaria la obtención de un gran número de líneas independientes. Entre las colecciones de mutantes disponibles en el NASC (del inglés *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*), se encuentran algunas que emplean esta técnica, como las utilizadas en este trabajo, donadas por el Dr. Feldmann o el Dr. Pelletier (INRA-Versailles).

Como se ha indicado en el apartado anterior, el T-DNA puede emplearse como agente mutagénico (mutagénesis insercional). Las mutaciones así obtenidas son, generalmente, de pérdida de función y recesivas. Este tipo de mutaciones tiene limitaciones a la hora de realizar un rastreo. Por ejemplo, si existe redundancia génica puede ocurrir que una mutación en un gen de interés no sea identificada. Por otra parte, pueden existir genes cuya pérdida de función resulte letal, por lo que no es posible estudiar el mutante en dicho gen.

Para tratar de solventar estos problemas, es posible emplear otras técnicas de mutagénesis insercional, como entre otras, la activación transcripcional. Esta técnica se basa en la inserción en el genoma de *arabidopsis*, de un T-DNA que contiene un activador transcripcional, generalmente del promotor *35S* del virus del mosaico de la coliflor (*35S*). Mediante esta técnica se pretende que los activadores transcripcionales incrementen la expresión de los genes adyacentes a la inserción de T-DNA, obteniendo así mutantes dominantes. Sin embargo, también es posible que la inserción ocurra interrumpiendo un gen, provocando una mutación de pérdida de función (generalmente recesiva).

Entre las colecciones de mutantes disponibles en el NASC se encuentran algunas que emplean esta técnica, como las utilizadas en este trabajo, y que fueron donadas al NASC por el Dr. Weigel, o por los Drs. Scheible y Somerville, y los Drs. Yokoi, Koiwa y Bressan.

Policaciones como herramienta para el estudio de los mecanismos de tolerancia al estrés iónico

Como se ha visto en apartados anteriores, existe una gran variedad de canales y transportadores involucrados en la homeostasis iónica, donde se incluyen además los transportadores y canales de K^+ . Es importante destacar que dichos transportadores y canales de iones trabajan bajo el control de proteínas y/o cascadas de señalización variadas, por lo que su actividad puede estar regulada por uno o varios estreses (salinidad, sequía, calor, frío, etc.). Así que desde que el receptor identifica el estrés, hasta que se produce la respuesta adecuada, se deben activar una serie de rutas de señalización, perfectamente coordinadas.

Como hemos visto, no solo las grandes cantidades de canales y transportadores involucrados en la homeostasis iónica son una complicación para conocer la función e importancia de cada uno de ellos. Además, la implicación de cascadas de señalización hace más complicada la identificación de los mecanismos de tolerancia frente a estos estreses. En el caso de la salinidad, existe un problema añadido, ya que a las cascadas de señalización activadas por el efecto tóxico del Na^+ , hay que añadir las cascadas de señalización activadas por el efecto osmótico.

Existen numerosos trabajos cuyos objetivos fueron la identificación de genes de tolerancia a salinidad, en los que se realizaron rastreos de distintas colecciones de mutantes en medios con elevadas concentraciones (150-250mM) de NaCl (González-Guzmán y col., 2002; González-Guzmán y col., 2004; Ruggiero y col., 2004). Como cabe esperar, estos mutantes fueron aislados por su capacidad de tolerar altas concentraciones de NaCl, lo que sugería una posible implicación en la tolerancia frente a estrés iónico. Por el contrario, análisis posteriores revelaron que de forma general, las mutaciones otorgaban tolerancia frente al estrés osmótico provocado por la sal, y no al efecto tóxico del catión Na^+ . Es bien conocida la implicación del ABA en la señalización del estrés osmótico (Xiong y col., 2002), y como cabe esperar, los mutantes aislados en los trabajos anteriormente citados estaban alterados en estas vías de señalización. Así, cabe esperar que en los rastreos en los que se utilice NaCl como agente de selección, los mutantes aislados sean mutantes alterados en la síntesis o señalización del ABA.

Si el principal problema del NaCl en el rastreo de mutantes es la alta concentración necesaria para la identificación de candidatos, deberían usarse otros cationes que produjeran el mismo efecto tóxico pero a concentraciones mucho menores, evitando así generar el efecto osmótico descrito anteriormente. Un catión que posee estas características es el litio (Li^+), análogo del Na^+ pero con un efecto tóxico superior (20-25 mM). El Li^+ se ha utilizado como agente de selección en rastreos de mutantes de *arabidopsis* (Niñoles, 2005) y levadura (Goossens y col., 2000; Forment y col., 2002).

También es posible el uso de poliaminas (espermina, espermidina, putrescina) para encontrar mutantes tolerantes a cationes tóxicos, ya que las poliaminas son muy tóxicas a concentraciones bajas. En *arabidopsis* existen dos trabajos en los que se utilizó una poliamina como agente de selección (Mirza y Iqbal, 1997; Alejandro y col., 2007). En el trabajo de Mirza y Iqbal (1997), se aislaron mutantes de *arabidopsis* tolerantes a espermina, que mostraban deficiencias en el desarrollo. Estas deficiencias se utilizaron para el estudio de la fisiología de poliaminas en organismos superiores.

En una parte de esta tesis doctoral, se ha propuesto el uso de noespermidina ($C_6H_{17}N_3$, en adelante NE) como agente de selección para el aislamiento de mutantes tolerantes a este polication, que permitan identificar nuevos genes involucrados en las vías de regulación de la homeostasis iónica. La NE es una poliamina que se solo se encuentra de forma natural en algunas plantas como la alfalfa (Rodríguez-Garay y col., 1989), en bacterias termófilas (Hamana y col., 2001; Hamana y Itoh, 2001), microalgas (Hamana y col., 2004) y la familia de protobacterias Vibrionaceae (Hamana, 1997).

Esta poliamina inhibe la germinación de arabisidopsis a muy baja concentración (< 7mM). La utilidad de poliaminas (no presentes en la mayoría de eucariotas) o análogos tóxicos de poliaminas, para encontrar proteínas involucradas en el mecanismo de transporte de cationes y policationes, ha sido demostrada en levaduras y plantas (Alejandro y col., 2007; Kaouass y col., 1997). Recientemente, se ha descubierto una de la dianas de toxicidad de esta poliamina en arabisidopsis en la tesis doctoral de Sayas (2014), y se ha demostrado que esta poliamina está involucrada en la inhibición de la poliubiquitinación, causando un déficit en los niveles de aminoácidos disponibles, efecto similar al provocado por los inhibidores del proteasoma (Sayas, 2014).

Trabajos previos relacionados con el rastreo de mutantes, a partir de colecciones generadas mediante inserción de T-DNA

Existen trabajos previos en los que se han empleado algunas de las colecciones de mutantes utilizadas en esta tesis doctoral. En el caso de la colección de INRA-Versailles obtenida por el Dr. Georges Pelletier (Bouchez y col., 1993; Bechtold y col., 1993) mediante inserción de T-DNA, ha sido utilizada en diversos rastreos seleccionando; mutantes con alteraciones en el desarrollo gametofítico (Bonhomme y col., 1998; Procissi y col., 2001) y mutantes en el crecimiento de la raíz (Yuen y col., 2005). Además, también se han realizado rastreos seleccionando individuos estériles o letales en la formación de los gametofitos, para la identificación de genes mitocondriales y plastidiales involucrados en la reproducción sexual (Berthomé y col., 2003), genes involucrados en el desarrollo del tubo polínico (Lobstein y col., 2003; Lobstein y col., 2004), y genes involucrados en la recombinación meiótica en plantas (Grelon y col., 2001).

Otra de las colecciones empleadas previamente en rastreos de mutantes fue la desarrollada mediante activación transcripcional por el Dr. Detlef Weigel (Weigel y col., 2000). Utilizando esta colección, Yong-Mei y col. (2011) aislaron el mutante *lap3* (del inglés, *low acid phosphatase 3*) que muestra una actividad reducida en raíz de una fosfatasa ácida, frente al ayuno de fósforo. También se identificaron mutantes tolerantes en estadios de germinación a sodio, mutantes relacionados con la señalización de ABA (Barrero y col., 2005; González-Guzmán y col., 2002; Rodrigues y col., 2009) y mutantes tolerantes en germinación inhibida por frío a 10°C (Salaita y col., 2005).

El trabajo de mayor relevancia, obtenido con la colección de Weigel y que tiene una gran relación con el nuestro, fue el realizado por Alejandro y colaboradores (2007). En este caso, se realizó el primer rastreo de mutantes utilizando como agente de selección la NE, que como se ha mencionado anteriormente se trata de una poliamina no metabolizable, capaz de causar un efecto tóxico en la célula vegetal a muy bajas concentraciones. En este trabajo se propone que este polication entra en la célula mediante algún sistema no identificado, pero fuertemente dependiente del potencial eléctrico de la membrana plasmática. Así, mutantes tolerantes a NE, nos permitirían identificar genes reguladores de transportadores de H⁺ (H⁺-ATPasa), de K⁺ y de aniones, proteínas determinantes del potencial eléctrico de membrana.

Estos autores realizaron un rastreo sobre la colección de mutantes donada al NASC por el Dr. Weigel (Weigel y col., 2000) que permitió obtener mutantes tolerantes a cationes tóxicos en arabis. Con este abordaje se aisló el mutante *par1-1D* (*poliamine resistance*) que presenta un fenotipo pleiotrópico de resistencia a cationes tóxicos como Na⁺, Li⁺, NE y espermidina. Este mutante presenta un aumento en la expresión del gen que codifica una proteína perteneciente a la familia de las quiescina sulfidril oxidasas, a la que se denominó QSO2. Este gen actuaría activando un sistema de carga de K⁺ en el xilema, diferente al canal SKOR. Esto generaría un aumento de potencial de membrana en la interfase simplasto:xilema, disminuyendo así la entrada de cationes tóxicos en el xilema y su posterior traslocación a la parte aérea.

En relación a otras colecciones empleadas en este trabajo, podemos destacar los rastreos realizados sobre la colección de Feldmann por él mismo, en el que identificó mutantes con caracteres fisiológicos y morfológicos alterados (Feldmann, 1991), y otros rastreos en los que se identificaron mutantes tolerantes a sodio en germinación (Quesada y col., 2000), mutantes con gravitropismo y quiralidad alterados (Ferrari y col., 2000) y mutantes meioticos con una distribución cromosómica alterada durante la división (Ross y col., 1997).

1.5.3- Estrategias de genética reversa

Las estrategias de genética reversa se basan en la caracterización funcional de un gen, en un proceso determinado como es la tolerancia a estrés. A partir de mutantes de sobreexpresión o pérdida de función para el gen estudiado, se analizan los fenotipos obtenidos en estos mutantes, identificando finalmente los mecanismos de acción. Esta estrategia puede indicar cuál es el papel concreto del gen, en la tolerancia al estrés estudiado.

1.5.4- Expresión heteróloga en arabidopsis

En esta tesis doctoral como se ha comentado anteriormente, se ha utilizado el gen *CtHSR1* de *Candida tropicalis* para determinar la tolerancia a estrés abiótico conferida por este gen mediante sobreexpresión en arabidopsis.

El gen *CtHSR1* codifica un factor de transcripción con elevada homología a factores de transcripción inducibles por choque térmico. Este gen fue aislado en el rastreo de una genoteca creada a partir de la cepa NCYC2512 de *Candida tropicalis*, para la identificación de genes de halotolerancia en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Ali y col., 2001). Esta cepa fue aislada en suelos salinos de Pakistan, en una búsqueda de microorganismos halotolerantes realizada durante la elaboración del trabajo publicado por Rodriguez y colaboradores (1996). Tras la realización del rastreo en levadura, se identificó una región genómica compuesta de una única pauta abierta de lectura de 2187 pares de bases, que codificaba una proteína de 728 aminoácidos, y una región genómica en el extremo 5' de 3003 pares de bases y otra en el extremo 3' de 635 pares de bases.

La expresión de esta región genómica en levadura, provocaba tolerancia en el crecimiento inhibido por NaCl y LiCl, pero no producía ningún efecto en el desarrollo inhibido por sorbitol (Ali y col., 2001). Unos años después, esta misma región genómica fue utilizada para transformar la especie *Nicotiana tabacum* y así poder determinar la tolerancia a estrés abiótico conferida por la expresión del gen *CtHSR1* en plantas. En este trabajo realizado por Anjuman Arif y colaboradores en el año 2003, y que hasta el momento no ha sido publicado, se observó que la expresión de este bajo su propia región reguladora, era capaz de conferir tolerancia a calor, salinidad y sequía en plantas de tabaco. Por este motivo, este factor de transcripción es un buen candidato para el análisis mediante genética reversa de su posible funcionalidad en la tolerancia al estrés abiótico en plantas de arabis.

Quedan expuestas diversas estrategias para abordar un tema de interés general como es la tolerancia a estrés. Por ello, en esta tesis doctoral hemos empleado una estrategia de genética directa y otra de genética reversa mediante expresión heteróloga de un gen de *Candida tropicalis* en arabis, con el fin de identificar genes responsables de la tolerancia a estrés abiótico en arabis.

1.6- *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo para la identificación de genes responsables de la tolerancia a estrés abiótico en plantas

Arabidopsis thaliana es una planta vascular, una angiosperma que pertenece a la clase de la Dicotiledóneas, a la subclase de las Dilénidas, al orden de las Caprales y a la familia de las Brassicáceas o Crucíferas (Strasburger y col., 1994). Se ha descrito su presencia en casi todo el planeta, con la excepción de Sudamérica. En la Figura 1.16 se recoge su distribución geográfica, indicándose los puntos en los que se han aislado especímenes de esta planta.

A pesar de que las virtudes de arabis como especie en la que el análisis genético es factible y productivo fueron ensalzadas convincentemente por Rédei (1975), no fue hasta finales de la década de los ochenta cuando esta planta se convirtió en uno de los organismos experimentales de elección preferente en Biología Vegetal (Meyerowitz, 1994).

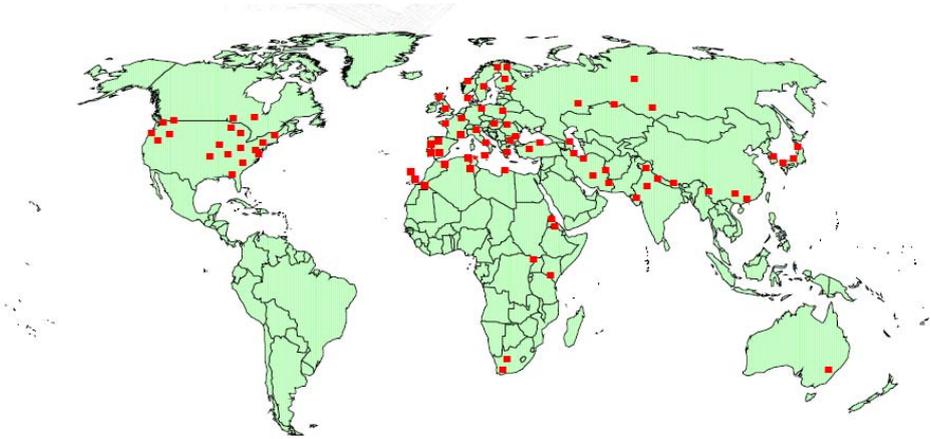


Figura 1.16. Distribución geográfica de *Arabidopsis thaliana*. Los puntos destacados en rojo indican lugares donde se han aislado plantas de esta especie. Modificado de Rédei (1970).

Esta especie reúne una serie de características que la han convertido en el objeto de estudio por excelencia de la mayoría de los laboratorios dedicados a la biología experimental de plantas. Una de ellas es su pequeño tamaño, unos 30 cm de altura, que permite siembras de hasta 10000 plantas/m². Su ciclo de vida es corto, de unas 6 semanas cuando es cultivada a 25°C bajo fotoperiodo de 16 horas de luz. Es una especie muy prolífica, capaz de producir hasta 10000 semillas por planta (Meyerowitz, 1987). Además, su genoma es de tamaño reducido (sólo 5 cromosomas, 125Mb/genoma haploide), se encuentra completamente secuenciado (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) y existen importantes colecciones de mutantes por inserción de T-DNA que pueden usarse en estudios de genómica funcional, disponibles en centros como el NASC. Finalmente, permite su transformación genética de forma fácil mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, por infiltración floral, sin necesidad de cultivo *in vitro* (Clough y Bent, 1998).

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se enmarca en un proyecto más amplio que tiene como objetivo final profundizar en el conocimiento de las bases moleculares que regulan la tolerancia al estrés abiótico en plantas; se pretende tanto la búsqueda de nuevos mutantes, así como los genes responsables de la tolerancia al estrés, y el estudio funcional de genes previamente identificados. En concreto, en esta tesis se intentará obtener nuevos mutantes de *Arabidopsis thaliana* que sean tolerantes durante la germinación en condiciones de crecimiento con el catión tóxico norespermidina, y el estudio mediante expresión heteróloga del gen *CtHSR1* de *Candida tropicalis* en *A. thaliana*. Los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Aislamiento de líneas mutantes de *A. thaliana* tolerantes a norespermidina, durante el establecimiento de plántulas a partir de las colecciones de activación transcripcional de los doctores Wolf Scheible y Chris Somerville, Detlef Weigel, y Hisashi Koiwa, Shuji Yokoi y Ray Bressan; así como a partir de las colecciones de pérdida de función generadas por los doctores Georges Pelletier (INRA-Versailles) y Ken Feldmann.
2. Análisis *in silico* de la estructura proteica del factor de transcripción *CtHSR1* e identificación de posibles proteínas ortólogas en *A. thaliana*.
3. Estudio de la actividad del promotor del gen *CtHSR1* mediante análisis cualitativos y cuantitativos de la expresión del gen *GUS* en *A. thaliana*.
4. Obtención y caracterización de líneas transgénicas sobreexpresoras del gen *CtHSR1* mediante expresión heteróloga en *A. thaliana*.
5. Análisis transcripcional de líneas transgénicas sobreexpresoras del gen *CtHSR1* en *A. thaliana* mediante micromatrices de ADN.

MATERIALES Y MÉTODOS

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Material biológico

3.1.1- *Arabidopsis thaliana*

Para la realización de esta tesis doctoral, se han empleado diferentes colecciones de mutantes de *Arabidopsis* mediante inserción de T-DNA, bien para producir mutantes de pérdida de función, o de activación transcripcional. Todas las colecciones fueron adquiridas por el NASC, se distribuyen como generaciones T₄, y están compuestas por diferentes cantidades de líneas transgénicas independientes, producto de transformación de distintos fondos genéticos con diversas construcciones.

3.1.1.1- Pérdida de función por inserción de T-DNA

- **Colección de Feldmann**

Esta colección empleada está formada por 10500 líneas (N3115, N6500, N84442), donadas por el Dr. Ken Feldmann (Department of Plant Sciences, College of Agricultural and Life Sciences, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA) al NASC y obtenidas por transformación del ecotipo silvestre Wassilewskija (WS-2) con el plásmido Ti 3850:1003 cuyo T-DNA aparece en la Figura 3.1 (Forsthoefel y col., 1992). Este plásmido es portador de los siguientes componentes, desde el borde izquierdo (LB) hasta el borde derecho (RB):

- Dos copias del plásmido pBR322 (Figura 3.2). La copia contigua al borde izquierdo contiene en dirección 5'-3' del T-DNA la secuencia del plásmido original pBR322 desde la posición 29 hasta la posición 651 (en sentido contrario a las agujas del reloj). La copia del borde derecho contiene, en el mismo sentido, la secuencia del plásmido original pBR322 desde la posición 0 hasta la 29 (en sentido contrario a las agujas del reloj). Este plásmido contiene el gen bacteriano de resistencia al antibiótico ampicilina, lo que permite realizar la técnica de rescate plasmídico para la localización de la inserción de T-DNA en el genoma vegetal.

- El gen marcador *Tn903* de resistencia al antibiótico kanamicina fue aislado de la bacteria *Streptomyces kanamyceticus*, y codifica la neomicina-fosfotransferasa II (gen *nptII*) que nos permite la selección de transformantes en bacterias.
- El gen *Tn5* de resistencia a kanamicina, bajo el control del promotor 1' extraído del plásmido pTIAch5, que nos permite seleccionar las líneas transgénicas en plantas.

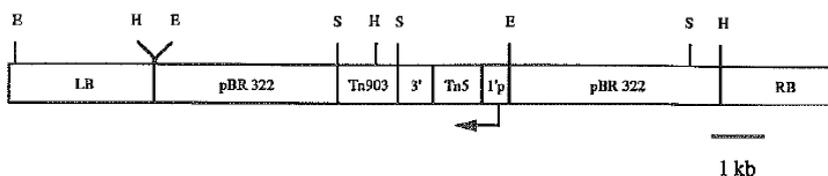


Figura 3.1. T-DNA insertado mediante transformación por agroinfiltración en el ecotipo silvestre WS-2 de arabisopsis, en la colección donada al NASC por el Dr. Ken Feldmann (Forsthoefel y col., 1992).

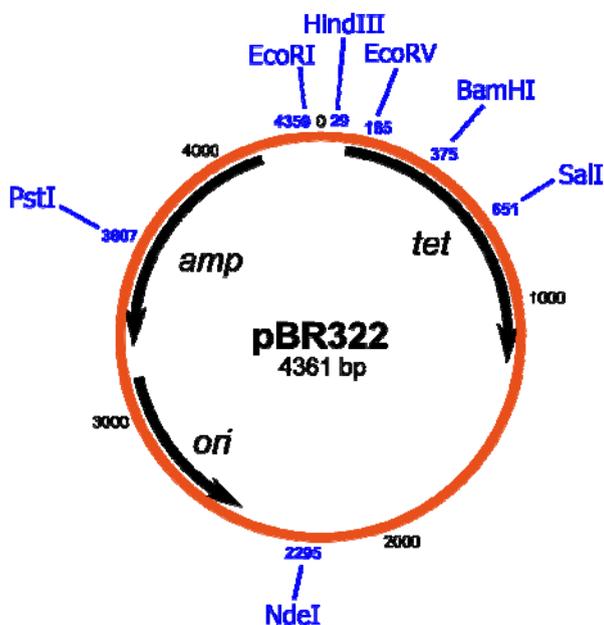


Figura 3.2. Mapa de restricción del plásmido pBR322, necesario para la realización del rescate plasmídico en los mutantes de la colección de Feldmann (<http://en.wikipedia.org/wiki/PBR322>).

- **Colección INRA-Versailles**

Esta colección consta de 9800 líneas (N5389, N5455, N5600, N5866, N55047), donadas al NASC por el Dr. Georges Pelletier (Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, Institut Jean-Pierre Bourgin –IJPB-, Institut National de la Recherche Agronomique –INRA-, Versailles, Francia), y obtenidas mediante transformación por infiltración floral del ecotipo silvestre Wassilewskija (WS-4) de *A. thaliana*, con el plásmido pGKB5, cuyo T-DNA se muestra en la Figura 3.3 (Bouchez y col., 1993; Bechtold y col., 1993).

Este plásmido es portador de los siguientes componentes, desde el borde derecho hasta el borde izquierdo:

- El gen reportero *uidA* [betaglucuronidasa (*GUS*)] sin promotor, fusionado al borde izquierdo. Este gen nos permitiría comprobar (si el lugar de inserción del T-DNA está cerca de algún promotor) la naturaleza transgénica de nuestros mutantes mediante un ensayo histoquímico.
- El gen marcador de resistencia a kanamicina (*nptII*) bajo el control del promotor de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.
- El gen marcador de resistencia a glufosinato (*BAR*) que codifica para una fosfotricin-acetil-transferasa, aislado de *Streptomyces viridochromogenes*, que permite la selección de transformantes tanto en cultivo convencional como *in vitro*, bajo el control del promotor constitutivo *35S* del virus del mosaico de la coliflor.

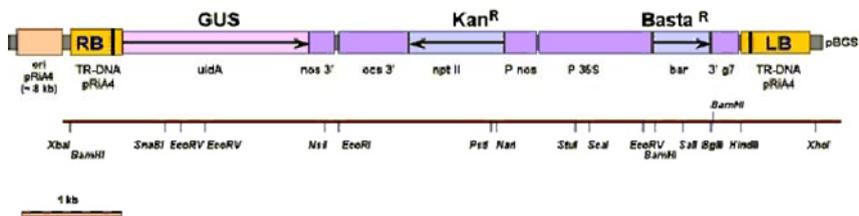


Figura 3.3. T-DNA insertado mediante transformación por agroinfiltración en el ecotipo silvestre WS-4 de *Arabidopsis*, en la colección donada al NASC por el Dr. Georges Pelletier (Bouchez y col., 1993).

3.1.1.2- Activación transcripcional

- **Colección de Weigel**

La colección empleada está formada por 22672 líneas (N21995, N21991, N23153), donadas por el Dr. Weigel (Department of Molecular Biology, Max-Planck-Institute for Developmental Biology, Tübingen. Alemania) al NASC, obtenidas mediante transformación del ecotipo silvestre Columbia (COL-7) de *A. thaliana* con el vector pSKI015 que aparece en la Figura 3.4 (Weigel y col., 2000).

Este vector es portador de los siguientes componentes, desde el borde izquierdo (LB) hasta el borde derecho (RB):

- El gen marcador de resistencia a glufosinato.
- El plásmido pBluescriptKS(+) que contiene el gen bacteriano de resistencia al antibiótico ampicilina, lo que permite realizar la técnica de rescate plasmídico para la localización de la inserción de T-DNA en el genoma vegetal.
- Cuatro copias del activador transcripcional del promotor *35S* desde la posición 86 a la 417, relativo al inicio de la transcripción, cuya función es aumentar la expresión de los genes contiguos a la inserción del T-DNA, desde su propia caja TATA.

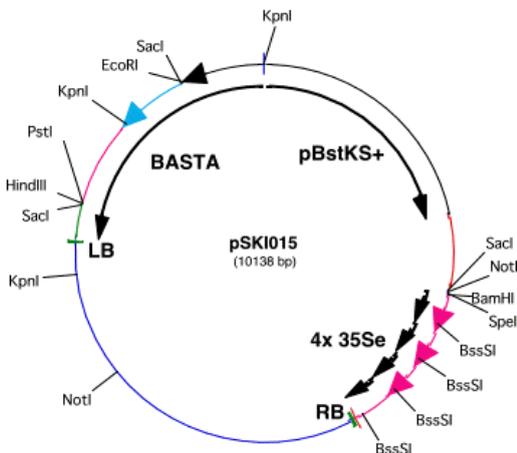


Figura 3.4. Plásmido pSKI015 mostrando el T-DNA insertado mediante transformación por agroinfiltración en los ecotipos silvestres COL-7, COL-2 y C-24 de *Arabidopsis*, en la colección donada al NASC por el Dr. Detlef Weigel, los Drs. C. Somerville y W. Scheible, y los Drs. H. Koiwa, R. Bressan y S. Yokoi, respectivamente (Weigel y col., 2000).

- **Colección de W. Scheible y C. Somerville**

En este caso se emplearon un total de 63000 líneas mutantes (N31100), donadas al NASC por el Dr. Chris Somerville (Department of Plant Biology, The Carnegie Institution of Washington, Palo Alto, California, USA) y el Dr. Wolf Scheible (System Regulation Group, Department 2: Metabolic Networks, Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Alemania), obtenidas mediante transformación del ecotipo silvestre Columbia (COL-2) de *A. thaliana* con el vector pSKI015 que aparece en la Figura 3.4 (Weigel y col., 2000).

- **Colección de Yokoi, Koiwa y Bressan**

En este caso, utilizamos un total de 4000 líneas (N31402), donadas al NASC por el Dr. Hisashi Koiwa (Department of Horticultural Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas, USA), por el Dr. Ray Bressan (Department of Horticulture and Landscape Architecture, College of Agriculture, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA) y por el Dr. Shuji Yokoi (Center for Plant Environmental Stress Physiology -CFPESP- Department of Horticulture and Landscape Architecture, College of Agriculture, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA). Estas líneas fueron obtenidas mediante transformación del ecotipo silvestre C-24 de *A. thaliana* con el vector pSKI015 (Figura 3.4), y habían sido previamente transformadas con el reportero RD29A-LUC (bajo un promotor inducible por estrés) y el gen de resistencia a kanamicina (*nptII*).

3.1.1.3- Ecotipos silvestres

- **Columbia 0 (COL-0)**

Suministrado por el NASC (N6673) y empleado como ecotipo silvestre para todas las transformaciones genéticas en arábidopsis.

- **Columbia 2 (COL-2)**

Suministrado por el NASC (N907) y empleado como ecotipo silvestre para la colección de W. Scheible y C. Somerville.

- **Columbia 7 (COL-7)**

Suministrado por el NASC (N3731) y empleado como ecotipo silvestre para la colección de Weigel.

- **C-24**

Suministrado por el NASC (N906) y empleado como ecotipo silvestre para la colección de Yokoi, Koiwa y Bressan.

- **Wassilewskija 2 (WS-2)**

Suministrado por el NASC (N2360) y empleado como ecotipo silvestre para la colección de Feldmann.

- **Wassilewskija 4 (WS-4)**

Suministrado por el NASC (N5390) y empleado como ecotipo silvestre para la colección de INRA-Versailles.

3.1.1.4- Mutantes

- **Mutante SAIL_363_G02**

El código NASC de identificación es el N816922. Esta línea, perteneciente a la colección SAIL, contiene un alelo mutante en el locus At3g14100. La mutación, fue creada mediante inserción de T-DNA sobre el fondo genético Columbia-3, y proporciona tolerancia al herbicida BASTA.

- **Mutante SALK_070620**

Su código de identificación NASC es el N570620. Esta línea, perteneciente a la colección SALK, contiene un alelo mutante en el locus At4g19630. La mutación, fue creada mediante inserción de T-DNA sobre el fondo genético Columbia-0, y proporciona tolerancia al antibiótico kanamicina.

- **Mutante SALK_035324**

El código de identificación NASC es el N535324. Esta línea, perteneciente a la colección SALK, contiene un alelo mutante en el locus At4g18870. La mutación, fue creada mediante inserción de T-DNA sobre el fondo genético Columbia-0, y proporciona tolerancia al antibiótico kanamicina.

- **Mutante GK-324B11**

Este mutante tiene un código NASC de identificación es el N431031. Esta línea, perteneciente a la colección GABI-KAT, contiene un alelo mutante en el locus At2g38470. La mutación, fue creada mediante inserción de T-DNA sobre el fondo genético Columbia-0, y proporciona tolerancia al antibiótico sulfadiazina.

Para todos los mutantes empleados en esta tesis doctoral, se utilizó como control silvestre en los experimentos realizados la línea Columbia-0.

3.1.2- *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana benthamiana (en adelante *N. benthamiana*), es una planta herbácea, muy similar al tabaco, empleada en investigación para estudios genéticos. Utilizada en el pasado como estimulante antes de la introducción y comercialización del tabaco, en este trabajo se ha utilizado como herramienta para la expresión transitoria de fusiones proteicas con el objetivo de identificar posibles localizaciones subcelulares.

3.1.3- *Escherichia coli*

Escherichia coli (en adelante, *E. coli*), es un organismo procarionta muy estudiado por el ser humano. Se trata de una enterobacteria empleada frecuentemente en experimentos de biología molecular. En este trabajo se ha utilizado la cepa DH5 α descrita a continuación:

DH5 α : F' Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r $_{k}^{-}$, m $_{k}^{+}$) phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1. Esta cepa fue empleada de forma convencional transformándola por choque térmico (Apartado 3.6.1.2), para la replicación y

manipulación de plásmidos recombinantes.

3.1.4- *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens (en adelante *A. tumefaciens*) es una proteobacteria que causa tumores en la base de plantas dicotiledóneas. Se trata de un organismo muy utilizado en técnicas de biología molecular, por su capacidad de transmitir ADN a células vegetales. En este trabajo se han utilizado dos cepas:

C58C1-Rif: Esta cepa fue empleada en la transformación de *N. benthamiana* mediante infiltración foliar (Apartado 3.5.2), conteniendo el plásmido pBIN61, que permite la expresión de la proteína p19 de un virus de tomate cuyo gen fue previamente clonado en este plásmido (*tomato bushy stunt virus*, *TBSV*), bloqueando así la degradación del ARN procedente del transgén mediante silenciamiento génico post-transcripcional (Voinnet y col., 2003). Esta cepa con su plásmido fue cedida por el personal del laboratorio del profesor Ismael Rodrigo (UPV-IBMCP).

GV3101::pMP90: Esta cepa fue empleada en la transformación de *N. benthamiana* mediante infiltración foliar (Apartado 3.5.2), así como de *A. thaliana* mediante infiltración floral (Apartado 3.4.5). Como su nombre indica, contiene el plásmido Ti desarmado pMP90 (pTiC58 Δ T-DNA) (Gent^r). Se le introdujo también los plásmidos binarios de interés, para los experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana* y experimentos de expresión estable en arábidopsis (Hellens y col., 2000).

3.1.5- *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (en adelante *S. cerevisiae*), es un hongo unicelular, utilizado industrialmente en la fabricación de pan, cerveza y vino. Se trata de uno de los modelos más adecuados para estudios de biología molecular, ya que, además de ser un organismo eucariota, posee un rápido crecimiento y un sistema sencillo de transformación. En este trabajo se ha utilizado la cepa AH109 para los ensayos de simple y doble híbrido.

AH109: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, ade2-101, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, ade2-101::GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, ura3-52::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZMEL1 (James y col., 1996).

3.2- Vectores de clonación y transformación

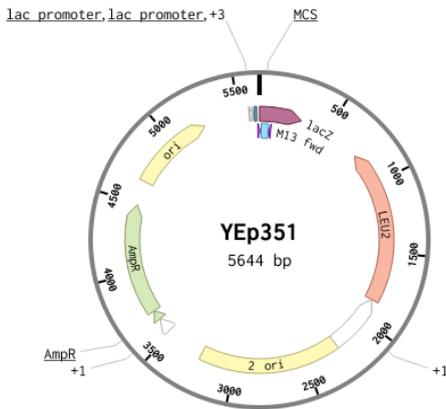


Figura 3.5. Plásmido multicopia YEp351 para la expresión de genes en levadura (imagen extraída de <https://benchling.com/benchling/yeast-plasmids/yep351/>).

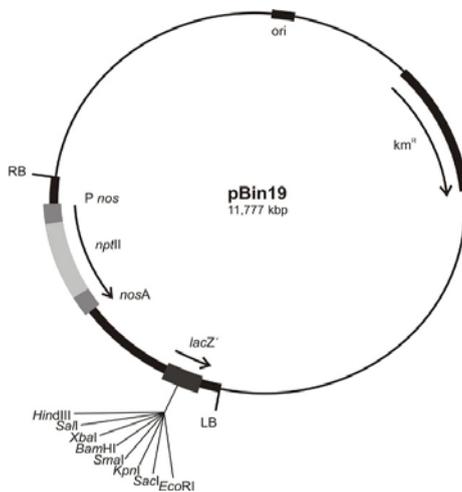
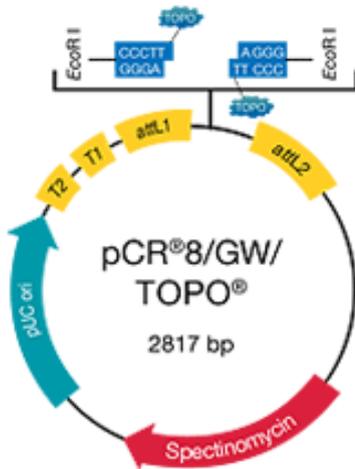


Figura 3.6. Plásmido binario pBin19 para la transformación de arabisopsis (imagen extraída de <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/jacob-daniela-2003-07-15/HTML/chapter6.html>).

pYEp351: Plásmido empleado en la construcción de la genoteca de *Candida tropicalis* (en adelante *C. tropicalis*), cepa NCYC2512, con origen de replicación en levadura y bacteria (Figura 3.5). En este trabajo, se utiliza como vector de origen, ya que contiene el fragmento genómico de *C. tropicalis*, incorporando la región reguladora y codificante del gen *CtHSR1*.

pBIN19: Plásmido binario utilizado en la transformación de arabisopsis. Posee un tamaño de 11777 pares de bases, y no incorpora ningún promotor constitutivo (Figura 3.6). En esta tesis doctoral, se empleó para la transformación de arabisopsis con la región genómica de *C. tropicalis*, incorporando la región reguladora y codificante para el gen *CtHSR1*. Además, incorpora el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina.

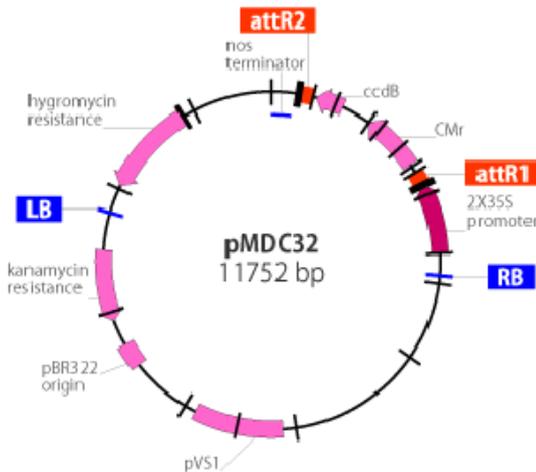
pCR8⁺/GW/TOPO (en adelante TOPO): Vector intermediario para la clonación de genes mediante el sistema GATEWAY. Su principal característica es que



posee unos extremos protuberantes en los que se encuentra una topoisomerasa, capaz de ligar fragmentos de ADN con extremos protuberantes de adenina. Además, posee unos sitios de recombinación (attL1/attL2), que le permite recombinar con todos aquellos plásmidos que posean estos dos mismos sitios attL. Solo posee origen de replicación en bacteria, aportando el gen *SPN* que confiere tolerancia a la espectinomicina (Figura 3.7).

Figura 3.7. Plásmido pCR8/GW/TOPO para el clonaje de fragmentos de ADN por recombinación mediante el sistema GATEWAY (<http://www.b2b.invitrogen.com>).

pMDC32: Vector binario empleado en la transformación de arábidopsis. Este plásmido se caracteriza por poseer dos promotores 35S en tándem, delante del lugar de inserción del gen de interés, produciendo una expresión masiva.



En nuestra tesis, lo empleamos para introducir el gen *CtHSR1* en arábidopsis. Además, posee el gen de selección *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina en bacteria, y el gen de la higromicina fosfotransferasa (*HPT*) que confiere resistencia a higromicina en planta (Figura 3.8).

Figura 3.8. Plásmido binario pMDC32 para la transformación de arábidopsis, que emplea el sistema de clonaje GATEWAY, por recombinación con el vector TOPO (<http://genocon.org>).

pMDC43: Vector binario empleado en la transformación de arábidopsis, característico por permitir la fusión de la proteína verde fluorescente, en el extremo 5' de cualquier gen de interés (Figura 3.9). Además, esta fusión génica es expresada bajo la acción de dos promotores *35S* en tándem, produciendo una expresión masiva. En esta tesis lo empleamos para introducir la fusión *GPF-CtHSR1* en arábidopsis, y así determinar cuál es la localización subcelular de esta proteína. Además, posee el gen de selección *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina en bacteria, y el gen *HPT* que confiere resistencia a higromicina en planta.

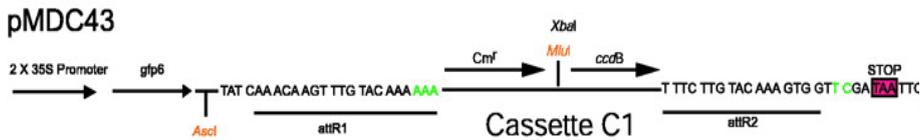


Figura 3.9. Esquema del casete de transformación perteneciente al vector binario pMDC43 para la transformación de arábidopsis. Se trata de un plásmido que emplea el sistema de clonaje GATEWAY, por recombinación con el vector TOPO (Curtis y Grossniklaus, 2003).

pMDC83: Vector binario empleado en la transformación de arábidopsis, característico por permitir la fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo 3' de cualquier gen de interés (Figura 3.10). Además, esta fusión génica es expresada bajo la acción de dos promotores *35S* en tándem, produciendo una expresión masiva. En esta tesis lo empleamos para introducir la fusión *CtHSR1-GFP* en arábidopsis, y así determinar cuál es su localización subcelular. Además, posee el gen de selección *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina en bacteria, y el gen *HPT* que confiere resistencia a higromicina en planta.

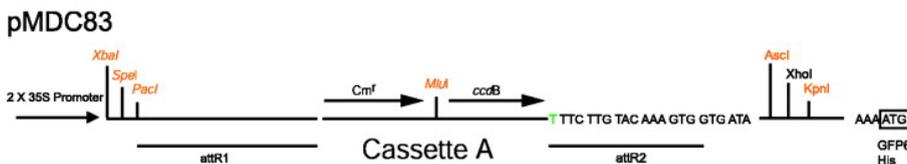


Figura 3.10. Esquema del casete de transformación perteneciente al vector binario pMDC83 para la transformación de arábidopsis. Se trata de un plásmido que emplea el sistema de clonaje GATEWAY, por recombinación con el vector TOPO (Curtis y Grossniklaus, 2003).

pGPTVII-UBQ10: Plásmido binario que se empleó para la transformación de arábidopsis. La característica principal de este vector es que posee el promotor del gen de ubiquitina 10 (Figura 3.11), para la expresión de regiones codificantes de forma constitutiva, pero a niveles inferiores que con el promotor 35S. Posee el gen de selección *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina en bacteria, y el gen *HPT*, que confiere resistencia a higromicina en planta.

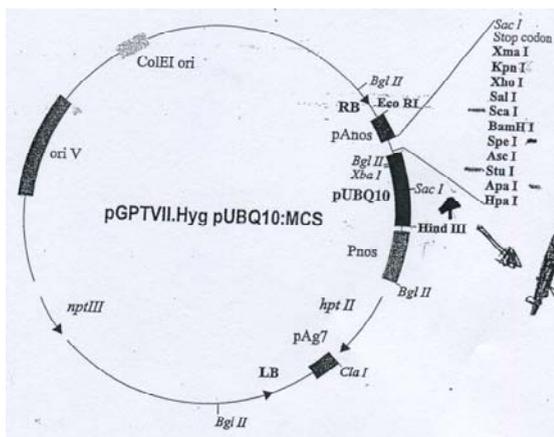
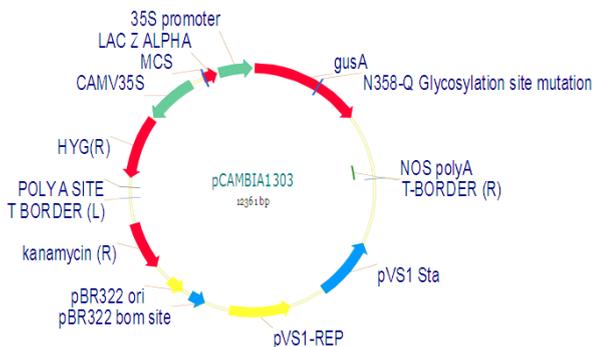


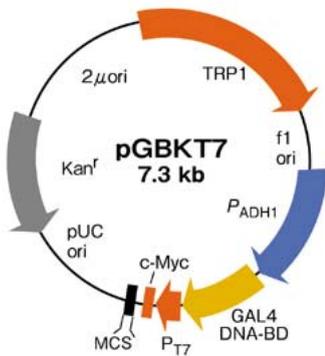
Figura 3.11. Plásmido pGPTVII/pUBQ10 para el clonaje de fragmentos de ADN bajo el control del promotor de ubiquitina 10 (Imagen cedida por el Prof. J. Kudla).

pCAMBIA1303: Plásmido binario que se empleó para la transformación de arábidopsis. Posee el gen reportero *GUS-GFP* (Figura 3.12), bajo el control del promotor constitutivo 35S. En este trabajo, se empleó sustituyendo el promotor 35S



por la región reguladora del gen *CtHSR1* de *C. tropicalis*. Los genes de selección que aporta este plásmido es el *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina en bacteria, y el gen *HPT* que confiere resistencia a higromicina en planta.

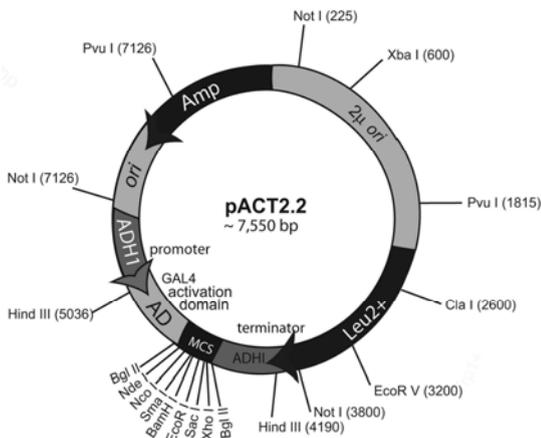
Figura 3.12. Plásmido binario pCAMBIA1303 empleado en la transformación de arábidopsis (<http://www.yrgene.com/product/vector/15791>).



pGBKT7: Plásmido empleado en la transformación de la cepa de levadura AH109 para la realización del ensayo de doble híbrido. Posee el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4 (Figura 3.13), y el gen de síntesis de triptófano. Por lo tanto, todas las células que contengan este plásmido serán capaces de crecer en medio sin triptófano.

Figura 3.13. Plásmido pGBKT7 empleado en el ensayo de doble híbrido en levadura (http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100004746).

pACT2: Plásmido empleado en la construcción de la genoteca de arábidopsis (Nemeth y col., 1998), y empleado en la transformación de la cepa de levadura



AH109 para la realización del ensayo de doble híbrido. Posee el dominio de activación del factor de transcripción GAL4 (Figura 3.14), y el gen de síntesis de leucina. Por lo tanto, todas las células que contengan este plásmido serán capaces de crecer en medio sin leucina.

Figura 3.14. Plásmido pACT2, empleado en el ensayo de doble híbrido en levadura (imagen extraída de <https://www.addgene.org/11343/>).

3.3- Medios de cultivo

Todos los medios de crecimiento utilizados en cultivo *in vitro* durante este trabajo se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión. Las sustancias termolábiles empleadas en la preparación de algunos medios, fueron agregadas al medio esterilizado y enfriado por debajo de los 50°C.

3.3.1- Medio Murashige-Skoog para el crecimiento de *A. thaliana*

Medio empleado para el cultivo *in vitro* de *A. thaliana*. Está compuesto de 0,4% (p/v) de sales Murashige-Skoog (MS; Duchefa, ref: M0221; Murashige y Skoog, 1962), 1% (p/v) de sacarosa, 10mM de MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico). Para obtener medio MS sólido, se agregó fitoagar (0,8% p/v) (Duchefa Biochemie). En todos los casos el medio se ajusta a pH5,7.

3.3.2- Medio para el crecimiento de bacterias

3.3.2.1- Medio LB (Luria-Bertani)

Medio de cultivo empleado para el crecimiento de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Comúnmente conocido como Luria-Bertani (Bertani, 1951), está compuesto por triptona (1% p/v), extracto de levadura (0,5% p/v) y cloruro de sodio (1% p/v). Cuando es necesario como medio sólido, se añade agar bacteriológico (1,5% p/v). El medio se ajusta a pH7.

3.3.2.2- Medio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*)

Medio de cultivo empleado para el crecimiento de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Se usa principalmente después de transformaciones mediante choque térmico o electroporación, ya que al ser un medio más rico que el LB, produce mayor número de unidades formadoras de colonias. Está compuesto por triptona (2% p/v), extracto de levadura (0,5% p/v), cloruro de sodio (10mM), cloruro de potasio (2,5mM) y cloruro de magnesio (10mM). Una vez autoclavado, se agrega una solución estéril de glucosa (20mM). El medio se ajusta a pH7.

3.3.2.3- Medio SOB (*Super Optimal Broth*)

Medio de cultivo empleado en el crecimiento de *E. coli* para la preparación de células quimio-competentes (Sambrook y Russell, 2001). Su composición; triptona (2% p/v), extracto de levadura (0,5% p/v), cloruro de sodio (10mM), cloruro de potasio (2,5mM) y cloruro de magnesio (10mM), es igual a la del medio SOC (apartado anterior), pero sin la adición de glucosa (Hanahan, 1983). El medio se ajusta a pH7.

3.3.3- Medios para el crecimiento de levadura

3.3.3.1- Medio YPDA (*Yeast Peptone Dextrose Adenine*)

Medio de cultivo empleado para el crecimiento de *S. cerevisiae*. Se trata de medio rico, y en este trabajo se ha utilizado principalmente para el crecimiento en medio sólido de la cepa AH109 previo a la transformación mediante el método “lazy bones” (Apartado 3.8.3), ya produce mayor número de unidades formadoras de colonias. Está compuesto por glucosa (2% p/v), extracto de levadura (1% p/v), peptona (2% p/v), y agar bacteriológico (2% p/v). Una vez autoclavado, se agregó una solución estéril de adenina (30µg/mL).

3.3.3.2- Medio SD (*Synthetic Dextrose*)

Medio de cultivo empleado para el crecimiento de *S. cerevisiae*. Se trata de un medio mínimo, y en este trabajo se ha utilizado principalmente para el crecimiento de la cepa AH109 en medio líquido y sólido. Está compuesto por glucosa (2% p/v), YNB (del inglés, *Yeast Nitrogen Base*, al 0,7% p/v), ácido succínico (50mM – pH5,5). Cuando es necesario como medio sólido, se añade agar bacteriológico (2% p/v). Al tratarse de medio mínimo o sintético, se añaden según las necesidades de cada experimento aminoácidos y bases púricas o pirimidínicas como adenina (30µg/mL), triptófano (100µg/mL), histidina (30µg/mL), leucina (100µg/mL) y uracilo (30µg/mL). También se agregó metionina (100µg/mL), ya que el crecimiento de la cepa AH109 es inestable en ausencia de este aminoácido.

3.3.4- Sustancias termolábiles de selección

Cuando es necesario, los diferentes medios de cultivo se suplementan con diferentes antibióticos, una vez el medio ha sido esterilizado y enfriado por debajo de 50°C. Se preparan soluciones concentradas de cada antibiótico siguiendo las indicaciones de la bibliografía (Sambrook y col., 1989).

- Ampicilina (Amp). (Sal sódica; Roche). Se prepara una solución concentrada de 100mg/mL en agua destilada, se esteriliza por filtración y se guarda a - 20°C. Se utiliza a una concentración final de 50 ó 100µg/mL.
- Tetraciclina (Tet). (Hidrocarburo, Fluka). Se prepara una solución concentrada de 12,5mg/mL en etanol 50%, se esteriliza por filtración y se guarda a - 20°C protegida de la luz. Se utiliza a una concentración final de 12,5µg/mL.
- Gentamicina. Se prepara una solución concentrada de 50mg/mL en agua destilada, se esteriliza por filtración y se guarda a - 20°C. Se utiliza a una concentración final de 15 ó 50µg/mL.
- Kanamicina (Kan). (Sulfato ácido, Sigma). Se prepara una solución concentrada de 50mg/mL en agua destilada, se esteriliza por filtración y se guarda a - 20°C. Se utiliza a una concentración final de 25 ó 50µg/mL.
- Espectinomicina. Se prepara una solución concentrada de 100mg/mL en agua destilada, se esteriliza por filtración y se guarda a - 20°C. Se utiliza a una concentración final de 100µg/mL.
- Rifampicina (Rif). Se prepara una solución concentrada de 50mg/mL en agua destilada, añadiendo una solución de NaOH 2N, gota a gota, para su completa disolución. La solución se esteriliza por filtración y se guarda a - 20°C. Se utiliza a una concentración final de 50µg/mL.
- Sulfadiazina. Se prepara una solución concentrada de 5,25mg/mL en agua destilada, se esteriliza por filtración y se guarda a - 20°C. Se utiliza a una concentración final de 5,25µg/mL.
- Norespermidina. Polication empleado en los rastreos de mutantes, o en ensayos de germinación. Se encuentra en una solución concentrada 7M, y se usa a una concentración final de entre 2,8 y 6mM.

- Glufosinato-BASTA. Herbicida empleado en la selección de plantas modificadas genéticamente. Se prepara una solución concentrada de 25mg/mL, y se utiliza a una concentración final de 25mg/L.

3.4.-Manipulación y crecimiento de *A. thaliana*

3.4.1- Esterilización de semillas

3.4.1.1- Método húmedo

Las semillas se esterilizan en su superficie tratándolas en primer lugar con 1mL de una solución de etanol al 70% (v/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v) durante 15 minutos. A continuación se elimina esta solución y se añade 1mL de una segunda solución de lejía al 2% (v/v) y Tritón X-100 0,05% (v/v). Finalmente, se elimina la segunda solución y las semillas se lavan 3 veces con agua destilada estéril (1mL en cada uno), guardándose sumergidas en agua a 4°C durante 3 días para su correcta estratificación antes de su siembra.

3.4.1.2- Método seco

Las semillas se esterilizan en su superficie tratándolas en primer lugar con 1mL de una solución de etanol al 70% (v/v) y SDS 0,05%, durante 25 minutos en agitación. A continuación, una vez retirada la solución anterior, se añade 1mL de una segunda solución de etanol al 70%, durante 5 minutos, con la que eliminamos los restos de SDS. Por último, las semillas junto con la solución, se depositan sobre un papel de filtro estéril en el interior de la cabina de flujo laminar, y se dejan secar al aire. Una vez secas, pueden ser sembradas o guardadas en microtubos y almacenadas durante un largo periodo de tiempo a 4°C.

En este caso, la estratificación de las semillas se lleva a cabo una vez son sembradas en el medio de cultivo correspondiente, dejándolas a 4°C durante 3 días.

3.4.2- Cultivo *in vitro* en medio sólido

El cultivo *in vitro* de *A. thaliana* en medio sólido se puede realizar tanto en posición horizontal, como en posición vertical. Para el cultivo en horizontal, se emplean placas petri de 9 cm de diámetro con 25mL de medio MS cada una. Para el cultivo en vertical, se emplean placas petri cuadradas, de 12 x 12 cm (DELTALAB) con 75mL de medio MS cada una, suplementadas o no (al igual que en cultivo horizontal) con distintas concentraciones de aditivos (antibióticos, herbicidas, etc...), dependiendo del experimento a realizar en cada caso.

En todos los casos, las placas se sellan con cinta porosa Micropore™ de 1,25 cm de grosor (para cultivo horizontal) o de 2,5 cm (para cultivo vertical), y se incuban en una cámara con condiciones controladas de 23°C de temperatura, fotoperiodo de día largo y una intensidad de luz de 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.4.3- Cultivo *in vitro* en medio líquido

En el cultivo *in vitro* de *A. thaliana* en medio líquido se emplean placas de cultivo en suspensión de 6-12 pocillos (VWR). En cada pocillo se añaden entre 5-7mL de medio MS (suplementados o no con distintas concentraciones de aditivos dependiendo del experimento a realizar en cada caso), depositando sobre el medio 3 plántulas de 7 días (germinadas en medio MS sólido en posición horizontal). Las placas se mantienen en agitación (90-110rpm), en cámara de crecimiento bajo las condiciones descritas en el apartado anterior, el tiempo necesario dependiendo del experimento.

3.4.4- Cultivo en invernadero

Las plantas de *A. thaliana* se cultivan en una mezcla 2:1:1 de Sustrato Profesional (Pelemix España S.L.): Perlita Premium (Gramoflor): Vermiculita (Perlindustria 2002). Se utilizan dos tipos de macetas, unas de 12 cm de diámetro para los experimentos de transformación genética (Apartados 3.4.5 y 3.5.1), y otras cuadradas, de 7x7x6,5 cm (para el resto de experimentos). En todos los casos, se colocan en bandejas que se irrigan 2 veces por semana. Las condiciones de crecimiento en el invernadero son de día largo, 23°C de temperatura, 70% de humedad relativa y una intensidad de luz de 130 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.4.4.1- Solución nutritiva

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

3.4.5- Transformación genética mediante inmersión floral

Para la transformación de arabis se emplean de 5 a 8 plantas por maceta de 12 cm de diámetro, cultivadas en invernadero. Cuando cada individuo posee una inflorescencia primaria de alrededor de 10 centímetros de longitud, se corta el ápice de ésta para promover la aparición de inflorescencias secundarias y tener mayor cantidad de capullos florales. Unos 7 ó 10 días después se realiza la transformación de las plantas según el método publicado por Bent (2000).

Inicialmente se agrega 1mL de cultivo saturado de *A. tumefaciens* con el vector de interés, a 200mL de medio LB con los antibióticos apropiados, y se incuba en agitación a 28°C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se recogen por centrifugación en frío a 4000rpm durante 15 minutos, y se resuspenden en 400mL de solución de transformación compuesta por sacarosa 5% (p/v), cloruro de magnesio 10mM, MES 1 g/L y el detergente Silwet L-77 al 0,02% (v/v) (Lehle Seeds).

La solución de transformación se coloca en un recipiente donde se introduce la parte aérea de las plantas durante 1 minuto. Luego, se cubren las plantas con bolsas de plástico para mantener la humedad y aumentar la eficiencia de la transformación.

Después de 2 días de cocultivo, se realizan cortes en la bolsa para disminuir la humedad, y al día siguiente se retiran las bolsas, y se mantienen las macetas en el invernadero hasta recoger la población de semillas transgénicas T₁.

3.4.5.1- Manipulación y obtención de líneas puras transgénicas T₃

Las plantas empleadas en la transformación se denominan plantas T₀. Una vez obtenida la población de semillas transgénicas T₁, se esterilizan mediante el método seco, se siembran dejándolas caer al azar desde el papel donde se han secado, y se cultivan en medio de cultivo MS sólido suplementado con los antibióticos adecuados

para el T-DNA introducido (Kan 50mg/L, Higromicina 25mg/L), y cefotaxima (100mg/L) para inhibir el crecimiento de agrobacterium. Tras un periodo de estratificación de 3 días a 4°C, las placas se transfieren a una cámara de crecimiento durante 2 semanas. Las plantas que no poseen el gen de resistencia, es decir, que no han sido transformadas, sufren un retraso en el crecimiento (debido a la presencia de antibióticos en el medio). Los transformantes (T_1) resistentes se desarrollan normalmente y se trasplantan a tierra, y entre 40 y 45 días después se recogen las semillas de cada línea (población T_2), y se siembran de nuevo del mismo modo que la generación T_1 , y en el mismo medio pero sin cefotaxima. La selección de las líneas con una sola integración del transgén se fundamenta en la elección de la descendencia (población T_2) que se ajuste a una segregación con ratio 3:1 (3 resistentes: 1 sensible, que según las leyes mendelianas sería indicativo de tener una inserción)(Apartado 3.17.2).

Una vez elegidas las líneas con una inserción, se trasplantan para cada línea entre 5 y 15 plántulas resistentes a tierra, para obtener la siguiente generación (población T_3), y así aislar de la misma forma individuos homocigotos para el transgén, que serían aquellos cuyas semillas fueran 100% resistentes al antibiótico de selección. Estas plantas se siembran al mismo tiempo que sus respectivos controles silvestres.

Una vez seleccionadas las líneas T_3 con el 100% de plantas resistentes al antibiótico, se realizan los estudios fenotípicos y moleculares correspondientes en cada caso.

3.4.6- Rastreo de mutantes

Para el rastreo de mutantes tolerantes a NE se emplean placas petri de 9 cm de diámetro con 25mL de medio de cultivo, suplementadas con distintas concentraciones de NE, dependiendo de la colección empleada en cada caso, y en función de la tolerancia de cada fondo genético a este polication.

En este rastreo se emplean un total de 109972 líneas (entre todas las colecciones, con aproximadamente 700000 semillas), población denominada como S_0 .

En el caso del rastreo primario, se utiliza una densidad de siembra de aproximadamente 2000 semillas por placa en todos los casos. Para ello, se esterilizan por el método húmedo 2000 semillas por cada tubo, y tras el periodo de estratificación, se elimina el agua y se les añade 0,5mL de agarosa 0,1% (p/v). Esta solución de agarosa en la que se encuentran las semillas, y junto con la creación de una

capa fina y uniforme de agarosa encima de la placa de cultivo (se añaden 0,2 mL de agarosa 0,1% y se distribuyen en el medio con ayuda de perlas de vidrio), nos asegura una distribución de las semillas más homogénea, al ser depositadas en la placa y distribuidas con ayuda de un asa de siembra.

Tras un periodo de cultivo de entre 5-12 días, se rescatan los mutantes putativos (población S_1) de cada colección, es decir, aquellos que presentan ambos cotiledones expandidos y verdes. Estos candidatos se traspasan a medio MS pH 5,7 para elongar la raíz y asegurar así un trasplante y aclimatación correcta en tierra, para obtener la descendencia (población S_2) de cada uno de ellos.

En el caso del rastreo secundario (población S_2), se utiliza una densidad de siembra de 500 semillas por placa en todos los casos, procediendo a la siembra del mismo modo que el anteriormente citado. Dado que disponíamos de un número elevado de líneas mutantes putativas, se realizó el rastreo secundario a gran escala, eligiendo aquellas líneas que visualmente presentaba una mayor germinación (ambos cotiledones verdes y expandidos) respecto a su control silvestre. Este rastreo se realiza para confirmar el fenotipo de tolerancia a NE observado en el rastreo primario, así como el fenotipo de tolerancia a BASTA/Kanamicina conferida por la presencia del T-DNA, dependiendo de la colección

Debido al gran número de semillas y líneas mutantes utilizadas en el rastreo de esta tesis doctoral, la duración de este se puede prolongar sobre un año desde que se inicia el rastreo primario, hasta que se obtienen mutantes confirmados resistentes tanto al agente de selección (noespermidina) como a los marcadores de selección incorporados en cada colección (BASTA/kanamicina) (Figura 3.15).

3.5- Manipulación y crecimiento de *Nicotiana benthamiana*

3.5.1- Cultivo en invernadero

Las plantas de *N. benthamiana* se cultivan en unas condiciones similares a las de *arabidopsis* (Apartado 3.4.4). En este caso, debido al porte de la planta se utilizan macetas redondas de 12 cm de diámetro, y la solución nutritiva empleada en el riego fue la misma que la descrita en el Apartado 3.4.4.1.

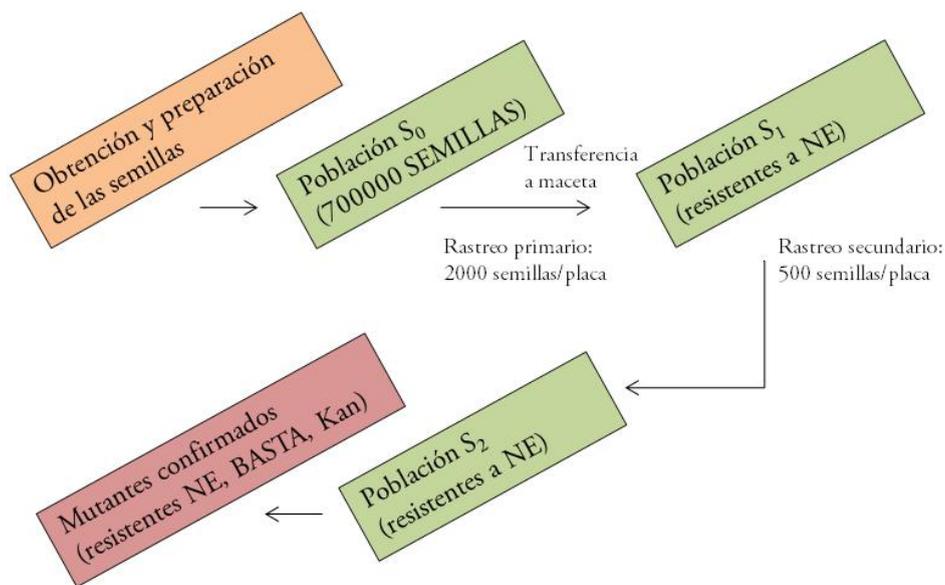


Figura 3.15. Diagrama del rastreo realizado en el presente trabajo. Observamos los apartados de los que consta un rastreo de mutantes de estas características.

3.5.2- Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*

En este método se emplean plantas de aproximadamente 20 días de edad, y se transforman con una mezcla de 2 tipos de agrobacterium, uno con la construcción de interés, y otro con la construcción que codifica la proteína p19, que inhibe el silenciamiento génico en *N. benthamiana*. Inicialmente, para cada tipo de agrobacterium se agrega 1mL de cultivo saturado a 100mL de medio LB con los antibióticos apropiados, y se incuba en agitación a 28°C durante 24 horas.

Transcurrido ese tiempo, las células se recogen por centrifugación en frío a 4000rpm durante 15 minutos, y se resuspenden en el volumen necesario de solución de infiltración (10mM MgCl₂, 10mM MES y acetosiringona 200µM, a pH5,6) para obtener una solución con una OD₆₀₀ (densidad óptica a 600 nanómetros) de 1, y se incuban a 28°C con agitación durante 3-4 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, mezclamos 5mL de cada cultivo de agrobacterium, portando la construcción con el gen de interés y la construcción que expresa la proteína 19.

Por último, con ayuda de una jeringuilla de 2mL, tomamos la mezcla las distintas líneas de agrobacterium, y presionando sobre el envés de la hoja y apretando el embolo, introducimos la solución bacteriana en los espacios intercelulares del mesófilo esponjoso de la hoja de *N. benthamiana* a través de los estomas (Figura 3.16). Entre 3 y 5 días después de la infiltración, podremos observar estas hojas en el microscopio de fluorescencia.

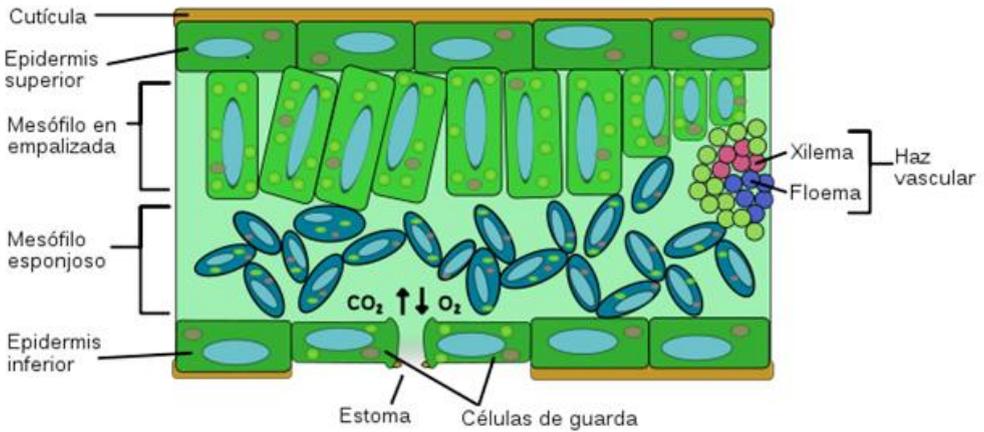


Figura 3.16. Esquema correspondiente a la sección transversal de una hoja de *N. benthamiana* (<http://trabajandoporunmundoverde.blogspot.com.es/2010/03/tipos-de-hojas.html>).

3.6- Manipulación y crecimiento de *Escherichia coli*

El crecimiento de *E. coli* puede realizarse tanto en medio líquido como en medio sólido. Para el crecimiento en medio líquido, se emplean tubos estériles de polipropileno de 15 ó 50mL, o matraces de erlenmeyer estériles de diferentes tamaños, que se colocan a 37°C con agitación orbital a una velocidad de 200rpm.

Para el crecimiento en medio sólido de forma rutinaria, se emplean placas petri de 9 cm de diámetro con 25mL de medio LB, suplementado o no con antibióticos o aditivos, y se colocan invertidas en una estufa a 37°C.

3.6.1- Preparación y transformación de células competentes

3.6.1.1- Preparación de células competentes DH5α para choque térmico

La preparación de células quimiocompetentes de la cepa DH5α se realiza por

el método descrito por Inoue y colaboradores en 1990. Con este método se consiguen competentes con una eficiencia de transformación de 10^9 ufc (unidades formadoras de colonias)/ μg de ADN plasmídico, y consiste en inocular en 250mL de medio SOB un precultivo saturado de células DH5 α y dejar crecer a 18°C, con agitación orbital de 200rpm, hasta alcanzar una OD₆₀₀ de aproximadamente 0,6. Una vez obtenido el cultivo adecuado, se incuba 10 minutos en hielo, y se centrifuga a 2500rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se resuspende en 80mL de solución TB (PIPES 10mM, MnCl₂ 55mM, CaCl₂ 15mM, KCl 250mM) fría, se incuba de nuevo 10 minutos en hielo y se centrifuga a 2500rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se resuspende en 20mL de TB, y se agrega DMSO a una concentración final de 7%. Por último, tras incubar la suspensión celular 10 minutos en hielo, se divide en alícuotas de 100 μL , se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenan en un congelador a -80°C hasta su uso.

3.6.1.2- Transformación de células competentes DH5 α por choque térmico

Esta cepa se utiliza de forma rutinaria para la obtención y fabricación de plásmidos. Se añaden unos microlitros del ADN a introducir (plásmido, mezcla de ligamiento o de recombinación) a una alícuota de 100 μL de células competentes y se coloca 30 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo se realiza un choque térmico de 2 minutos a 42°C, e inmediatamente se coloca en hielo durante 2 minutos. A continuación, se agregan 500 μL de medio SOC y se incuba 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente, se extiende con ayuda de perlas de vidrio todo el volumen en dos placas de LB-Agar (medio LB sólido) con el antibiótico que corresponda, según el plásmido empleado.

3.7- Manipulación y crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*

El cultivo de *A. tumefaciens* se realiza como con *E. coli*, salvo con la excepción de que la temperatura de crecimiento es a 28°C.

3.7.1- Preparación y transformación de células competentes

3.7.1.1- Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

A partir de 1mL de cultivo saturado de la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*, se inoculan 100mL de medio LB con los antibióticos correspondientes, hasta obtener el cultivo con una OD₆₀₀ de aproximadamente 1. La suspensión se centrifuga a 4000rpm durante 15 minutos y 4°C, y el precipitado celular se resuspende en 1mL de CaCl₂ 20mM. La suspensión se divide en alícuotas de 50μL, que se congelan rápidamente en nitrógeno líquido y se guardan a -80°C hasta su uso.

3.7.1.2- Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se siguió un protocolo modificado del método de congelación/descongelación de Holsters y col. (1978), que consiste en añadir unos microlitros de la solución del plásmido a una alícuota de 50μL de células competentes. La mezcla se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se preincuba durante 5 minutos a 37°C. A continuación, se añaden 0,5mL de medio SOC y se incuba a 28°C durante 4 horas con agitación a 200rpm. Finalmente, se extiende todo el volumen en medio LB sólido selectivo con la ayuda de perlas de vidrio.

3.8- Manipulación y crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

3.8.1- Preparación de células competentes para choque térmico

A partir de 1mL de cultivo saturado de células AH109 crecido toda la noche en medio SD líquido (suplementado con adenina, histidina, leucina, triptófano, uracilo y metionina), se inoculan 200mL de medio SD líquido (con 800μL de un precultivo saturado, diluyendo el inóculo 250 veces) y se incuban a 28°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ menor de 0,7 (si se pasa el cultivo, tendremos que diluir a 0,2 y esperar de nuevo hasta obtener la correcta OD).

Se realizan varias centrifugaciones sucesivas de 5 minutos a 2000rpm, hasta tener recogidos los 200mL de células en un tubo de 50mL. Se lavan las células con 5mL de tampón Li-TE (Acetato de litio 100mM, Tris pH7,5 10mM y EDTA 0,4mM), y se vuelven a centrifugar en las mismas condiciones. Se resuspenden nuevamente en 1mL de tampón Li-TE, incubándolas durante 30 minutos a 28°C, añadiendo posteriormente 100μL de ssDNA 1% (ADN de esperma de salmón), y

repartiendo las células en alícuotas de 50µL cada una. Se procede inmediatamente con la transformación de alta eficiencia (Apartado 3.8.2), o si se desean conservar a -80°C, se mezcla el contenido de cada tubo con 12µL de glicerol 80%, y se introducen directamente en el congelador hasta su uso.

3.8.2- Transformación de células competentes por el método de alta eficiencia.

Se añaden entre 5 y 10µL de ADN plasmídico a 50µL de células competentes AH109. Si las células estaban almacenadas a -80°C, se dejan 10 minutos en hielo antes de añadir el plásmido. Se agregan 600µL del tampón PEG-LiTE (PEG 4000 40% p/v, acetato de litio 100mM, Tris pH7,5 10mM y EDTA 0,4mM). Esta solución debe prepararse justo antes de proceder con la transformación. Se incuba la mezcla durante 30 minutos a 28°C, y posteriormente se somete a un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Finalmente, se centrifugan brevemente las células, retirando 500µL del sobrenadante, y resuspendiendo el precipitado celular en el volumen restante, extendiéndolo en medio sólido selectivo con la ayuda de perlas de vidrio.

3.8.3- Transformación de células por el método “Lazy bones”.

En este método, se emplean células crecidas en medio YPDA sólido por un máximo de 48 horas. Se añade a un microtubo 5µL de ssDNA 1%, entre 5 y 10µL de cada plásmido que deseemos introducir en las células de levadura, y se completa con H₂O MilliQ estéril hasta alcanzar un volumen de 50µL. En esta solución se resuspende el volumen de células que ocupan un asa de siembra de 10µL. Se añaden 500µL de solución de plaqueado LiTE, y se incuba la muestra durante al menos 6 horas a temperatura ambiente, agitando la mezcla de forma intermitente (hasta 4 días máximo de incubación).

Posteriormente se someten a un choque térmico a 42°C durante 15 minutos, se centrifugan brevemente las células, retirando 500µL del sobrenadante, y resuspendiendo el precipitado celular en el volumen restante, y por último se extienden en medio sólido SD selectivo con la ayuda de perlas de vidrio.

3.8.4- Ensayos de crecimiento en medio sólido

Las líneas celulares crecidas hasta saturación se emplean para obtener diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000). Con ayuda de un replicador, se depositan aproximadamente 3µL de cada dilución en placas con medio selectivo (SD-2, SD-3,

SD-4). Posteriormente se incuban a 28°C durante 3 ó 5 días en posición invertida, hasta observar un crecimiento adecuado.

3.9- Aislamiento de ácidos nucleicos

3.9.1- Extracción a pequeña escala de ADN genómico de *A. thaliana*

Este protocolo permite la extracción de forma rápida y eficaz, de suficiente cantidad de ADN genómico para la comprobación mediante PCR, de la presencia o ausencia de secuencias génicas en arabidopsis. El método consiste en homogeneizar una hoja o fragmento de la misma de aproximadamente 1 cm², en un microtubo con ayuda de un pistilo de polipropileno. Una vez homogeneizado el tejido, se añaden 400µL de tampón de extracción compuesto por Tris-HCl pH7,5 200mM, NaCl 250mM, EDTA pH7,5 25mM y SDS 0,5% y se agita con agitador de vórtice. A continuación, se centrifuga a 14000rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, ya que el SDS precipita en frío. Se transfieren 300µL del extracto celular a un nuevo microtubo, evitando tomar restos celulares. Se precipita el ADN en solución agregando 300µL de isopropanol, mezclando por inversión e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga de nuevo a 14000rpm durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante. Una vez el precipitado está seco, se resuspende en 50µL de agua *MilliQ* estéril, libre de nucleasas.

3.9.2- Aislamiento a gran escala de ADN genómico de *A. thaliana*

Para el aislamiento a gran escala de ADN genómico, empleado en diferentes técnicas durante el desarrollo de la presente tesis doctoral (TAIL-PCR, Southern blot, rescate plasmídico), se emplea una adaptación del método del CTAB descrito por McKinney y colaboradores (1995). Aproximadamente un gramo de tejido vegetal se homogeneiza en mortero usando nitrógeno líquido. Este homogeneizado se coloca en un tubo Beckman de 50mL, se le añaden 5mL de tampón de extracción CTAB 2% (2% p/v CTAB, 100mM Tris-HCl pH8, 20mM EDTA, 1,4M NaCl y 1% p/v PVP Mr 40000) y se incuba a 60°C durante 15 minutos. A continuación se agregan 5mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcla mediante agitación y se centrifuga a 2000rpm durante 10 minutos. Se toma la fase acuosa superior, se añaden 0,1 volúmenes de una solución de CTAB 10% p/v y NaCl 0,7M, y se calienta a 60°C durante 2 minutos.

A continuación, se añaden dos volúmenes de agua estéril fría para inducir la precipitación del complejo CTAB/ADN. Los tubos se incuban en hielo durante 3 horas y se recoge el precipitado mediante centrifugación a 12000rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en 0,4mL de una solución de TE1X y NaCl 1M, se añaden 0,8mL de etanol absoluto frío para inducir la precipitación del ADN y se centrifuga a 12000rpm durante 10 minutos. Finalmente, el ADN precipitado se lava dos veces con etanol 70% (agregando 1mL de esta solución, centrifugar y eliminar el sobrenadante), y el precipitado final se resuspende en 100µL de agua *MilliQ* estéril, libre de nucleasas.

3.9.3- Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Se centrifugan de 1,5 a 3mL de cultivo saturado crecido en LB durante toda la noche, a 14000rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El precipitado celular se resuspende en 200µL de tampón GTE (Glucosa 50mM, Tris-HCl pH8 25mM, EDTA pH8 10mM), mediante pipeteo. Se añaden 300µL de tampón de lisis (NaOH 0,2N y SDS 1%), mezclando por inversión e incubando 5 minutos en hielo. Posteriormente, se añaden 300µL de tampón KOAc 3M, pH4,8 (también puede ser NaOAc pH4,8), y se procede de igual forma que en el paso anterior. A continuación, se centrifuga a 14000rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se recupera el sobrenadante transfiriéndolo a un nuevo tubo. Es muy importante en este paso no arrastrar restos celulares. Se añaden 2µL de RNAsa A a 10mg/mL, y se incuba a 37°C durante 15 minutos. Tras el tratamiento con la RNAsa, se realiza una purificación con cloroformo, y para ello, se añaden 400µL de cloroformo y se agita manualmente (no usar mezclador de vórtice), centrifugando después a 5000rpm durante 2 minutos. Una vez la solución de ADN ha sido purificada, se precipita añadiendo el mismo volumen de isopropanol, mezclando por inversión e incubando 10 minutos en hielo. Finalmente, se recoge el ADN plasmídico por centrifugación a 14000rpm durante 10 minutos, el precipitado se lava con etanol 70% del mismo modo que en el apartado anterior, centrifugándolo posteriormente. Una vez el ADN está seco, se resuspende en 50µL de agua *MilliQ* estéril, libre de nucleasas.

3.9.4- Extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*

Este método se emplea para el rescate de los plásmidos de aquellas células del rastreo de doble híbrido capaces de crecer en medio selectivo (Apartado 3.12). Para ello, se crecen 5mL de cultivo de levadura hasta saturación, en el medio selectivo para

el plásmido de interés (aproximadamente 24 horas). Se recogen las células en un microtubo de 1,5mL centrifugando a 14000rpm durante 1 minuto y repitiendo tantas veces sea necesario hasta completar con la totalidad del cultivo. Una vez eliminado el sobrenadante, se resuspende el precipitado celular en 200 μ L de tampón de lisis (TE1X, 0,1M NaCl, 2% Tritón x100 y 1% SDS), 200 μ L de PCI (del inglés, *Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol*) y 200 μ g de bolas de diámetro 0,5 mm. Se incuba a temperatura ambiente con agitación durante 5 minutos. Se añaden 200 μ L de TE1X (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA) y se incuba en el agitador durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Tras centrifugar a 14000rpm durante 1 minuto, se toma la fase superior y se pasa a un microtubo nuevo. Para precipitar el ADN se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto y se incuba a -80°C durante 1 hora. Después se centrifuga a 14000rpm durante 10 minutos, el precipitado se lava dos veces con etanol 70% y se deja secar.

Finalmente, el ADN se resuspende en 10 μ L de TE1X y se utiliza para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* mediante choque térmico.

3.9.5- Preparación de la genoteca de *A. thaliana* en células de *E. coli*

Se transforman células competentes de *E. coli* DH5 α , a partir de unos microgramos de ADN de la genoteca preparada a partir de mRNA de arábidopsis (Nemeth y col., 1998) en el plásmido pACT2 (Figura 3.14), hasta obtener un total de transformantes en medio selectivo de unos dos millones de colonias. Mediante un asa de siembra de 10 μ L, se recogen y juntan las colonias en 250mL de medio LB, obteniendo un cultivo a una densidad óptica OD₆₀₀ de 2.

Se realiza la extracción del plásmido con 100mL del cultivo, obteniendo un total aproximado de 15mg de ADN plasmídico (protocolo adaptado al volumen celular del apartado 3.9.3). El resto del cultivo, aproximadamente 150mL, se centrifuga en 15 tubos conteniendo 10mL cada uno, y se resuspende el depósito celular de cada tubo en 1mL de medio LB, al que se agregan 270 μ L de glicerol 80% y se congelan a -80°C. Cada glicerinado obtenido posee aproximadamente 10¹⁰ células DH5 α portando la genoteca construida en el plásmido pACT2 (Figura 3.14).

3.9.6- Aislamiento de ARN de *A. thaliana*

Se homogeneiza en mortero 0,5 gramos de tejido vegetal congelado con nitrógeno líquido, se coloca en un microtubo y se agregan 0,75mL de PCI y 0,75mL

de TCES (0,2M Tris, 0,2M NaCl, 50mM EDTA, 2% p/v SDS, ajustado a pH8 con HCl). El homogeneizado se incuba a 50°C durante 15 minutos. A continuación, se centrifuga a 6000rpm durante 10 minutos, se toma la fase superior acuosa y se coloca en un nuevo tubo donde se añade un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Una vez añadida la solución orgánica, se mezcla por agitación y se vuelve a centrifugar a 6000rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se pasa la fase superior a un tubo nuevo y el ARN se precipita agregando un volumen de LiCl 6M y manteniéndolo a -20°C durante 4-5 horas.

Finalmente, se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos, el precipitado se lava con etanol 70% y se resuspende en 20µL de agua estéril *MilliQ* estéril, libre de nucleasas. Para comprobar la integridad del ARN se emplean geles no desnaturizantes (Apartado 3.10.3).

3.10- Análisis de ácidos nucleicos

3.10.1- Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de los ácidos nucleicos (ADN o ARN), se realiza mediante espectrofotometría en el rango ultravioleta (260 nanómetros), utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, a partir de 1µL de muestra.

3.10.2- Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para comprobar la integridad y concentración del ADN plasmídico, ADN genómico de *A. thaliana* y de los productos de la PCR, se emplean geles de diferente porcentaje de agarosa (p/v), principalmente entre 0,7 y 1,5%, en tampón de electroforesis TBE 0,5X (45mM Tris-Base, 45mM ácido bórico y 1mM EDTA). Tanto el tampón de electroforesis como el gel contienen 0,05% (p/v) de bromuro de etidio. La visualización de ácidos nucleicos (ADN o ARN), se realiza iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda. Como tampones de carga se utilizan: Tampón 6X naranja (50% glicerol, 60mM Tris-HCl pH8, 6mM EDTA y 0,35% p/v Orange G) y Tampón 6X azul (40% p/v sacarosa, 0,1M EDTA y 0,25% p/v azul de bromofenol). Como marcadores de tamaño y peso molecular se utilizan los patrones comerciales 1kb Plus y λ /HindIII de Fermentas.

3.10.2.1- Purificación de ADN desde gel de agarosa

Esta técnica se realiza tras la electroforesis (en las condiciones indicadas en el apartado anterior), del producto de la restricción de plásmidos para diferentes eventos de clonaje. Una vez identificada la banda de interés, se extrae del gel con ayuda de una espátula y se introduce en una jeringuilla de 2mL, dejándola en el congelador durante 10 minutos a -20°C. Se preparan filtros Whatman de 0,2µm añadiendo 200µL de ARN de transferencia al 0,1% (p/v), bloqueando así los sitios de unión inespecíficos de ácidos nucleicos.

Se coloca el filtro en la jeringuilla, y se empuja el embolo en tres ocasiones consecutivas, o hasta que el gel pase completamente a través del filtro. Se reextrae el ADN residual añadiendo 200µL de TE1X, obteniendo una solución de aproximadamente entre 0,6 y 0,8mL. Se añade 5µL de ARN de transferencia al 1% (p/v), y tras mezclar bien la solución mediante pipeteo, se precipita el ADN añadiendo por cada volumen de ADN dos volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volumen de NaCl 5M. Esta mezcla se deposita en el congelador a -20°C durante 1 hora, y posteriormente se centrifuga a 14000 rpm durante 10 minutos. El precipitado de ADN se lava con etanol 70% para eliminar posibles restos de sales, añadiendo 1mL de esta solución y agitando el microtubo por inversión. Se centrifuga de nuevo a 14000 rpm durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y secando durante 5 minutos en la centrifuga de vacío a 30°C. Finalmente, el precipitado de ADN se resuspende en 40µL de agua *MilliQ* estéril, libre de nucleasas.

3.10.3- Electroforesis de ARN bajo condiciones no desnaturalizantes

Se preparan geles de agarosa al 1% en tampón TAE1X, y las muestras se preparan con el tampón de carga 1,25X (55% v/v formamida, 20% v/v formaldehído, 12,5% v/v MAE 10X, 8% v/v glicerol, 0,05% p/v azul de bromofenol y 0,001% p/v de bromuro de etidio). Antes de cargarlas en el gel, las muestras se calientan a 56°C durante 10 minutos. El gel se deja correr entre 1-2 horas a 50 voltios, y se visualiza bajo luz ultravioleta con la ayuda de un documentador de geles.

3.10.4- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El estudio de la presencia del T-DNA introducido en arábidopsis o en cualquier otra especie de cualquier fragmento de ADN de interés, así como la obtención de un fragmento para ser clonado, se realiza mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basada en la capacidad de las ADN polimerasas de replicar un fragmento concreto de ADN mediante unos cebadores específicos y unos ciclos adecuados de temperatura (Saiki y col., 1985). Todos los cebadores empleados en este trabajo han sido sintetizados por la empresa Isogen Life Science. En el anexo 1 se muestran todos los oligonucleótidos empleados en esta tesis doctoral (en las reacciones de PCR, PCR diagnóstica, RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR a tiempo real).

Las reacciones de PCR se llevan a cabo de forma rutinaria en microtubos, donde se realiza una mezcla de reactivos (Tabla 3.1), que permite la amplificación de fragmentos de ADN mediante diferentes ciclos de temperatura.

Tabla 3.1. Reactivos necesarios en una reacción de PCR.

ADN molde	1μL
Tampón PCR 10x	3μL
dNTPs 10mM	0,6μL
Cebador específico directo (10μM)	1,5μL
Cebador específico reverso (10μM)	1,5μL
ADN polimerasa (Taq) 1U/μL	0,6μL
H ₂ O MilliQ	volumen hasta 30μL

En las reacciones rutinarias se utiliza la enzima Taq polimerasa (Biotools). Todas las reacciones de PCR se llevan a cabo en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) con el siguiente programa:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos.
- 30-35 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 95°C,
 - Hibridación de los cebadores: 30 segundos a una temperatura de anillamiento 2°C inferior a la T_m más baja de alguno de los oligonucleótidos empleados,

- Extensión: 1 minuto por kb a amplificar, a una temperatura de 72°C.
- 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos.
- 1 ciclo a 4°C para mantener el amplicón en buenas condiciones hasta el análisis.

3.10.4.1- Diseño de los oligonucleótidos

El diseño de los cebadores u oligonucleótidos (también llamados oligos), es un paso clave en todos los ensayos en los que intervenga la reacción en cadena de la polimerasa.

En esta tesis doctoral, el diseño de los cebadores se ha realizado mediante la ayuda de la aplicación web Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), excepto en los casos en los que se han añadido sitios de restricción necesarios para las distintas estrategias de clonaje empleadas. Las condiciones generales del diseño son una longitud óptima de 20 nucleótidos, con una presencia en G/C del 60% aproximadamente, y, de forma general, se diseñaban cebadores con unas temperaturas de hibridación en torno a los 60°C. Una vez obtenidas las secuencias, se analizan mediante el programa Amplify 3.1, para confirmar que las parejas de oligos empleadas en cada amplificación no forman dímeros entre sí, inhibiendo así parte de la reacción. Además, cuando se tratan de análisis de expresión, se comprueban mediante BLASTn (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) de la página del TAIR (The Arabidopsis Information Resource), para confirmar que dichos cebadores no hibriden en otras regiones del genoma de *arabidopsis*.

3.10.4.2- Purificación de productos de PCR

La purificación de productos de PCR necesarios para diferentes eventos de clonaje o secuenciación, se realiza mediante precipitación del ADN, añadiendo por cada volumen de ADN dos volúmenes de etanol absoluto, y 0,1 volúmenes de NaCl 5M. Esta mezcla se deposita en el congelador a -20°C durante 1 hora, y posteriormente se centrifuga a 14000rpm durante 10 minutos. El precipitado de ADN se lava con etanol 70% para eliminar posibles restos de sales, añadiendo 1mL de esta solución y agitando el microtubo por inversión. Se centrifuga de nuevo a 14000rpm durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y secando durante 5 minutos en la centrifuga de vacío a 30°C. Finalmente, el precipitado de ADN se resuspende en agua

MilliQ estéril, libre de nucleasas, en un volumen igual o inferior al volumen de partida.

3.10.5-Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Esta técnica se emplea en experimentos de comprobación de plásmidos, para análisis Southern blot, o en eventos de clonaje. Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizan en las condiciones de reacción recomendadas por los respectivos proveedores. En todos los casos se utilizan de 1 a 5U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

3.10.6- Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se lleva a cabo utilizando 1U de la enzima ligasa de INVITROGEN *T4 DNA Ligase* (Ref. 15224-041) por cada 10 μ L de volumen de reacción. Esta es una herramienta, junto con la digestión de fragmentos de ADN con endonucleasas de restricción, que constituían la principal herramienta de clonaje para la creación de plásmidos recombinantes. Para la ligación de fragmentos, se utilizan 100 ng de inserto manteniendo siempre una relación molar 1:3 (vector:inserto). La incubación se realiza durante 1h a 22°C, y un mínimo de 16 horas a 16°C. Acto seguido, se transforma el producto de la ligación en células competentes de *E. coli*.

3.10.7- Comprobación de la presencia del T-DNA

El estudio de la presencia del T-DNA introducido en el genoma de los mutantes de arabis se realiza mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o mediante análisis Southern blot a partir de ADN genómico de varias plántulas de cada mutante, crecidas en invernadero durante 15 días.

3.10.7.1- Análisis Southern blot

Se digieren 2 μ g de ADN (extraído según el Apartado 3.9.2), con la enzima de restricción *Bam*HI durante 2 horas. Tras la digestión, se realiza una electroforesis en gel de agarosa 1% con el tampón de electroforesis TAE 1X (40mM TrisBase, 20mM ácido acético y 2mM EDTA) a un voltaje de 10V durante 12 horas. Finalizada la electroforesis, el ADN se desnaturaliza sumergiendo el gel en una solución de NaOH 0,4M durante 10 minutos. Posteriormente se transfiere el ADN a una membrana Hybond N⁺ (Amersham) mediante la técnica de transferencia de ADN en medio

alcalino, descrita en Sambrook y Russell (2001), durante 12 horas. Finalmente, el ADN se fija covalentemente a la membrana empleando radiación ultravioleta usando un aparato Stratalinker (Stratagene), a 120mJ durante 5 minutos. La membrana con el ADN fijado se coloca en un tubo de hibridación ThermoHybaid (Thermo). Se añaden 5mL de tampón de hibridación PSE (0,4M Na₂HPO₄ pH7,2, 1mM EDTA y 7% p/v SDS) previamente calentado a 65°C, y se deja durante 20 minutos en un horno con agitación circular a 65°C.

A continuación, se agregan 10mL de tampón de hibridación PSE, precalentado a 65°C, y la sonda radioactiva apropiada (según el fragmento de ADN que se pretende detectar en la membrana, ver apartado siguiente) y se deja durante 16-18 horas a 65°C en agitación. Posteriormente, se realizan 2 lavados de la membrana de 30 minutos a 65°C con el tampón de lavado (40mM Na₂HPO₄ pH7,2, 1mM EDTA y 5% p/v SDS). Tras los lavados, la membrana se seca y se envuelve en plástico Saran Wrap. Finalmente, la membrana se expone con una película Hyperfilm (Amersham) a -80°C en un casete de revelado Hypercassette (Amersham) con pantallas intensificadoras. Las películas son reveladas con el procesador automático X-omat 2000 (Kodak).

3.10.7.2- Marcaje radioactivo de sondas

El ADN empleado para la síntesis de sondas radioactivas en los experimentos de Southern blot, se obtiene mediante amplificación por PCR de ADN genómico (Apartado 3.10.4). El producto de PCR se visualiza en un gel TBE 0,5X y se purifica usando el kit “*Rapid Gel Extraction System*” (Marligen).

Para el marcaje radioactivo de las sondas se usa el método de marcaje por hexanucleótidos (“*random priming*”). Para ello, 120 ng de ADN molde en 15µL de agua estéril se desnaturaliza incubando a 95°C durante 10 minutos. A continuación, se coloca el microtubo en hielo y se agregan 5µL de OLB 5X (0,1M MES pH6,8, 5mM DTT, 25mM MgCl₂, 0,2mg/mL hexanucleotidos al azar “*hexanucleotides random primers*” (Boehringer), 0,1mM dATP, 0,1mM dGTP, 0,1mM dTTP), 1µL del fragmento klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* (10U/µL), 2,5µL de BSA 10X (Albúmina de Suero Bovino) y 2,5µL de α-³²P dCTP (10 µCi/µL) como nucleótido radioactivo. Finalmente, la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 8-10 horas y, transcurrido ese tiempo, se añaden 200µL de TE 1X (1mM EDTA, 10mM Tris pH8) para detener la reacción.

Antes de agregar la sonda al tampón PSE, para proceder con la hibridación de la membrana, la sonda se desnaturaliza incubandola a 95°C durante 10 minutos.

3.10.8- Análisis de la expresión génica

3.10.8.1- Síntesis de cDNA para PCR semicuantitativa y a tiempo real

Para llevar a cabo la síntesis de ADN complementario a los ARNs extraídos en el aislamiento de ARN de *Arabidopsis* (Apartado 3.9.6), se utiliza el kit de FERMENTAS LIFE SCIENCES *Maxima*® *Universal First Strand cDNA Synthesis Kit* (Ref. K1641). Antes de usar dicho kit, el ARN debe haber sido tratado con DNAsa I, para eliminar cualquier resto de ADN en la muestra, y poder asegurar que los resultados posteriores son solo reflejo del ARNm. En cada reacción se añadió el volumen necesario para contener 3-5µg ARN, 2µL de tampón, 1µL de la enzima retrotranscriptasa, y el volumen de agua necesario hasta completar un volumen final de 20µL. Esta reacción, se incubó en un termociclador con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C seguido de un paso final de 5 minutos a 85°C. Terminado el proceso se añadieron 20µL de agua MilliQ a cada tubo de reacción y se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.10.8.2- RT-PCR semicuantitativa

Este tipo de PCR tiene como objetivo el análisis semicuantitativo de la expresión génica, utilizando como molde de la reacción cDNA. Las condiciones son similares a las de la PCR detalladas en el Apartado 3.10.4, pero el número de ciclos suele ser menor. Se trata simplemente de un análisis semicuantitativo, ya que el único dato del que dispondremos será el gel producto de la electroforesis en agarosa del amplicon. De esta forma visual, podremos diferenciar aquellas líneas que poseen una expresión aumentada o disminuida del gen en cuestión.

3.10.8.3- qRT-PCR

La qRT-PCR o PCR cuantitativa a tiempo real, es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa, y se emplea para amplificar y cuantificar los niveles de ARN mensajeros de los genes de interés de forma absoluta. La diferencia con la variante semicuantitativa, es que en esta variante se adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir

fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos.

Para ello, se utiliza el kit de *Cultek Molecular Bioline* “PyroTaq EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX)”. Se prepara una mezcla de reacción con 4µL de la solución proporcionada por el kit, 0,5µL de cada oligonucleótido necesario para la reacción (10µM), y 14µL de agua MilliQ estéril, libre de nucleasas. A esta mezcla de 19µL, se le añade 1µL de cDNA molde para la amplificación. Cada reacción fue realizada por triplicado.

3.10.8.4- Análisis de la expresión génica mediante micromatrices de oligonucleótidos

En este análisis se han empleado micromatrices de oligos de la Universidad de Arizona denominados “Qiagen-Operon Arabidopsis Genome Array Ready Oligo Set (AROS) Version 3.0”. La información referente a este tipo de micromatrices, puede consultarse en la web “ag.arizona.edu/microarray”. Estas matrices están compuestas de 29000 oligonucleótidos de 70 pares de bases, que corresponden a 87 microRNAs y 28964 transcritos codificantes de proteínas, que representan a 26173 genes. El diseño de las micromatrices se ha realizado en base a la información de la base de datos “*TIGR Arabidopsis genome*” (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>) y al registro de microRNAs del “*Sanger Institute*” (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfan/mirna/index.shtml>).

En el diseño del análisis se decidió que se utilizarían dos líneas transgénicas, para la realización de 6 micromatrices.

Preparación de las muestras

Para cada micromatriz, se emplean del orden de 30 plántulas de 7 días de edad, cultivadas en medio MS sólido en posición horizontal. Estas plántulas se homogeneizan en mortero con nitrógeno líquido, procediendo con la extracción de ARN para cada una de los genotipos.

La extracción de ARN se realiza mediante el kit “NucleoSpin RNA” de Macherey-Nagel. Al material homogeneizado, se le agrega 350µL del tampón de lisis RA1 suplementado con 3,5µL de β-mercaptoetanol. Se agita con agitador de vórtice, y

se carga la muestra en la columna rosa presente en el kit. En esta columna se filtra la muestra para evitar el arrastre de restos insolubles.

Recuperamos el extracto celular y ajustamos las condiciones de la muestra para su fijación al filtro de la columna, añadiendo 350µL de etanol 70%, mezclando de nuevo con el agitador de vórtice, y cargando el total de la muestra en la columna de color azul presente en el kit. A continuación se centrifuga a 11000rpm durante 30 segundos. Descartamos el eluido, quedando los ácidos nucleicos retenidos en la matriz, y se agregan a la columna 350µL del tampón MDB (*Membrane Desalting Buffer*) para eliminar las sales presentes en el filtro, lo que hará más efectivo el tratamiento con rDNAsa. Se centrifuga de nuevo a 11000rpm durante 1 minuto, y se descarta el eluido. Después, preparamos la mezcla de reacción para el tratamiento con DNAsa, compuesta por 90µL del tampón de la enzima, y 10µL de rDNAsa, agregando a la columna 95µL por muestra. Se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Tras el tratamiento, la muestra de ARN queda libre de moléculas de ADN, por lo que no será necesario un tratamiento posterior con DNAsa I. A continuación, se añaden 200µL del tampón RA2 para inactivar la enzima, y acto después procedemos a centrifugar la columna a 11000rpm durante 30 segundos, descartando de nuevo el eluido. Posteriormente se realizan dos lavados consecutivos con 600 y 250µL del tampón RA3, centrifugando a 11000rpm durante 30 segundos y 2 minutos respectivamente, descartando después de cada centrifuga el eluido.

Finalmente, se inserta la columna en un microtubo libre de RNAsas y agregamos a cada filtro 20µL de agua libre de RNAsa, e incubamos a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras una última centrifugación a 11000rpm durante 1 minutos, recogeremos la muestra de ARN procedente de cada una de las líneas a analizar. Este paso se realiza por triplicado, obteniendo un total de 60µL de solución de ARN.

Preparación del ADN complementario

La preparación del ADN complementario de simple y doble cadena se realiza con el kit “Aminoallyl MessageAmpTM II aRNA kit” de Ambion. Para la síntesis de simple cadena, se toman 0,5µg de ARN y se añaden 0,5µL de oligo-dT T7 en un volumen total de 6µL.

Se mezcla con agitación suave y se incuba a 70°C durante 10 minutos, tras lo cual, se realiza un pequeño centrifugado para recuperar el volumen condensado en la

tapa, y se deja en hielo hasta agregar 4 μ L de la siguiente mezcla: 1 μ L de tampón de reacción de simple cadena 10X, 0,5 μ L de inhibidor de ribonucleasas, 2 μ L de dNTPs y 0,5 μ L de transcriptasa reversa. Una vez mezclado, se incuba a 42°C durante 2 horas.

Para la síntesis de ADN complementario de doble cadena, se añaden 40 μ L a cada muestra de la siguiente mezcla: 31,5 μ L de agua libre de nucleasas, 5 μ L de tampón de reacción de doble cadena 10x, 2 μ L de dNTPs, 1 μ L de ADN polimeras, y 0,5 μ L de RNAsa H.

Una vez mezclado, se incuba a 16°C durante 2 horas, y acto seguido, se procede con la purificación del ADN complementario.

Purificación del ADN complementario

Para llevar a cabo esta purificación utilizamos el kit “DNAClear™ cDNA Purification” de Ambion. En primer lugar se equilibra el filtro de la columna añadiendo 50 μ L del tampón de unión, e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. A la columna pretratada se le añade la mezcla resultante de añadir a la solución de ADN complementario del apartado anterior, 50 μ L de agua libre de nucleasas, hasta ajustar el volumen total a 100 μ L. A continuación se añaden 250 μ L del tampón de unión a cada muestra, mezclando por pipeteo y cargando los 350 μ L totales en la columna. Se centrifuga a 10000rpm durante 1 minuto, descartando el eluido. Se añaden 500 μ L del tampón de lavado a la columna, y se centrifuga a 10000rpm durante 2 minutos, transfiriendo la columna a un nuevo microtubo.

A continuación, se añaden 12 μ L de agua libre de RNAsas, precalentada a 50°C, y se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente, centrifugando a 10000rpm durante 1 minuto. Se procede de nuevo como el paso anterior, obteniendo un volumen total de ADN complementario de 24 μ L.

Finalmente, con ayuda de una centrifuga de vacío RVC 2-18 de “Christ”, se evapora la muestra hasta alcanzar un volumen de 7 μ L, y se procede con la síntesis de ARN marcado con el grupo 5-(3-aminoallyl) (aRNA).

Transcripción *in vitro* para la síntesis de aARNA

A partir del ADN complementario purificado en un volumen de 7 μ L (apartado anterior), se realiza una transcripción *in vitro*, obteniendo ARN marcado, que ha incorporado el nucleótido modificado 5-(3-aminoallyl)-UTP (aaUTP) que

servirá de conjugado para los fluoróforos. Para ello, a los 7 μ L se agregan 13 μ L de la siguiente mezcla: 1,5 μ L de aaUTP (50mM), 6 μ L de dATP dCTP dGTP (25mM), 1,5 μ L de solución de UTP (50mM), 2 μ L de tampón de reacción (10X), y 2 μ L de enzima T7.

Se incuba la mezcla de reacción a 37°C durante 18 horas, añadiendo después 80 μ L de agua libre de RNAsas y procediendo con la purificación del aRNA.

Purificación del aRNA

Esta purificación se lleva a cabo con el kit “Aminoallyl MessageAmp™ II aRNA kit” de Ambion. Se añaden 350 μ L del tampón de unión a cada muestra de aRNA, mezclando por pipeteo. A continuación se incorporan 250 μ L de etanol absoluto, cargando el volumen total en la columna proporcionada por el kit. Se centrifuga a 10000rpm durante 1 minuto, descartando el eluido. Se añaden 500 μ L del tampón de lavado a la columna, y se centrifuga a 10000rpm durante 1 minuto, descartando nuevamente el eluido. Se vuelve a lavar procediendo de la misma forma pero centrifugando durante 2 minutos, transfiriendo la columna a un nuevo microtubo.

A continuación, se añaden 50 μ L de agua libre de RNAsas, precalentada a 65°C, y se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente, centrifugando a 10000rpm durante 1,5 minutos. Se procede de nuevo como el paso anterior, obteniendo un volumen total de aARN de 100 μ L. Por último, se cuantifican las muestras en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop), y se toma el volumen correspondiente a 7,5 μ g de ARN, evaporando las muestras hasta alcanzar un volumen de 5 μ L.

Acoplamiento de los fluoróforos y purificación del Cy-aRNA

Una vez purificado el aRNA, se lleva a cabo la reacción de acoplamiento con los fluoróforos Cy3 y Cy5 (“*N-hydroxyl succinimidyl dyes*”) de GE Healthcare.

En tres de las réplicas, se empleó el fluoróforo Cy3 para las muestras control y el Cy5 para las muestras tratadas. En las otras 3 réplicas se marcaron de forma contraria, para eliminar la variabilidad debida a la mayor o menor hibridación de los fluoróforos.

Para el marcaje, a los 5 μ L con 7,5 μ g de aaRNA se les añade 10 μ L de “*coupling buffer*”, y 18 μ L del fluoróforo apropiado disuelto en DMSO. El acoplamiento se lleva a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad, obteniendo el Cy-aRNA. A continuación, el aRNA acoplado al fluoróforo se purifica usando el kit “Aminoallyl MessageAmpTM II aRNA kit” de Ambion. Se añaden 10 μ L de hidroxilamina 4M al Cy-aRNA, incubando la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se agregan 60 μ L de agua libre de RNAsas y ajusta así el volumen total a 100 μ L.

A continuación se agregan 350 μ L del tampón de unión a cada muestra de aRNA, mezclando por pipeteo, y se procede tal y como se describe en el apartado anterior.

Una vez obtenidos los 100 μ L de Cy-aARN purificado, se cuantifica en el NanoDrop, y se mezclan 250p moles de cada aRNA (muestra tratada y control), marcados con diferentes fluoróforos, se concentran en la centrifuga de vacío hasta alcanzar un volumen de 5 μ L y se realiza la fragmentación.

Fragmentación del Cy-aRNA

Para llevar a cabo la fragmentación, se emplea el kit “*RNA fragmentation reagent*” (Ambion). Concretamente, se añaden a la mezcla de los 2 Cy-aRNA 2 μ L de tRNA (10mg/mL), 2 μ L de poliA (10mg/mL), y 1 μ L del tampón de fragmentación de RNA 10X de Ambion, obteniendo un volumen final de 10 μ L. La mezcla se incuba 15 minutos a 70°C, y transcurrido ese tiempo se detiene la reacción añadiendo 1 μ L del tampón de parada, manteniendo la solución en hielo hasta proceder con la hibridación.

Preparación de las micromatrices de oligos para la hibridación

Previamente a su uso, las micromatrices deben ser hidratadas empleando vapor de agua a 60°C durante 5-10 segundos, y secadas en un horno de hibridación/estufa a 65°C durante 5 segundos.

Tras dejarlas atemperar, se realiza otros dos pasos de hidratación de forma consecutiva. Tras la hidratación, se fija el ADN del que están formadas las micromatrices, exponiendo los cristales a 65mJ empleando un “*UV cross-linker*”.

A continuación, los cristales se lavan dos veces con una solución de 0,1% SDS y 4 veces con agua durante 2 minutos cada lavado. Finalmente, se introduce el cristal en etanol absoluto durante 30 segundos, y se seca por centrifugación a 2000rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente, comprobando que no hay manchas en las micromatrices.

Prehibridación e hibridación de las micromatrices de oligonucleótidos

Los cristales se prehibridan durante 30-45 minutos a 42°C con 50mL de solución de prehibridación (SSC 3X, 0,01% BSA y 0,1% SDS) en un tubo de 50mL. Transcurrido ese tiempo, los cristales se lavan a temperatura ambiente, 2 veces en agua (lavados de 2 minutos cada uno) y una vez en isopropanol (30 segundos), y se secan por centrifugación a 2000rpm durante 1 minuto, comprobando de nuevo que no hay manchas en las micromatrices. Inmediatamente después se realiza la hibridación.

La hibridación se lleva a cabo en una cámara de hibridación de micromatrices (*“ArrayIt Hybridization Cassete”*, TeleChem) tapada con una cubierta de 60x22 mm *“LifterSlip”* (Erie Scientific).

Al aRNA ya fragmentado se le añade la mezcla de hibridación, que contiene 50µL de formamida desionizada, 30µL de SSC 20X, 5µL de SDS 10% y 5µL de solución 100X *“Denhardt’s”* (BSA 20 g/L, Ficoll400 20 g/L, Polivinilpirrolidona 20 g/L); una mezcla de polímeros de elevado peso molecular capaces de saturar los lugares de hibridación inespecífica. Las micromatrices se adhieren a la cámara de hibridación con ayuda de 15µL de agua, para así evitar posibles movimientos de la micromatriz. Una vez fijadas, se aplica la mezcla de hibridación desnaturalizada previamente durante 5 minutos a 95°C. Los cristales se incuban a 42°C durante 16 horas en la cámara de hibridación.

Lavado y escaneado de las micromatrices

Una vez finalizada la hibridación, los cristales se someten a diferentes lavados. El primer lavado se realiza con SSC 1X y SDS 0,1% a 42°C (5 minutos), el segundo con SSC 0,2X y SDS 0,1% a 42°C (5 minutos), el tercero y el cuarto con SSC 0,1X a 28°C (2 minutos) y finalmente con SSC 0,01X durante 2 minutos a temperatura ambiente. Los cristales se secan por centrifugación a 2000rpm durante 1 minuto a

temperatura ambiente, comprobando que no hay manchas en las micromatrices que puedan interferir en el escaneado. En el caso de que aparezcan manchas, se realizan de nuevo varios lavados con SSC 0,01X durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Los cristales hibridados, lavados y secos, 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 5 μ m. Se ajusta manualmente la intensidad de señal, hasta que en el histograma aparezca un ratio entre las dos señales cercano a 1 (para comprobar que la señal de cada fluoróforo es la misma y no esta desplazada hacia un color). Una vez escaneado, se guarda la imagen en formato “Multi-image TIFF files.tif”.

Procesamiento de los datos con Genepix

Una vez que las imágenes son escaneadas y guardadas, comprobando que no hay errores en el escaneado, procedemos al primer procesamiento con ayuda del programa “*GenePix 4.1 microarray-analysis*” (Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA). Para ello, nos descargamos el archivo con extensión .gal de la web “ag.arizona.edu/microarray” correspondiente con nuestras micromatrices. Este archivo, permitirá la selección de todos los puntos de la matriz, modificando el tamaño de aquellos en los que sea necesario, o cancelando la señal de los que no estén bien definidos. Cuando se completa este proceso, se guarda de forma conjunta el archivo con extensión .tif y el archivo con extensión .gal, en un único archivo con extensión .gps (matriz de datos). A continuación, se procede con el análisis de la señal presente en los 29000 puntos de cada micromatriz. En primer lugar, se realiza una primera normalización de los datos, basada en que el cociente rojo/verde sea igual a 1.

Tras esta normalización, se eliminan los puntos con manchas, los puntos saturados en ambos canales (rojo, verde), o aquellos con una intensidad en alguno de los canales, menor al doble de la intensidad del fondo. Una vez finalizado, se guardan los resultados en un archivo con extensión .gpr (resultados).

Procesamiento de los datos con Accuity y análisis estadístico con SAM

Esta es la última fase del análisis de los datos obtenidos en las micromatrices, y de aquí se obtendrá un listado de genes inducidos y/o reprimidos, resultado de la

diferencia de expresión de nuestras líneas de interés y su control silvestre. Solo formaron parte de nuestro análisis estadístico 5 de las 6 micromatrices realizadas, ya que una de las replicas no alcanzó los niveles de calidad necesarios para este análisis.

Mediante el programa “*Accuity*”, se realiza una nueva normalización de los datos (método LOWESS: “*Locally Weighted Scatter plot Smoother*”). Asimismo, se eliminan aquellos puntos que no estén representados al menos en 4 de las 5 réplicas, se invierte el cociente en las 3 réplicas cuyo marcaje se realizó con los fluoróforos invertidos (es decir, se dejan todos los valores de las líneas control en las cuatro micromatrices con señal verde, y los valores de las líneas mutantes en las cuatro micromatrices con señal roja), y se seleccionan los genes diferencialmente expresados.

De aquí, surge un listado de genes con cinco valores (uno de cada micromatriz) asociados, que podemos pegar en una tabla Excel. El análisis estadístico de los datos se realiza con el test estadístico SAM (*Significant Analysis of Microarrays*) (Tusher y col., 2000), que permite determinar aquellos genes cuyo nivel de inducción o represión es estadísticamente significativo (considerando un error del 5%).

Comparación de los resultados obtenidos con respuestas transcripcionales frente a diferentes estreses

Para realizar esta comparación, se emplearon datos de micromatrices disponibles en la base de datos NASCArrays (<http://affymetris.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl>), de plantas tratadas durante tres horas bajo 38°C de temperatura (estrés térmico), con metil viológeno 10µM (estrés oxidativo) y con manitol 300mM (estrés osmótico).

En primer lugar se procede con la descarga de las tablas de datos pertenecientes a cada uno de los tratamientos, y las tablas de datos control para estos ensayos. En estos archivos aparecen múltiples experimentos, aplicando el mismo tipo de estrés, pero durante diferentes periodos de tiempo. Además, los datos reflejados en estos archivos están separados por parte aérea y raíces. En nuestro caso, escogimos para realizar el análisis los tratamientos de estrés térmico, oxidativo y osmótico, aplicados durante 3 horas. Como para cada experimento aparecen varias repeticiones técnicas, obtenemos la media para cada uno de los datos. Así, disponemos de datos de expresión para cada uno de los genes en la raíz y en la parte aérea de arabidopsis, bajo condiciones control y bajo condiciones de estrés térmico, oxidativo u osmótico a las 3

horas de tratamiento. Una vez seleccionados los datos, comparamos los valores para cada uno de los genes, calculando el cociente entre el valor durante el tratamiento, dividido por el valor en condiciones control. Se obtiene una lista de genes con valores entre 0,1 y 1000, y se seleccionan los que posean valores superiores a 2 (corresponden con genes inducidos durante el tratamiento frente a las condiciones control), y los que tengan valores inferiores a 0,5 (corresponden con genes reprimidos durante el tratamiento, comparado con las condiciones control). Finalmente, se comparan mediante diagramas de Venn, los genes inducidos mediante la expresión del gen *CtHSR1*, y los genes inducidos o reprimidos por estrés térmico, oxidativo u osmótico.

3.10.9- Diseño y obtención de las construcciones plasmídicas para experimentos de transformación de plantas y levaduras

3.10.9.1-Clonaje de la región genómica de *Candida tropicalis* en el vector binario pBIN19

Como hemos visto en apartados anteriores, la región genómica de *Candida tropicalis* responsable de la tolerancia a sal en levadura, fue aislada mediante un rastreo de una genoteca, generada en el plásmido multicopia de levadura pYEP351 (Figura 3.5). El fragmento aislado, de 5,8kb, se libera de este vector mediante restricción (Apartado 3.10.5) con las enzimas *Bam*HI (extremo 5') y *Xba*I (extremo 3'), y se purifica mediante electroforesis en gel de agarosa y rescate de la banda correspondiente (Apartado 3.10.2.1).

Al mismo tiempo, el plásmido binario pBIN19 (Figura 3.6), fue seleccionado como vector de clonación en arábidopsis, empleando los mismos sitios *Bam*HI y *Xba*I para el clonaje de la región genómica mediante ligación de extremos cohesivos (Apartado 3.10.6). Una vez obtenida la secuencia completa, se comprueba mediante secuenciación que está libre de mutaciones (Apartado 3.10.10).

3.10.9.2-Fusión del promotor del gen *CtHSR1* al gen delator de la β -glucuronidasa

Para comprobar la funcionalidad del promotor del gen *CtHSR1* en plantas, nos dispusimos a fusionar esta región reguladora al gen reportero *GUS*. Para ello, se

amplifica un fragmento de 2000 pares de bases del promotor, antes del codón de inicio, mediante PCR y polimerasas de alta fidelidad (Apartado 3.10.4), como la Phusion (Thermo Scientific; bajo las especificaciones del proveedor, evitando así la incorporación de mutaciones). A este amplicón, mediante los oligos utilizados en su amplificación, se le incorporan unos sitios de restricción *Bam*HI (en el extremo 5') y *Nco*I (en el extremo 3'), para facilitar su clonaje en el plásmido pCAMBIA1303 mediante restricción, y ligación de extremos cohesivos (Apartado 3.10.6). Una vez obtenida la secuencia completa de la fusión del promotor de 2000 pares de bases y el gen *GUS* (Figura 3.17B), se comprueba mediante secuenciación que está libre de mutaciones (Apartado 3.10.10). Por otro lado, se fusiona también a este gen delator otro fragmento mayor del promotor, esta vez de 3000 pares de bases antes del codón de inicio. Esta estrategia se realiza mediante la restricción del plásmido pBIN19 (Figura 3.17A; en el que había sido clonado previamente toda la región genómica de candida, de 5,8kb, aislada por conferir tolerancia a sal en levadura), con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Apa*I (Apartado 3.10.5). Estos sitios de restricción nos permiten cortar la construcción obtenida en el plásmido pCAMBIA1303, y sustituir en este plásmido el fragmento *Bam*HI y *Apa*I del pBIN19, obteniendo finalmente el promotor completo de 3000 pares de bases en el plásmido pCAMBIA1303 fusionado al gen delator *GUS* (Figura 3.17C).

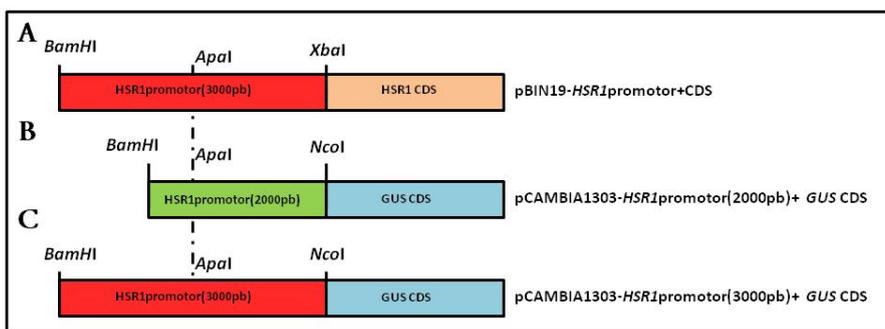


Figura 3.17. Esquema del método de clonaje de la fusión génica entre diferentes fragmentos del promotor el gen *CtHSR1* al gen delator de la β -glucuronidasa. A) Esquema del clonaje inicial en el plásmido binario pBIN19. B) Esquema del clonaje de un fragmento de 2000pb del promotor de *CtHSR1* y el gen *GUS*. C) Esquema del clonaje del promotor completo de *CtHSR1* y el gen *GUS*.

3.10.9.3-Clonaje de la secuencia codificante del gen *CtHSR1* en el vector binario pGPTVII-UBQ10

El plásmido pGPTVII-UBQ10, cedido por el Prof. J. Kudla, posee como característica principal (Figura 3.11) el promotor del gen *UBQ10*, que permite la expresión de genes a niveles inferiores que el promotor constitutivo *35S*. Para ello, amplificamos la secuencia codificante del gen *CtHSR1* de 2187 pares de bases, mediante PCR y polimerasas de alta fidelidad (Apartado 3.10.4). Este fragmento, al que le fueron incorporados a través de los oligonucleótidos los sitios de restricción *Bam*HI y *Kpn*I, fue digerido mediante estas enzimas de restricción (Apartado 3.10.5), y purificado directamente mediante precipitación con 3 volúmenes de una mezcla de etanol-acetato amónico y lavado con 1 mL de etanol al 70%. El plásmido pGPTVII-UBQ10, escogido como vector de transformación en *arabidopsis*, fue cortado con las mismas enzimas *Bam*HI (extremo 5') y *Kpn*I (extremo 3'), empleando los extremos cohesivos de ambos fragmentos para la ligación (Apartado 3.10.6). Una vez obtenida la secuencia completa del gen *CtHSR1* bajo el promotor del gen *UBQ10*, se comprobó mediante secuenciación que estaba libre de mutaciones (Apartado 3.10.10).

3.10.9.4- Sistema de clonaje Gateway

Para la obtención de algunas de las construcciones génicas empleadas en las transformaciones de *A. thaliana* y expresión transitoria en *N. benthamiana* en esta tesis doctoral, se empleó el sistema Gateway. Para ello, al igual que para otros sistemas de clonaje, es necesario disponer de la secuencia completa del cDNA del gen de interés. Esta secuencia se puede obtener del ABRC (*Arabidopsis biological Resource Center*), de clones propios almacenados en glicerinos o amplificando directamente sobre cDNA del organismo en cuestión. Así, estas secuencias se amplifican mediante PCR y polimerasas de alta fidelidad. En cualquier caso, la mezcla de reacción es similar a la descrita en el Apartado 3.10.4. A los productos de PCR se les añade 1µL (5U/µL) de Taq y 1µL de dATP (1mM), se mantienen 10 minutos a 72°C (para la incorporación de desoxiadenuinas en los extremos) y posteriormente se clonan en el plásmido pCR8⁺/GW/TOPO⁺ del kit de INVITROGEN *pCR8⁺/GW/TOPO⁺ TA Cloning Kit* (utilizando sus especificaciones pero con la mitad de volumen para cada reactivo; Ref. K2500-20). Con las reacciones del clonaje se transforman células competentes de *E.*

coli y se comprueba mediante secuenciación la orientación de los cDNAs y la ausencia de mutaciones en las secuencias (Apartado 3.10.10). Finalmente, el cDNA fue subclonado en los plásmidos pMDC32, pMDC43 y pMDC83 (Curtis y Grossniklaus, 2003) utilizando la tecnología *Gateway*, la cual está basada en los sitios de recombinación *att*, usando la enzima recombinasa del kit de INVITROGEN *Gateway*[®] *LR Clonase*[®] *II enzyme mix* (Ref. 11791-100). Los plásmidos pMDC43 y pMDC83 son portadores de la proteína de fusión GFP que se dispone en fase de lectura con el cDNA introducido. En estos plásmidos se secuenciaron las regiones de recombinación para comprobar que las pautas de lectura no hubieran cambiado.

3.10.9.5- Clonaje de la secuencia codificante del gen *CtHSR1* para el rastreo de doble híbrido en levadura

La técnica de doble híbrido (Apartado 3.12), permite la identificación de interacciones entre proteínas.

Para ello es necesario el vector pGBKT7, que contiene el gen de interés fusionado al dominio de unión al ADN del gen *GAL4*, y el plásmido pACT2, empleado en la creación de la genoteca de arabidopsis preparada en el Apartado 3.9.5, que contiene los diferentes genes objeto a rastrear fusionados al dominio de activación del gen *GAL4*. Con la construcción descrita en el apartado 3.10.9.4, en el vector pCR8⁺/GW/TOPO, incorporando la secuencia codificante del gen *CtHSR1*, procedimos con la recombinación o el subclonado del factor de transcripción en el plásmido de destino pGBKT7 (Figura 3.13), usando la enzima recombinasa del kit de INVITROGEN *Gateway*[®] *LR Clonase*[®] *II enzyme mix*.

3.10.10- Secuenciación de ADN

Los plásmidos obtenidos en la elaboración de las distintas construcciones genéticas, tanto por el sistema *Gateway* como por el sistema de digestión enzimática y posterior ligación, así como en los experimentos de rescate plasmídico y TAIL-PCR, fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Primo Yufera. El análisis de las secuencias obtenidas se realiza a través de los programas Jellyfish 3.3.1 y Chromas Lite, y de la aplicación BLAST del NCBI (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o del TAIR.

3.11- Análisis de proteínas por Western blot

El estudio de la expresión de la proteína *CtHSR1* en levadura, mediante el plasmido pGBKT7 se realiza mediante el método western blot. Este método, está basado en la capacidad de los anticuerpos para unirse selectivamente a las proteínas para los que fueron sintetizados. La separación de las proteínas se realiza en condiciones desnaturizantes, utilizando geles de poli(acrilamida) con SDS. El detergente aniónico SDS a concentraciones superiores a 0,05%, se une inespecíficamente a todas las proteínas y las desnatura. Además, la movilidad electroforética de las proteínas solo depende de su peso, y no de su composición. Esto, sumado al uso de dos geles diferentes (empaquetamiento y separación), permite que la muestra se concentre en una capa muy fina, separándose de acuerdo a su tamaño.

3.11.1- Preparación de minigeles

Para llevar a cabo la electroforesis, se preparan geles de SDS y poli(acrilamida) en dos fases. La fase inferior o fase de separación, está compuesta por Tris 375mM, 0,1% SDS pH8,8 con HCl, bis-acrilamida entre 8-12%, glicerol 10% y agua, cuya polimerización es iniciada añadiendo 4 μ L de TEMED (Sigma) y 40 μ L de persulfato amónico 10%. Rápida y se deposita la solución con ayuda de una micropipeta (1ml) entre las placas de vidrio. De igual forma, antes de que comience la polimerización de la fase inferior, se añade muy despacio la fase de empaquetamiento o fase superior, compuesta por Tris 125mM, SDS 0,1% pH6,8 con HCl, bis-acrilamida 4% y agua, iniciando su polimerización de igual forma (añadiendo 2 μ L de TEMED y 20 μ L de persulfato amónico 10%). Se añade muy cuidadosamente la fase de empaquetamiento sobre la fase de separación aun sin polimerizar, por un lateral de los cristales, hasta formar una fina y recta separación entre ambas fases. Posteriormente se coloca el peine, sacando todas las burbujas de aire presentes que podrían impedir la polimerización.

Una vez polimerizado, puede utilizarse inmediatamente, o puede almacenarse a 4°C, recubierto con plástico hermético para evitar que se seque.

3.11.2- Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es muy sencilla. El método estándar previo a la electroforesis consiste en añadir tampón de muestra 5X (SDS 7,5% p/v, ditiotretitol

0,1M, EDTA 10mM, sacarosa 30%, 0,25mg/mL azul de bromofenol y 0,3M Tris, llevado a pH6,8 con HCl), al volumen celular correspondiente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, e incubarlo a 95°C durante 5 minutos. El calentamiento desnaturaliza posibles proteasas presentes en la muestra. Una vez transcurrido ese tiempo, depositar las muestras en hielo hasta que sean cargadas en el gel.

3.11.3- Electroforesis

Se colocan los minigeles en la cubeta de electroforesis, y se rellena con tampón de electroforesis (Glicina 200mM y SDS 1% v/v a pH 8,2 con Tris).

Se retiran los peines, y con ayuda de una micropipeta, cargamos las muestras a analizar en los diferentes pocillos, utilizando como control de peso molecular el marcado *PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)*. Una vez cargadas, comienza la electroforesis a 80V hasta que las proteínas alcanzan la fase de separación, donde aumentaremos el voltaje a 120V. La duración de la electroforesis dependerá del porcentaje de bis-acrilamida, y del peso de nuestra proteína.

3.11.4- Transferencia de proteínas desde gel a membrana

Una vez completada la electroforesis, se extraen los minigeles de la cubeta de electroforesis, y con mucho cuidado, se separan de una de las placas de vidrio. Con ayuda de una espátula, cortamos la fase de empaquetamiento, dejando solo la superficie del gel correspondiente a la fase de separación. Acto seguido, se procede al montaje del casete de transferencia como indica la Figura 3.18.

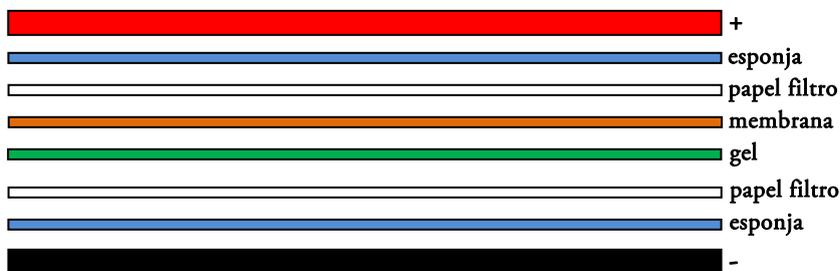


Figura 3.18. Esquema del montaje para la realización de la transferencia de proteínas a filtros de membrana.

Todos los componentes se humedecen en el tampón de transferencia (Glicina 200mM, SDS 0,2% p/v, ajustando el pH a 8,3 con Tris, y 20% metanol v/v). Se colocan desde la base negra hasta la roja (esponja, papel whatman 3mm, gel de SDS-acrilamida, membrana de nitrocelulosa o PVDF, papel whatman 3mm y esponja), y cada vez que se coloca un nuevo componente, se pasa un tubo de ensayo vacío para eliminar posibles burbujas de aire que impidan la transferencia de proteínas a la membrana. Una vez concluido el montaje del casete de transferencia, lo introducimos en la cubeta de transferencia, la llenamos hasta arriba con tampón de transferencia, y realizamos la transferencia a 110 V a 4°C. La duración de la transferencia puede variar, pero suele ser de 2 horas.

3.11.5- Tinción de proteínas transferidas a papel de membrana

Una vez realizada la transferencia, se extrae la membrana del casete y se lava con tampón TBS (NaCl 150mM, Tris-HCl 20mM, Tween 20 0,1% v/v a pH7,6) durante 5 minutos en plataforma basculante. Se elimina el tampón TBS y se agregan 15mL de solución de tinción *Direct Blue 71* (DB71 0,01% p/v, etanol 36% v/v, ácido acético glacial 9% v/v), incubando la membrana durante 5 minutos a temperatura ambiente en plataforma basculante. Se elimina el exceso de colorante sustituyendo la solución de tinción por solución de lavado (etanol 40% v/v, ácido acético glacial 10% v/v) y se escanea o se fotografía la membrana. Después, se elimina la tinción con *Direct Blue 71* agregando una solución decolorante (etanol 50% v/v, bicarbonato de sodio 150mM), incubando en plataforma basculante hasta que desaparezca la coloración azulada. Finalmente, se lava la membrana con abundante agua para eliminar posibles restos de ácido acético, y se sumerge en tampón TBS hasta la realización de la detección inmunológica.

3.11.6- Detección inmunológica de proteínas fijadas en papel de membrana

Mediante este método es posible detectar hasta 1 ng de proteína utilizando anticuerpos específicos contra la proteína, y empleando anticuerpos secundarios unidos a fosfatasa alcalina o peroxidasa. El proceso de detección comienza con el bloqueo de la capacidad de la membrana para unir proteínas inespecíficas, incubando 30-60 minutos con 20mL de TBSL (tampón TBS, leche 2% p/v). Una vez bloqueada, se realiza la hibridación del anticuerpo primario. Para ello, diluimos el anticuerpo en

TBSL en un volumen final de 10mL. Las diluciones adecuadas suelen ser entre 1/1000 y 1/10000, e incubamos en plataforma basculante, a 4°C durante 16 horas. Posteriormente se lava la membrana 3 veces (eliminando el exceso de anticuerpo primario) con TBS durante 5 minutos cada vez. Se añade el anticuerpo secundario, que se utiliza a una dilución constante de 1/5000 en tampón TBSL. Incubamos a temperatura ambiente durante 1 hora, en plataforma basculante. Finalmente, se lava la membrana 3 veces durante 5 minutos cada vez con tampón TBS, y procedemos con la detección utilizando el kit “*ECL Plus Western Blotting Detection System*” (Amersham, GE Healthcare).

Este kit está basado en la reacción de la peroxidasa presente en el anticuerpo secundario, con un sustrato luminiscente basado en luminol. La membrana se expone con una película *Hyperfilm* (Amersham) en un casete de revelado *Hypercassette* (Amersham) con pantallas intensificadoras. Las películas son reveladas con el procesador automático X-omat 2000 (Kodak).

3.12-Rastreo de doble híbrido

La técnica de doble híbrido en levadura es una técnica genética que nos permite identificar asociaciones proteicas *in vivo* (Fields y Song, 1989). En este caso, la interacción proteína-proteína, se mide mediante la reconstitución de un factor de transcripción funcional en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se utiliza la cepa AH109, en la que, en primer lugar, se introduce el plásmido pGBKT7, portador del gen de interés fusionado al dominio de unión al ADN del gen *GAL4*. Una vez confirmada la expresión de nuestro gen mediante wester blot (Apartado 3.11) en células de levadura *trp1-*, se preparan células competentes de estas células *trp1-* que expresen de forma correcta la fusión *CtHSR1-DBD GAL4* (Figura 3.13; ver Apartado 3.10.9.5). Estas células, serán transformadas con la genoteca descrita en el apartado 3.9.5, preparada en el plásmido pACT2. Para ello, a cada tubo de 50µL de células competentes, se le añade 10µL de ADN plasmídico de la genoteca (3,5µg/µL), transformándolas por el método de alta eficiencia descrito en el Apartado 3.8.2. Finalmente se cuantifica la eficiencia de transformación, seleccionando la presencia de ambos plásmidos (pGBKT7 y pACT2) en medio SD suplementado con adenina, histidina, uracilo y metionina, ya que la síntesis de leucina y triptófano se lleva a cabo mediante la presencia de los plásmidos. Por otro lado, se seleccionan las células en las

que exista interacción proteica, en medio SD suplementado con uracilo y metionina, ya que la interacción permite la síntesis de adenina e histidina.

3.13- Procedimientos utilizados para la caracterización fenotípica y fisiológica

3.13.1- Ensayos de germinación y crecimiento

El ensayo de germinación permite determinar la respuesta de cada mutante frente al agente selectivo, en los primeros estadios del desarrollo.

Para ello, se utilizan los medios descritos en el Apartado 3.3.1 suplementados con distintas sustancias, según corresponda, dependiendo de las líneas a analizar y del carácter a confirmar, valorando la capacidad de las diferentes líneas estudiadas para germinar y mostrar sus cotiledones completamente expandidos y de color verde. Para el ensayo de crecimiento, plántulas de 7 días de desarrollo son transferidas a placas cuadradas con los medios descritos en el Apartado 3.3.1 suplementados con distintas sustancias. Tras 15 ó 20 días de desarrollo, se toma el peso fresco total para cada una de las plantas, de cada uno de los genotipos analizados.

3.13.2- Determinación de la tolerancia a la sequía

Para llevar a cabo el ensayo de tolerancia a la sequía, se emplean plantas de *arabidopsis* cultivadas en invernadero durante aproximadamente 4 semanas. Una vez la roseta alcanza un estado avanzado del desarrollo, y de forma anterior o inmediatamente posterior a la floración, se someten a un último riego abundante para asegurarnos que todas las macetas se encuentran a capacidad de campo. Posteriormente, se someten a sequía o falta de riego durante aproximadamente 2 semanas. Tras el tratamiento, se corta la parte aérea de cada individuo y se toma tanto su peso fresco, como su peso seco tras 5 días en cámara a 50°C. Al mismo tiempo, otras plantas se riegan con solución nutritiva y se utilizan como controles de desarrollo sin estrés.

3.13.3- Determinación de la apertura estomática

Para realizar el ensayo de apertura estomática, se utilizan plántulas de *arabidopsis* de 7 días de desarrollo en medio de cultivo sólido. Una vez alcanzado el

tamaño adecuado, las plántulas se incuban durante 2 horas en medio líquido de apertura estomatal compuesto por KCl 10 μ M y MES-KOH pH 6,2 10 μ M, en agitación y con luz constante. Tras este periodo de tiempo, se someten a tinción con solución de yoduro de propidio 0,001% durante 5 minutos, colocando el envés de los cotiledones en contacto con la solución. El yoduro de propidio se usa en biología vegetal para teñir la pared vegetal (entre otros usos), especialmente en raíz de *arabidopsis*.

Por último, se enjuagan rápidamente en agua y se observan al microscopio confocal. Se observan las células epidérmicas del envés de los cotiledones, se fotografían zonas con abundantes estomas y se realizan mediciones del ancho y largo del ostiolo con ayuda del programa ImageJ-Fiji. Finalmente, se calcula el cociente (ancho/largo) que refleja la apertura estomatal.

3.13.4- Determinación del área y densidad estomática

Gracias a las fotografías tomadas durante el ensayo de apertura de estomas, se miden las áreas de todos los estomas presentes con ayuda del programa ImageJ-Fiji, y se cuentan todos los estomas presentes en distintas áreas de la hoja. Finalmente, se calcula el área media de los estomas y la media de los estomas presentes por cada mm² de superficie foliar, para cada una de las líneas analizadas.

3.13.5- Determinación del potencial osmótico de extracto de hoja

Para la determinación del potencial osmótico se toman hojas adultas de las plantas a analizar, y se homogeneizan con ayuda de nitrógeno líquido y un mortero. Una vez obtenido un polvo fino, se introduce en un microtubo y se guarda congelado hasta tener todas las muestras homogeneizadas. Se descongelan todas a la vez, incubándolas a temperatura ambiente durante 15 minutos, centrifugándolas después a 14000rpm durante 10 minutos. Se toman 50 μ L de muestra del extracto celular de cada tubo de 1,5mL y se depositan en tubos de 700 μ L, aptos para las lecturas de la concentración de osmolitos en el osmómetro Osmomat 030 (Gonotec GMBH).

3.13.6- Determinación del contenido hídrico relativo

El contenido hídrico relativo se define como la cantidad de agua de un tejido, en relación a la que podría tener en hidratación completa. Se calcula mediante la fórmula CHR: $P_{\text{fresco}} - P_{\text{seco}} / P_{\text{total}} - P_{\text{seco}} \times 100$, donde el P_{total} , es el peso de la

muestra al 100% hidratada. La hidratación al 100% se consigue dejando las plantas con el envés de las hojas en contacto con agua MilliQ durante 16 horas en oscuridad, y tomando el peso eliminando el exceso de agua en la superficie.

3.13.7- Determinación de cationes

Para la determinación de cationes, se emplean extractos celulares de hojas de arabidopsis, descritos en el Apartado 3.13.5. Para ello, se toman 6 μ L del extracto celular, y se diluyen con agua MilliQ hasta alcanzar un volumen de 12mL. La medición se realiza mediante un espectrofotómetro de absorción atómica SensAA (GBC Scientific Equipment DUAL), por espectrometría de emisión según protocolo del fabricante. El valor obtenido del espectrofotómetro, se multiplica por el volumen total de la muestra preparada, y se divide por los μ L totales de extracto celular empleado en la determinación, obteniendo un valor de μ g/ μ L de muestra. Finalmente, se calcula la concentración molar de dicho catión en cada una de las muestras analizadas.

3.13.8- Determinación de la concentración de prolina mediante un método colorimétrico

Este método se basa en la reacción del aminoácido prolina con un agente altamente reactivo llamado ninhidrina (Bates y col., 1973). La reacción ocurre en dos pasos: durante la primera reacción, se consumen dos equivalentes de ninhidrina por cada prolina. En el primer paso de la reacción el aminoácido se oxida, descarboxilándose y liberando amoníaco, mientras que el equivalente de ninhidrina con el que ha reaccionado, se reduce a hidrindantina (Figura 3.19).

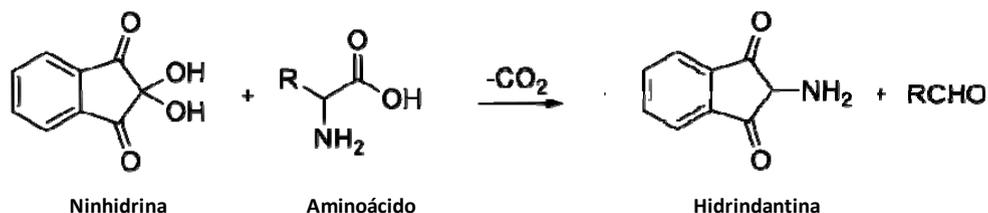


Figura 3.19. Diagrama de la primera reacción que tiene lugar durante la determinación de la concentración de prolina mediante el método colorimétrico (Adaptado de http://es.wikipedia.org/wiki/Ninhidrina#mediaviewer/File:Ninhydrin_Reaction_Mechanism.svg).

En el segundo paso la hidrindantina formada y el otro equivalente de ninhidrina, reaccionan con el amoniaco, formando un complejo de color púrpura (Púrpura de Ruhemann; Figura 3.20).



Figura 3.20. Diagrama de la segunda reacción que tiene lugar durante la determinación de la concentración de prolina mediante el método colorimétrico (Adaptado de http://es.wikipedia.org/wiki/Ninhidrina#mediaviewer/File:Ninhydrin_Reaction_Mechanism.svg).

Este análisis comienza con la toma de muestras de las plantas a analizar, dejándolas secar en estufa a 60°C durante 72 horas. Una vez secas, se tritura la muestra con ayuda de un mortero hasta obtener un fino polvo. Una alícuota de la muestra triturada se pesa y se introduce en un microtubo (entre 5-10mg; es necesario conocer la cantidad exacta) y se le añade 1mL de ácido sulfosalicílico (3%) incubándolo a temperatura ambiente con agitación durante 5 minutos. Posteriormente se centrifuga cada muestra a 14000rpm durante 5 minutos. Rescatamos 700µL de la solución de sulfosalicílico y preparamos la curva patrón, tomando 700µL de ácido sulfosalicílico y añadiéndole diferentes cantidades de una solución de prolina a concentración 1µg/µL (1, 5, 15, 20 y 30µL), en microtubos de 2mL.

A partir de este momento, procedemos de igual forma con todos los tubos, añadiendo a cada uno de ellos 600µL de ácido acético glacial y 700µL de reactivo ninhidrina (20mL ácido fosfórico 6M, 30mL ácido acético glacial y 1,25g de ninhidrina). Se agita vigorosamente y se incuban a 100°C durante 1 hora. La reacción, se detiene sumergiendo los tubos en hielo, y midiendo finalmente en espectrofotómetro DINKO SP8001 (uv/vis) a una longitud de onda de 520 nanómetros.

3.13.9- Determinación de parámetros fotosintéticos mediante equipo portátil de medición

Para esta determinación se emplean plantas de arábidopsis de aproximadamente 40 días de desarrollo tras la germinación, en condiciones de día corto en invernadero (8 horas de luz – 16 horas de oscuridad).

Las condiciones de día corto en arábidopsis se hacen necesarias, ya que se necesita una mínima superficie foliar para realizar las mediciones, y el día corto hace que las plantas de arábidopsis no florezcan y produzcan muchas hojas de gran tamaño. Los parámetros fotosintéticos como la tasa de transpiración (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), la conductividad estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), la eficiencia del fotosistema 2 (PhiPSII), y la fijación de CO_2 (A_n , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), se miden con el equipo LI6400 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA), en condiciones de elevada intensidad lumínica ($1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y 400 ppm de CO_2 .

3.13.10- Determinación de azúcares solubles

Para la determinación de azúcares solubles se emplean hojas provenientes de plantas con 30 días de desarrollo, cultivadas en las condiciones descritas en el Apartado 3.4.4. Las muestras se homogeneizan con ayuda de nitrógeno líquido y un mortero. Una vez obtenido un polvo fino, se introduce en un microtubo y se guarda congelado hasta tener todas las muestras homogeneizadas. Se descongelan todas a la vez, incubándolas a temperatura ambiente durante 15 minutos, centrifugándolas después a 14000rpm durante 10 minutos, tomándose 10 μL de muestra del extracto celular obtenido.

Esta determinación se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) utilizando una bomba Waters 515 hplc, con la columna de exclusión iónica ICsep TCE-ION 300 (Transgenomic, Inc, Omaha, Nebraska) y el detector de índice de refracción Waters 2414 (Milford, Massachusetts). La fase móvil empleada en la determinación de azúcares solubles fue ácido sulfúrico 5 mM, con un flujo constante de 0,3 ml/min a temperatura ambiente. Los resultados fueron analizados mediante el software Breeze Waters HPLC, mediante comparación con los resultados obtenidos con soluciones estándar de glucosa, fructosa y sacarosa.

3.13.11- Cuantificación de ácido indolacético, ácido abscísico y ácido jasmónico

La cuantificación de ácido indolacético, ácido abscísico y ácido jasmónico fue realizada por el servicio de cuantificación de hormonas del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas). Para ello, se emplean hojas provenientes de plantas con 30 días de desarrollo, cultivadas en las condiciones descritas en el Apartado 3.4.4. Las muestras se homogeneizan con ayuda de nitrógeno líquido y un mortero, y una vez obtenido un polvo fino, se introducen 100mg en un microtubo y se entregan congeladas a -80°C al servicio de análisis de hormonas del IBMCP. Cada muestra analizada de 100mg (mezcla de hojas de 5 plantas diferentes) se diluye en una solución compuesta por metanol 80% y ácido acético 10%, agitándola durante 1 hora a 4°C . El extracto se incuba durante 16 horas a -20°C , y posteriormente se centrifuga y se seca mediante una centrifuga de vacío. El residuo obtenido de esta extracción, se diluye en ácido acético 1% y se pasa por una columna Oasis HLB (Seo y col., 2011). Para la cuantificación de IAA, ABA y JA este eluido secado al vacío se disuelve en una solución compuesta por acetonitrilo 5% y ácido acético 1%, analizándolo posteriormente por ultra-cromatografía en fase reversa mediante una columna AccuCore RP-MS (ThermoFisher Scientific) en gradiente de $400\ \mu\text{L}/\text{min}$ de una solución compuesta por acetonitrilo de 5 al 50% y ácido acético al 0,05%, durante 14 minutos. Las hormonas finalmente se cuantifican por espectrometría de masas Q-Exactive (ThermoFisher Scientific) mediante monitoreo de ion seleccionado (SIM, del inglés *Selected Ion Monitoring*), utilizando curvas de calibración y el software Xcalibur 2.2 SP1 build 48 y TraceFinder. Los estándares internos empleados fueron hormonas marcadas con deuterio para el IAA y ABA, y el ácido (dihidro)jasmónico para el JA.

3.14- Técnicas Histológicas

3.14.1- Inclusión de muestras en parafina

Para realizar cortes histológicos de diferentes tejidos de arabisopsis, se emplea la técnica de inclusión en parafina. Las muestras, se prefijan en acetona fría al 90% a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se lavan durante 5 minutos con agua, y acto seguido se procede a la tinción histoquímica con X-Gluc (Apartado 3.16.1), incubando la reacción a 37°C de 4-16 horas. Después, se realizan lavados de 30

minutos en concentraciones crecientes de etanol (20, 35 y 50%), fijando por último la muestra en FAE (etanol 50%, ácido acético glacial 10% y formaldehído 5%) durante 1 hora, y dejándola después en etanol 70% hasta la inclusión en parafina. El siguiente paso consiste en introducir la muestra en el procesador automático de tejidos Leica TP 1020, en el que se realizan los siguientes tratamientos: EtOH 70%, EtOH 90%, EtOH 90%, EtOH 95 + eosina (0,1%), EtOH 95%, EtOH 100%, y dos lavados de Histoclear. Todos estos tratamientos se realizan durante 1 hora cada uno. Se realiza el último lavado con Histoclear durante 75 minutos, se sumerge en parafina durante 1 hora aplicando vacío, y posteriormente se repite el tratamiento con parafina durante 3 horas aplicando vacío. Tras el tratamiento en el procesador de tejidos, las muestras se dejan sumergidas en parafina líquida a 60°C hasta su inclusión. Finalmente, las muestras se colocan en la orientación y posición deseadas en moldes de aluminio con parafina líquida (en la estación de inclusión Leica EG1150H), colocando encima un soporte de plástico y dejando solidificar el montaje a 4°C.

3.14.2- Obtención de cortes histológicos

Para la obtención de cortes histológicos se utiliza un micrótopo HM330. Las muestras incluidas en parafina se reducen para limitar la superficie a cortar, eliminando zonas de parafina sin muestra. Los cortes se realizan a 7 µm de grosor con cuchillas Accu-Edge (Bakura) y se extienden en un baño de agua destilada a 42°C. Las muestras extendidas se colocan en portaobjetos recubiertos de polilisina y se dejan secar toda la noche. Finalmente, se desparafinan con Histoclear (National Diagnostics), se realizan lavados seriados de 10 minutos en concentraciones decrecientes de etanol (100, 90 y 70%) y agua, se secan en placa calefactora (Selecta, Plactronic y Multiplaces; Reichert-Jung, HK 120), y se observan al microscopio óptico mediante montaje con glicerol 20%.

3.15- Técnicas de imagen

3.15.1- Fotografía a bajo aumento

Antes de realizar experimentos de microscopía, se toman fotografías mediante lupa binocular de fluorescencia Leica MacroFluo MZZ16F, con cámara digital Leica DFC300 FX equipada de sistema de filtros para GFP2, DSR y Violet, lupa binocular

(Nikon SMZ800) con cámara digital refrigerada Color View 12 equipada de sistema de fluorescencia para detectar la GFP (filtros EX 480/40 BA 510 y EX 480/40 BA 535/50), y una lupa binocular Olympus SZ60-PT provista de una unidad de iluminación externa de luz blanca fría (Zeiss KL1500; Schott KL 1500 LCD), solo para muestras en campo claro.

3.15.2- Microscopía óptica

Tanto los cortes histológicos como las muestras montadas en portaobjetos se observan y fotografían mediante un microscopio Nikon Eclipse E-600 (equipado de sistema de epi-fluorescencia con filtros para visualizar FITC, Rodamina, calcofluor, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y plata, sistema de contraste interferencial y campo oscuro), acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon Digital-Sight (DS-Ri1) y un ordenador con el software de análisis de imagen NIS-Elements F3.0.

3.15.2.1- Microscopía de campo brillante

En este tipo de microscopía el material se observa sin coloración añadida. En iluminación de campo claro, la luz pasa directamente a través de la muestra, apreciándose los detalles celulares. En iluminación de campo oscuro, se emplea una luz muy intensa en forma cónica concentrada sobre la muestra. El campo de visión del objetivo se encuentra en la zona hueca del cono de luz, y solo se recoge la luz que refleja el material observado. Por ello, las células claras aparecen como fondo oscuro, y las zonas coloreadas a observar aparecen de forma brillante sobre el fondo.

3.15.2.2- Nomarski, microscopía diferencial de contraste de interferencia

Este tipo de microscopía consiste en proyectar dos rayos de luz polarizada sobre la muestra, y se obtienen las imágenes combinadas. Es un tipo de microscopía muy utilizado en los tratamientos de fertilización *in vitro* actuales, y se trata de una herramienta muy útil para muestras de elevado grosor, ya que permite obtener imágenes de elevada resolución y contraste, tanto de detalles superficiales como de estructuras internas.

3.15.2.3- Microscopía de fluorescencia

Esta microscopía se emplea principalmente para definir un tejido o compartimento celular concreto. Para ello, se emplean diferentes sustancias fluorescentes como yoduro de propidio o DAPI, aplicadas de forma exógena al material objeto de estudio, o mediante proteínas fluorescentes expresadas en el interior celular, como la GFP. El agente fluorescente es estimulado por un haz de luz, emitiendo parte de la energía absorbida como señales luminosas (Tabla 3.2). El microscopio incorpora una lámpara especial, que actúa emitiendo una luz excitadora de los fluorocromos, y que posee además un filtro especial que permite el paso de la luz emitida por el fluorocromo.

Tabla 3.2. Longitudes de onda de excitación y emisión (nm) para diferentes moléculas empleadas en este trabajo.

	Excitación	Emisión
Proteína verde fluorescente (GFP)	488	500-520
Clorofila	488	660-690
4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	358	461
Yoduro de propidio	535	617

3.15.3- Microscopía confocal

Un microscopio confocal es un microscopio capaz de obtener imágenes tridimensionales de la célula. Se basa en un principio similar al de un microscopio de fluorescencia, pero se utilizan dos diafragmas confocales (uno antes de la muestra y otro después) capaces de enfocar la iluminación en un único punto de la muestra. Se utiliza un láser como fuente luminosa, y con él se va barriendo la muestra por todo su volumen, plano a plano, creando muchas imágenes bidimensionales que un ordenador interpreta. En este tipo de microscopía se emplea un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Alemania). Se trata de un microscopio DMIR2 invertido, y una unidad espectral confocal SL con dos detectores

de fluorescencia simultáneos y 4 líneas de láser (458nm, 488nm, 514nm y 534nm). También se emplea un microscopio confocal LSM 780 (Zeiss) con 7 líneas de láser (405nm, 458nm, 488nm, 514nm, 561nm, 594nm y 633nm).

3.16- Ensayos de expresión del gen reportero *GUS*

3.16.1- Análisis cualitativo de actividad β -glucuronidasa mediante ensayo GUS

El ensayo GUS se basa en la tinción histoquímica de tejidos mediante X-Gluc (Sigma Aldrich). Esta técnica se emplea tanto para experimentos de expresión transitoria como para la localización de aquellos tejidos en los que un determinado promotor génico se está expresando. El gen reportero *GUS* codifica para la proteína β -glucuronidasa, enzima capaz de hidrolizar el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónico (X-Gluc), liberando el grupo β -D-glucurónico y dejando como producto de reacción el 5-bromo-4-cloro-3-indolil, producto insoluble y de color azul, apareciendo en los tejidos en los que se encuentre. Para ello, es necesario una solución de ferrocianuro de potasio 0,5mM, ferricianuro de potasio 0,5mM, tampón fosfato sódico 100mM pH 7, Triton X100 0,1%, X-Gluc 2mM. Esta mezcla o cada solución de forma individual se almacena en oscuridad y frío (4 y -20°C). La muestra se introduce en un volumen determinado de dicha solución (dependiendo del volumen de la muestra) y se incuba a 37°C de 5-15 horas. Una vez teñida la muestra, se fotografía con una lupa binocular de fluorescencia Leica MacroFluo MZZ16F o microscopio Nikon Eclipse E-600.

3.16.2- Análisis cuantitativo de actividad β -glucuronidasa mediante ensayo MUG

El ensayo MUG se basa en la emisión de fluorescencia y su detección a través de un espectrómetro de luminiscencia. Al igual que en el ensayo GUS, se emplea el gen reportero *uidA* que codifica para la proteína β -glucuronidasa, enzima capaz de hidrolizar el ácido 4-metilumbeliferil β -D-glucurónico (MUG), liberando el grupo β -D-glucurónico y dejando como producto de reacción el 4-metilumbeliferona (MU), producto que cuando se excita a una longitud de onda de 365nm, emite fluorescencia

a una longitud de onda de 445nm, permaneciendo la señal estable hasta 12 horas a pH10,32.

3.16.2.1- Extracción de proteínas

Se toman 25 plántulas de 7 días de desarrollo, y se homogeneizan con ayuda de mortero y nitrógeno líquido. Se añaden 250µL de tampón QB compuesto por KPO_4 pH7,8 100mM, EDTA 1mM, Triton X100 1%, Glicerol 10% y DTT 1mM. Se centrifuga la mezcla a 14000rpm durante 15 minutos a 4°C, y el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se guarda en congelador a -80°C hasta su uso.

3.16.2.2- Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en forma catiónica de color anaranjado (absorción a 465nm), y en solución alcalina, en forma neutra de color azulado (absorción 595nm). A pH ácido, la unión de proteínas al colorante también produce una coloración azulada (Bradford, 1976).

Se toman entre 3 y 5µL de la muestra a analizar. Se agregan 150µL de solución de reacción (0,01% Coomassie Blue G-250, 5% etanol, 10% ácido fosfórico 1,5M). También se prepara una curva patrón con concentraciones crecientes de una solución proteica conocida (IgG – beta-gamma globulina, 1µg/µL). Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y medir en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nanómetros. Se realizan 3 repeticiones técnicas de cada muestra.

3.16.2.3- Hidrólisis de MUG

Se toman 5µL del extracto proteico, se añaden a 100µL de tampón de reacción compuesto por tampón QB, DTT 2mM y MUG 0,35mg/mL, y se incuba la mezcla a 37°C durante 15 minutos. Para detener la hidrólisis del sustrato MUG por la enzima β-glucuronidasa, se añaden 2mL de tampón de parada (Na_2CO_3 0,2M a pH 10,32) a cada muestra.

3.16.2.4- Cuantificación de la actividad

Para detectar la señal fluorescente del MU producido, se utiliza un espectrómetro de luminiscencia LS 50B (Perkin Elmer). Se realiza una curva patrón a

partir de diluciones seriadas de una solución $1\mu\text{M}$ de MU, creando una curva que nos permite relacionar la señal luminiscente con la concentración de producto de reacción. La reacción de hidrólisis es lineal, por lo que con un solo tiempo de reacción podemos conocer la actividad de la muestra.

Para calcular la actividad en pmolMU/minutos por cada μg de muestra, al valor obtenido del fluorímetro, tras interpolar con la recta patrón, se le multiplica por el volumen total de muestra, se divide por los minutos de reacción y por los microgramos de proteína que hayamos usado en la determinación.

3.17- Análisis estadísticos

3.17.1- Determinación estadística mediante la prueba “t” de Student

Para determinar si hay diferencias significativas en los diferentes ensayos realizados, entre las líneas control (ecotipos silvestres) y los mutantes o líneas transgénicas utilizadas en esta tesis doctoral, se llevan a cabo pruebas estadísticas *t* de Student de dos colas para datos independientes, dado que en cada experimento se comparan únicamente dos grupos, averiguando así si existen o no diferencias significativas entre las medias de los dos grupos a comparar con un determinado nivel de significación.

3.17.2- Determinación estadística del número de inserciones de T-DNA

Aunque como hemos visto, todas las colecciones empleadas en este trabajo se distribuyen como generaciones T_4 , cabe la posibilidad de que alguno de los mutantes seleccionados presente cierto grado de heterocigosis, o simplemente no presente inserción de T-DNA. También las líneas transgénicas generadas en este trabajo, son seleccionadas hasta alcanzar una población T_3 homocigota. Para comprobar si realmente los individuos seleccionados son 100% resistentes, y poder asumir que son homocigotos para el T-DNA introducido, se siembran un total de 100/200 semillas por mutante en medio sólido MS pH5,7 suplementado con BASTA, kanamicina, o el agente de selección que corresponda, dependiendo de la colección analizada.

De esta forma, se observa el porcentaje de germinación de cada uno de los mutantes en medio selectivo y se obtiene el grado de heterocigosis en cada caso. La proporción entre las plantas que heredan o no la tolerancia a BASTA/kanamicina, se compara con la proporción esperada, mediante una prueba de chi-cuadrado aplicando

la corrección de Yates (Zar, 1996). Esta prueba postula una hipótesis nula, que relaciona la frecuencia observada de los datos analizados, con la frecuencia esperada. Si ambas frecuencias coinciden, el estadístico tomara un valor igual a 0. Si por el contrario difieren, tomara un valor grande y no se aceptara la hipótesis nula. Como nivel de significación crítico se utilizó la convención estadística de 0,05 de probabilidad.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo un estudio de genética directa realizando un rastreo en colecciones de mutantes, con el objetivo de identificar mutantes de *arabidopsis* tolerantes a NE durante la germinación. Por otro lado, también se ha realizado un estudio de genética reversa mediante expresión heteróloga, en el que se ha medido la tolerancia al estrés abiótico en plantas transgénicas de *arabidopsis* que expresan un factor de transcripción del hongo *C. tropicalis*. La combinación de ambos abordajes permitió aprovechar los tiempos de espera para el crecimiento de las plantas y para los experimentos de tolerancia a estreses.

4.1- GENÉTICA DIRECTA

4.1.1- Condiciones del rastreo

Se han rastreado unas 109972 líneas mutantes (unas 700000 semillas) pertenecientes a las colecciones descritas en el Apartado 3.1. Dado que se han empleado diferentes colecciones de mutantes obtenidas mediante la transformación de distintos fondos genéticos, se llevaron a cabo ensayos previos de germinación en distintas concentraciones de NE para identificar en cada caso la concentración óptima de este policatión para el rastreo primario (Tabla 4.1.1; Figura 4.1.1).

Tabla 4.1.1. Colecciones, número de líneas y concentración óptima de norespermidina empleados en el rastreo primario de mutantes.

Colección de mutantes (población S_0)	Nº de líneas	Concentración [mM]
C. Somerville y W. Scheible	63000	6,0
S. Yokoi, H. Koiwa y R. Bressan	4000	4,5
D. Weigel	22672	4,5
INRA-Versailles	9800	5,0
K. Feldmann	10500	4,5

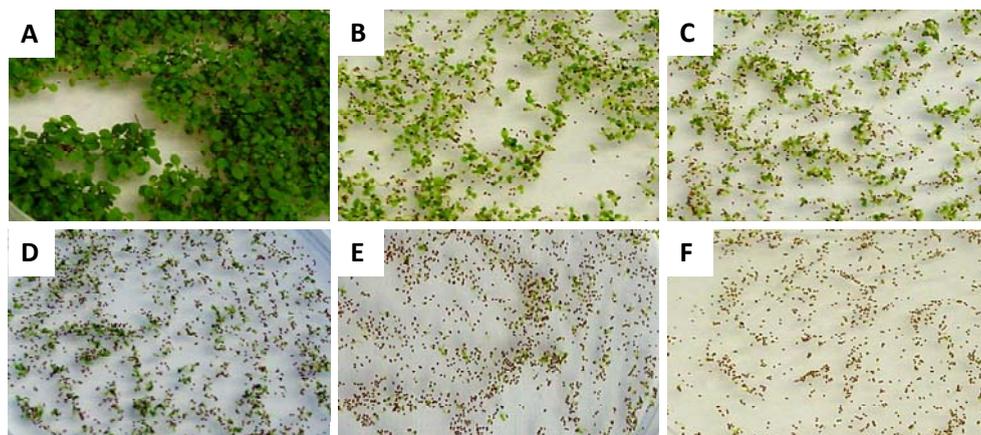


Figura 4.1.1. Germinación en medio MS tras 7 días de cultivo, en placas suplementado con O (A), 3,5 (B), 4 (C), 4,5 (D), 5 (E) y 6 (F) mM de noespermidina para la colección del Dr. Chris Somerville y el Dr. Wolf Scheible.

4.1.2- Rastreo primario para el aislamiento de mutantes tolerantes a NE

La búsqueda de mutantes se llevo a cabo tal y como se describe en el Apartado 3.4.6. En primer lugar, se realizó un rastreo primario en el que se identifican los posibles mutantes tolerantes a NE, y posteriormente, un rastreo secundario, con el que se confirma la tolerancia de las líneas candidatas analizando su descendencia. Tras el rastreo primario, se seleccionan los mutantes que presentan cotiledones abiertos y verdes tras los primeros 5-12 días de desarrollo en medio de cultivo suplementado con NE (Figura 4.1.2).

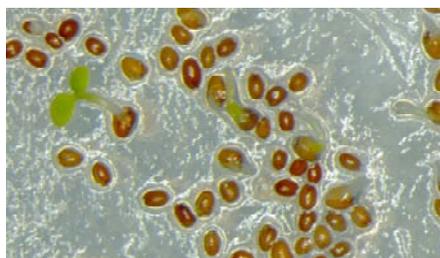


Figura 4.1.2. Mutante putativo aislado en el rastreo primario a los 6 días de cultivo en medio MS suplementado con 6mM de NE para la colección de C. Somerville y W. Scheible.

La colección que más mutantes permitió aislar en el rastreo primario fue la generada por el Dr. Weigel con un total de 183 individuos. Por el contrario, fue la colección de los Drs. S. Yokoi, H. Koiwa y R. Bressan la que mostró un número menor de mutantes tolerantes a NE con 36 candidatos, aunque, observando el porcentaje de líneas aisladas sobre el total de líneas empleadas en el rastreo, fue esta

misma colección la que produjo un mayor porcentaje de mutantes aislados respecto al total de líneas utilizadas en el rastreo (0,90%). Por otro lado, la colección de Somerville y Scheible fue la que permitió el aislamiento de un número menor de mutantes (0,27%), quizás provocado por la elevada concentración de NE empleada, comparado con el resto de colecciones (Tabla 4.1.1 y Tabla 4.1.2). No obstante, debe tenerse en cuenta que una gran proporción de mutantes putativos no confirman su fenotipo en la siguiente generación, ya que las condiciones de selección permiten el escape de una cierta proporción de plantas no mutantes que germinan y forman cotiledones verdes.

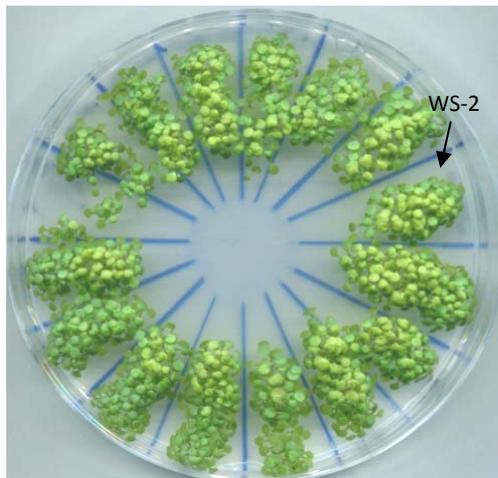
Tabla 4.1.2. Mutantes putativos (población S_1) identificados en el rastreo primario de tolerancia a noespermidina. Se muestra entre paréntesis el porcentaje de individuos seleccionados, respecto del total de líneas empleadas.

Colección de mutantes (población S_0)	Mutantes putativos
C. Somerville y W. Scheible	167 (0,27%)
S. Yokoi, H. Koiwa y R. Bressan	36 (0,90%)
D. Weigel	183 (0,80%)
INRA-Versailles	78 (0,79%)
K. Feldmann	75 (0,71%)

4.1.3- Rastreo secundario para la confirmación de mutantes tolerantes a NE

Todos los posibles candidatos seleccionados en el rastreo primario, se transplantaron a tierra para obtener su descendencia (población S_2), sobre la que se llevó a cabo el rastreo secundario tal y como se describe en el Apartado 3.4.6. Además, se comprobó para cada una de ellos la germinación en condiciones normales, resultando esta cercana al 100% para todos los mutantes seleccionados (Figura 4.1.3).

Figura 4.1.3. Germinación en medio de cultivo MS de distintas líneas mutantes de la colección de K. Feldmann y su control silvestre (WS-2).



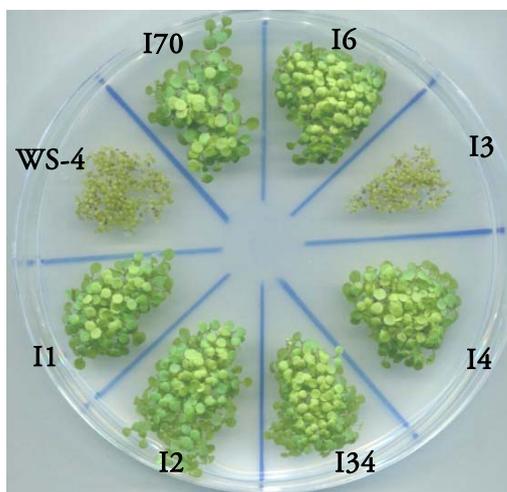
4.1.4- Tolerancia a BASTA/kanamicina

El objetivo final de esta investigación es obtener líneas tolerantes a NE pero este carácter debe ir acompañado de la tolerancia al agente de selección, proporcionado por el T-DNA para luego permitir el aislamiento del gen responsable del fenotipo. Se puede anticipar que en las colecciones de mutantes obtenidos por transformación genética con T-DNA habrá mutantes, espontáneos o inducidos por la transformación, no marcados por dicho T-DNA. (Figura 4.1.4; Tabla 4.1.3).

A pesar de que las colecciones empleadas se distribuyen como líneas T_4 homocigotas, mediante este análisis pudimos comprobar que muchas de las líneas seleccionadas en el rastreo primario eran 100% sensibles al agente de selección, lo que provocó la pérdida por descarte de un gran número de líneas.

En la Figura 4.1.4 podemos observar la germinación en BASTA de distintas líneas mutantes tolerantes a norespermidina seleccionadas de la colección INRA-Versailles. Las líneas I1, I2, I34, I4, I6, I170 son tolerantes a BASTA pero la línea I3 es sensible al igual que su control silvestre WS-4.

Figura 4.1.4. Germinación en medio de cultivo MS suplementado con el herbicida BASTA, de distintas líneas mutantes de la colección de INRA-Versailles tolerantes a NE (I1, I2, I34, I4, I3, I6, I170) y su control silvestre (WS-4).



En la Tabla 4.1.3 se muestran los mutantes seleccionados (S_2) tolerantes a BASTA/Kanamicina (posiblemente marcados por el gen de resistencia) para cada una de las colecciones empleadas. Como podemos observar, en las colecciones de Somerville y Feldmann encontramos los mayores índices de sensibilidad, ya de 167 y 75 mutantes seleccionados en el rastreo primario, solo 65 y 32 mostraron tolerancia a BASTA o Kanamicina, respectivamente.

Tabla 4.1.3. Mutantes putativos marcados (población S_2) identificados en el rastreo secundario de tolerancia a BASTA/Kanamicina.

Colección de mutantes (población S_0)	Mutantes putativos (población S_1)	Mutantes putativos posiblemente marcados (población S_2)
C. Somerville y W. Scheible	167	65
S. Yokoi, H. Koiwa y R. Bressan	36	25
D. Weigel	183	118
INRA-Versailles	78	46
K. Feldmann	75	32

4.1.5- Determinación del nivel de heterocigosis en los mutantes seleccionados

También se analizó el nivel de heterocigosis para las líneas seleccionadas en el apartado anterior. Mediante este análisis, confirmamos la presencia del T-DNA en los individuos que serán trasplantados a maceta para la realización de los posteriores análisis de cosegregación.

Para ello se obtuvo el cociente de plántulas tolerantes frente a sensibles tras germinar en BASTA o Kanamicina las semillas S_2 obtenidas de los mutantes S_1 seleccionados para cada colección y se clasificó en los grupos 1:0 (tolerancia monogénica en homocigosis), 3:1 (tolerancia monogénica en heterocigosis), 15:1 (tolerancia digénica en heterocigosis) y otros según el método de análisis de chi-cuadrado (Apartado 3.17.2).

Tal como se indica en la Figura 4.1.5, con la excepción de las líneas de la colección de Bressan, el 60-80 % de las líneas de mutantes seleccionadas por tolerancia a norespermidina presentan una relación de tolerancia a BASTA/kanamicina del 100%, propia de una línea homocigota.

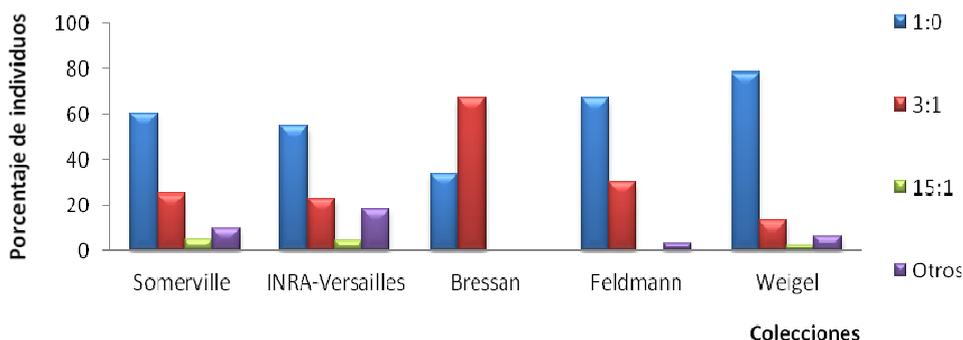


Figura 4.1.5. Relación de tolerancia a BASTA/kanamicina, en las líneas mutantes seleccionadas para cada colección de mutantes.

Además, también existen un 10-20% de líneas que presentan una relación de tolerancia 3:1, que indica que tienen una inserción del T-DNA, pero no son homocigotas. En menor número se encuentran otras relaciones.

En el caso de la colección de Bressan, observamos que a diferencia del resto, la mayoría de las líneas seleccionadas muestran una relación 3:1, por lo que dominan en este caso las líneas heterocigotas (Figura 4.1.5).

4.1.6- Tolerancia a noespermidina

La población de semillas S_2 de los mutantes aislados en el rastreo primario se sometió a ensayos de germinación en medio con noespermidina para confirmar el fenotipo de tolerancia (Figura 4.1.6). En este caso, se emplearon concentraciones de NE menores que para el rastreo primario, debido al menor número de semillas sembradas y dependiendo también de la colección rastreada en cada caso.

En esta ocasión, se analizaron solamente aquellas líneas que presentaron tolerancia a BASTA/Kanamicina en homocigosis, ya que este carácter es necesario para los posteriores análisis de cosegregación.

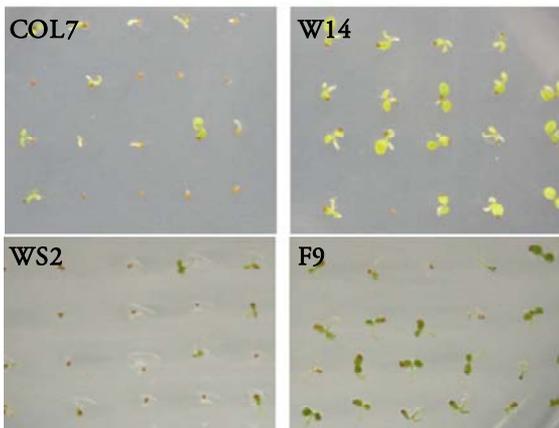


Figura 4.1.6. Germinación en medio MS suplementado con 4 mM de NE a los 7 días tras la siembra, de dos mutantes tolerantes a noespermidina (NE) y sus controles, para la colección de Weigel (Mutante W14 y su control silvestre COL-7) y para la colección de Feldmann (Mutante F9 y su control silvestre WS-2).

Como observamos en la Figura 4.1.7, donde se representa la germinación obtenida para la colección de Somerville, el mutante S47 presenta una germinación tras 5 días de cultivo del 60% aproximadamente, frente al 10% de su control silvestre COL-2, mientras que los mutantes S5 y S161 germinaron de forma similar al control. Así, podemos adelantar que los mutantes S3, S47, S72 y S164 podrían ser los mejores candidatos para posteriores análisis genéticos y de cosegregación.

En cuanto a los mutantes seleccionados para la colección de Feldmann, observamos en la Figura 4.1.8 algunos con niveles de germinación de más de 2 veces la

de su control silvestre WS-2, tras 7 días de cultivo. En este caso, los mutante F5, F8, F9, F12, F16, F18, F47, F58 y F68 destacan sobre el resto por presentar una germinación cercana o superior al 60%, frente a la del 30% que muestra su control silvestre WS-2.

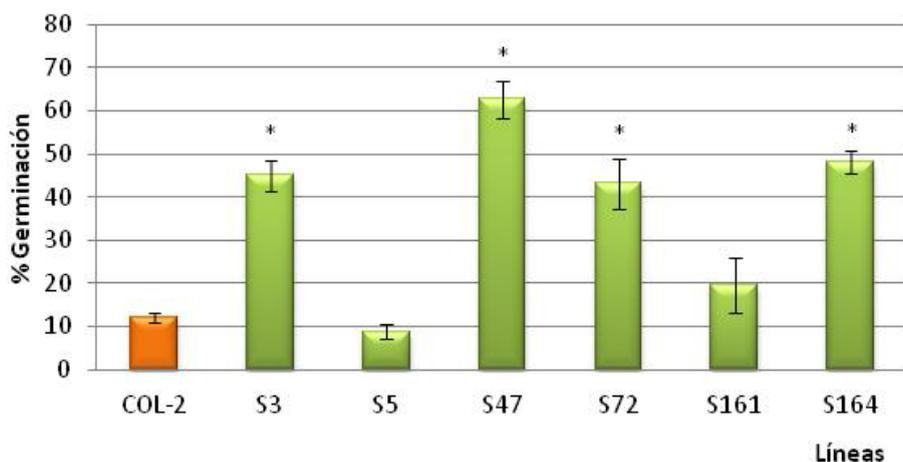


Figura 4.1.7. Porcentaje de germinación en medio MS suplementado con noespermidina (4 mM) de las líneas mutantes seleccionadas para la colección de Somerville, y su control silvestre (COL-2), tras 5 días de cultivo. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

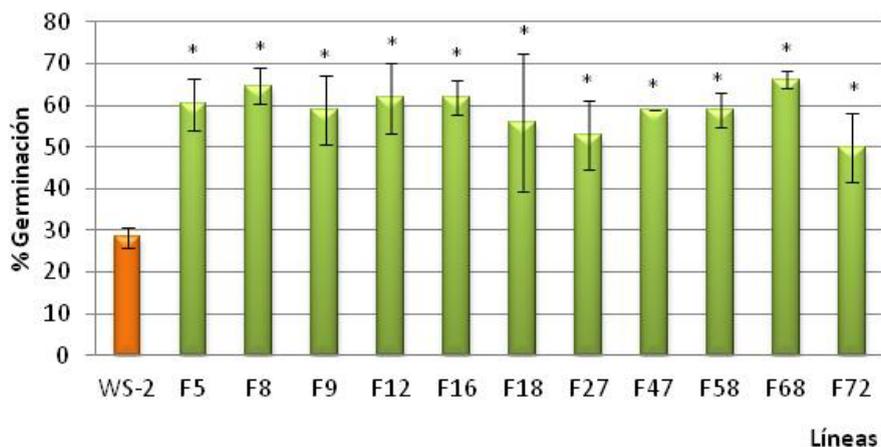


Figura 4.1.8. Porcentaje de germinación en medio MS suplementado con noespermidina (4 mM) de las líneas mutantes seleccionadas para la colección de Feldmann, y su control silvestre (WS-2), tras 7 días de cultivo. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

En el caso de la colección de INRA-Versailles, se han seleccionado un total de 10 mutantes, los cuales han presentado una germinación de 2,5 a 3 veces la de su control silvestre WS-4, tras 7 días de cultivo. Como observamos en la Figura 4.1.9, son los mutantes I1, I2, I4, I6, I39, I42, I45 e I49 los mutantes que presentan mayor porcentaje de germinación, con cifras superiores al 70%.

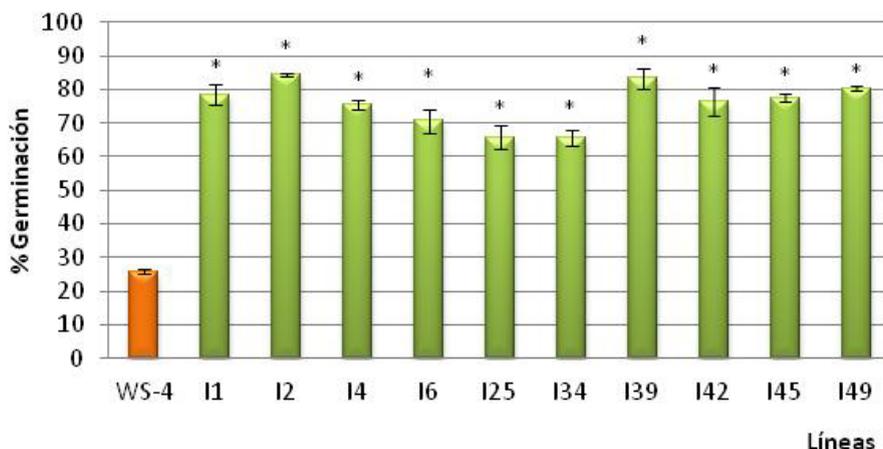


Figura 4.1.9. Porcentaje de germinación en medio MS suplementado con noespermidina (4 mM) de las líneas mutantes seleccionadas para la colección de INRA-Versailles, y su control silvestre (WS-4), tras 7 días de cultivo. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Por último, en la Figura 4.1.10 se presentan los resultados de los mutantes seleccionados en el rastreo para la colección de Weigel. En este caso los porcentajes de germinación de algunas líneas mutantes, alcanzan hasta 3 veces el valor de su control silvestre. En este sentido, podemos destacar los mutantes W95 y W159, los cuales presentan un porcentaje de germinación superior al 50%, tras 8 días de cultivo.

Hay que señalar que para la colección de Bressan todos los mutantes seleccionados no presentaron unos valores de germinación superiores a los de su control silvestre COL-7 (datos no mostrados). Las líneas de mutantes analizadas en el rastreo primario para esta colección fueron de 4000, muy inferiores al resto de colecciones.

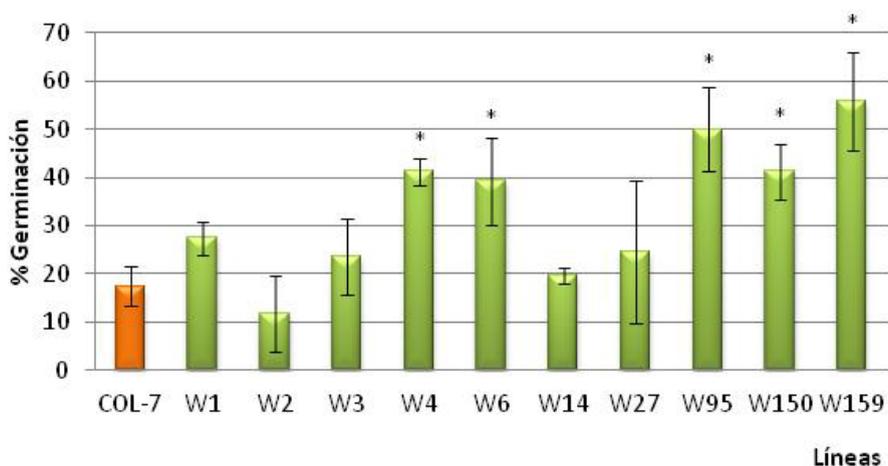


Figura 4.1.10. Porcentaje de germinación en medio MS suplementado con noespermidina (4 mM) de las líneas mutantes seleccionadas para la colección de Weigel, y su control silvestre (COL-7), tras 8 días de cultivo. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

4.1.7- Mutantes confirmados

Una vez confirmados los fenotipos de tolerancia a NE y BASTA/Kanamicina, el número de mutantes seleccionados para cada una de las colecciones rastreadas se muestran en la Tabla 4.1.4.

Tabla 4.1.4. Número de mutantes confirmados (población S₂) en el rastreo secundario de tolerancia a NE y a BASTA/Kanamicina.

Colección	Nº de mutantes tolerantes a NE y Kanamicina	Nº de mutantes tolerantes a NE y BASTA
C. Somerville y W. Scheible	-	4
S. Yokoi, H. Koiwa y R. Bressan	-	0
D. Weigel	-	5
INRA-Versailles	-	10
K. Feldmann	11	-

4.1.8- Confirmación de la presencia de T-DNA en los mutantes y determinación del número de inserciones

Para comprobar el número de inserciones del T-DNA en el genoma de los mutantes aislados durante el rastreo se realizaron análisis “Southern blot” con sondas específicas para el T-DNA. Para la colección de Somerville y Scheible, se realizó la digestión del ADN genómico con la enzima de restricción *Bam*HI. Para la hibridación, se utilizó una sonda que hibrida en el activador transcripcional *35S* (Figura 4.1.11A) y otra sonda que hibrida con el gen de resistencia *BAR* (4.1.11B).

El resultado del Southern blot que se muestra en la Figura 4.1.11A (Sonda *35S*), indica que el mutante número S71 no posee ninguna inserción de T-DNA. Los mutantes 3, 164, 161 y 5 poseen todos una banda de aproximadamente 3 Kb. En el Southern que muestra la Figura 4.1.11B (Sonda *BAR*), la banda o inserción común desaparece, indicando que se trata de una banda específica en la hibridación con la sonda *35S*.

Podemos observar en este análisis que muchos de los mutantes analizados poseen más de una inserción, a excepción de los mutantes 47, 71, 72, 164 y 5 (Figura 4.1.11).

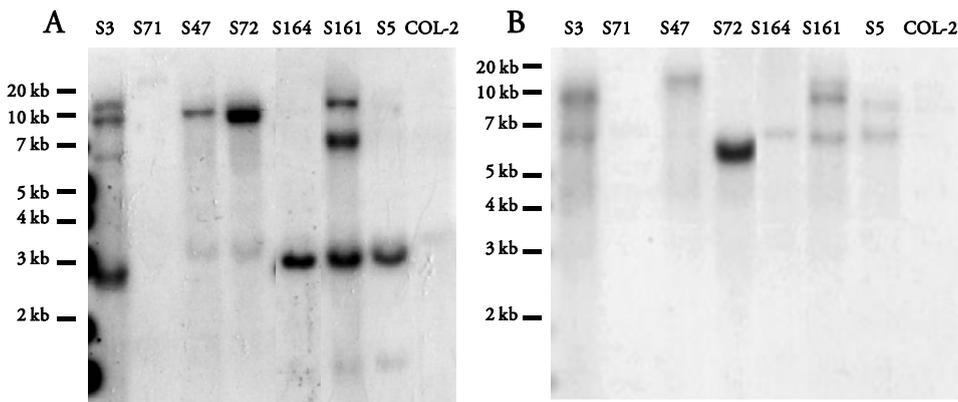


Figura 4.1.11. A) Análisis Southern blot de los candidatos seleccionados para la colección de C. Somerville y W. Scheible, empleando la sonda *35S*. B) Análisis Southern blot de los candidatos seleccionados para la colección de C. Somerville y W. Scheible, empleando la sonda *BAR*. COL-2: Control silvestre.

En cuanto al Southern blot realizado mediante digestión con la enzima *EcoRI* para los mutantes seleccionados de la colección INRA-Versailles, que se muestra en la Figura 4.1.12 (Sonda GUS), podemos observar que no aparecen bandas comunes. Según este resultado, podemos ver que los mutantes que muestran una única inserción son el 1, 4, 42 y 45, los mutantes número 34 y 6 muestran dos inserciones cada uno, y la línea mutante 25 parece tener 3 inserciones del T-DNA en su genoma. En cuanto a los mutantes 2 y 49, no podemos concluir el número de inserciones que poseen, ya que no existe una banda clara en el Southern blot.

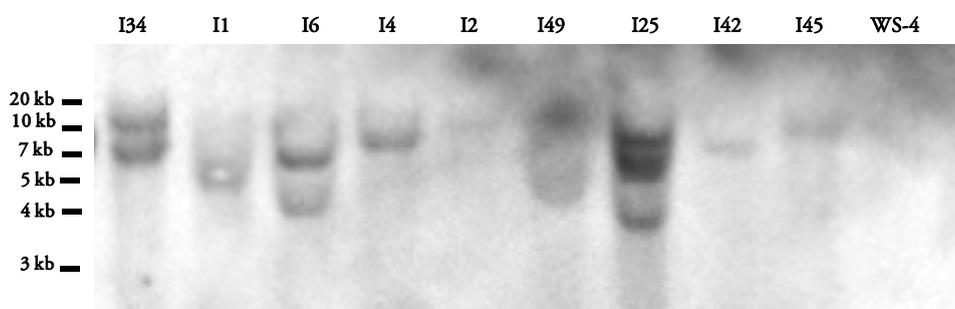


Figura 4.1.12. Análisis Southern blot de los candidatos seleccionados para la colección de INRA-Versailles, empleando la sonda GUS. WS-4: Control silvestre.

Para el análisis mediante Southern blot de los mutantes seleccionados para la colección de Feldmann se utilizó la enzima de restricción *EcoRI* para cortar el genoma y una sonda que hibrida en el terminador NOS del gen de la nopalina sintetasa. En la Figura 4.1.13 podemos observar que muchas de las líneas mutantes analizadas poseen una sola inserción, como es el caso de la línea 5, 9, 12, 15 y 27. El mutante 47 es posible que tenga varias inserciones del T-DNA, mientras que el mutante 68 claramente posee 2 inserciones del mismo. En el resto de líneas (8, 16, 18 y 72), no disponemos de información para saber cuántas inserciones poseen.

Por último, analizamos también mediante Southern blot las líneas seleccionadas para la colección de Weigel. Como se observa en la Figura 4.1.14, la hibridación de la sonda BAR con la membrana no ha producido una buena señal y hay hibridación inespecífica en la línea control COL-7.

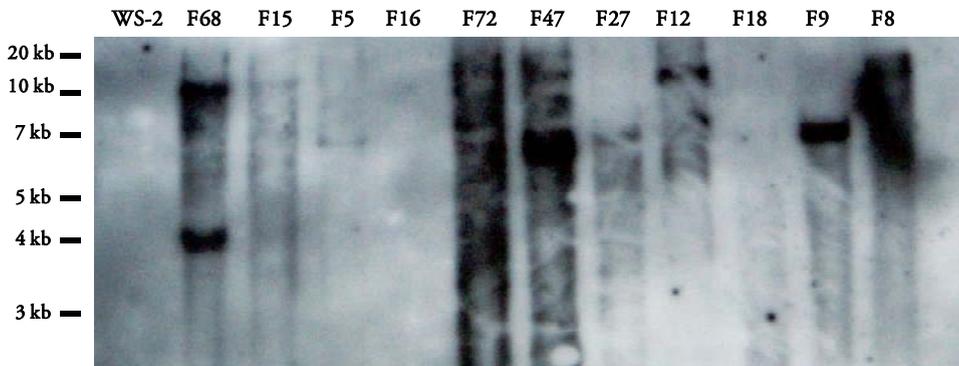


Figura 4.1.13. Análisis Southern blot de los candidatos seleccionados para la colección de Feldmann, empleando la sonda NOS. WS-2: Control silvestre.

Es posible que la digestión con *Bam*HI o que la transferencia al filtro de membrana no fuera completa. Podemos destacar los mutantes número 6, 27 y 150, que poseen una sola inserción, mientras que los mutantes 1, 2 y 95 aparecen con múltiples inserciones. También podemos observar la aparición en el control silvestre COL-7 y en algunos de los mutantes analizados, de bandas inespecíficas de aproximadamente 4 y 5,5 kb.

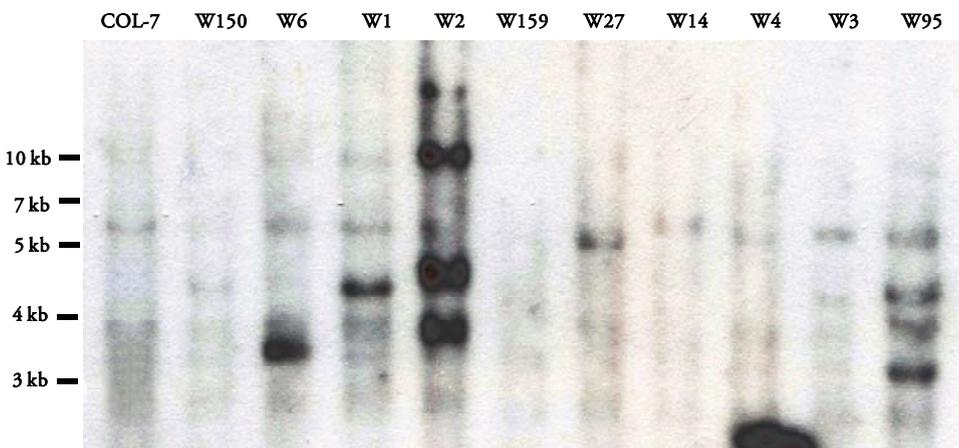


Figura 4.1.14. Análisis Southern blot de los candidatos seleccionados para la colección de Weigel, empleando la sonda BAR. COL-7: Control silvestre.

Como hemos observado en la Figura 4.1.11, varias de las líneas analizadas mediante Southern blot para la colección de Somerville, mostraban una banda aproximada de 3 kb. Dado que el método de integración del T-DNA se realiza al azar, es extraño que muchas de las líneas seleccionadas presenten la misma banda.

Para intentar explicar la banda repetitiva obtenida en los mutantes de la colección de C. Somerville y W. Scheible, se estudiaron las diferentes posibilidades de integración del T-DNA del plásmido pSKI15, utilizando como sonda el activador transcripcional 35S. En caso de que existieran repeticiones en tandem en la inserción del T-DNA (Figura 4.1.15A), estas podrían situarse de forma variable. Si se integran dos fragmentos de T-DNA en sentido contrario “tipo 1” (Figura 4.1.15C), al digerir con *Bam*HI se liberaría siempre un fragmento de tamaño aproximado a 3 kb, que podría explicar la presencia de esta banda repetitiva en numerosas líneas mutantes.

Por otro lado, si las inserciones en tandem se realizan en el mismo sentido (Figura 4.1.15D), la digestión mediante la endonucleasa de restricción *Bam*HI produciría fragmentos de aproximadamente 6,7 kb, equivalentes al tamaño del T-DNA completo. Este patrón podría explicar las bandas repetitivas que aparecen en los mutantes 3, y 161, de aproximadamente 7 kb.

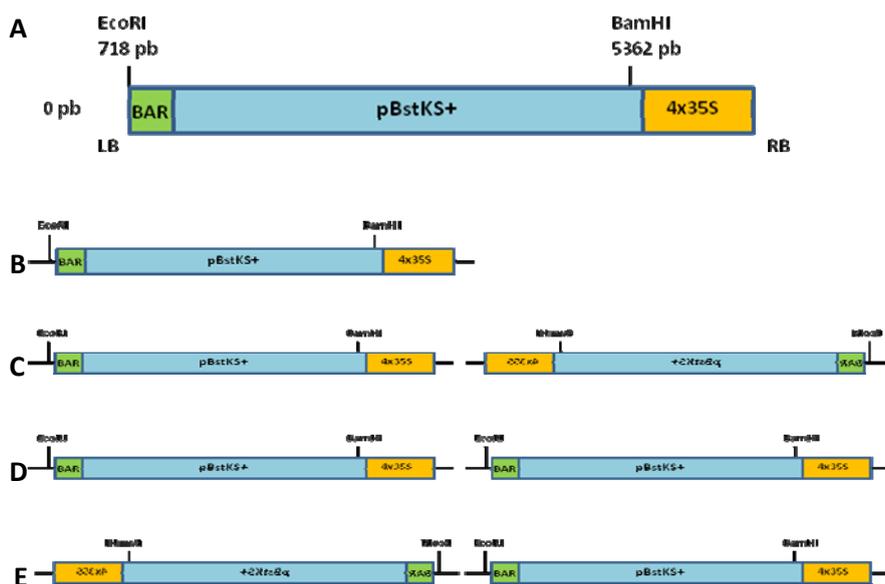


Figura 4.1.15. Diferentes posibilidades para la inserción del T-DNA en la colección de Weigel, Somerville y Scheible (A) en el genoma. B) una sola inserción; C) dos inserciones en sentido opuesto “tipo 1”; D) dos inserciones en el mismo sentido; y E) dos inserciones en sentido opuesto “tipo 2”.

Otra posible explicación para la presencia de bandas comunes entre las líneas analizadas, es que procedan de una misma línea transgénica inicial. Si tras realizar el rescate plasmídico viéramos que en los mutantes seleccionados existe la misma

inserción (al observar la misma secuencia genómica flanqueante), esta mutación podría ser responsable de la tolerancia a este polication.

De esta forma, hemos conseguido aislar 30 mutantes tolerantes a noresperdina que nos permitirán identificar nuevos genes reguladores de la tolerancia al estrés abiótico en *arabidopsis*. Para ello, será necesaria la realización de los correspondientes ensayos de cosegregación para confirmar que el carácter de tolerancia observado está ligado a la inserción del T-DNA. Una vez confirmado, mediante experimentos de rescate plasmídico y TAIL-PCR, identificaremos la zona de inserción del T-DNA comprobando así cuantos genes pueden estar afectados en cada caso. Para cada uno de los genes, serán necesarios experimentos de qRT-PCR para evaluar sus niveles de expresión, y para aquellos en los que la expresión haya sido modificada por la inserción, se realizará la recapitulación del fenotipo. De este modo, seremos capaces de confirmar cuales son los genes y proteínas involucradas en la tolerancia a cationes tóxicos en *arabidopsis*.

4.2- EXPRESIÓN DE *CtHSR1* EN ARABIDOPSIS

En esta segunda parte de la tesis se ha realizado un estudio de genética reversa en sistema heterólogo utilizando el gen *CtHSR1* de *Candida tropicalis* para evaluar el efecto de este factor de transcripción en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Este gen fue aislado en un rastreo para la identificación de genes de halotolerancia en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Ali y col., 2001), a partir de una genoteca de la cepa NCYC2512 de *Candida tropicalis* (Rodríguez y col., 1996).

4.2.1-Análisis bioinformático del factor de transcripción *CtHSR1* de *Candida tropicalis*

Antes de comenzar con esta línea de investigación, necesitábamos conocer la estructura del factor *CtHSR1* con el que vamos a trabajar, ya que nos proporcionará información acerca de los posibles cambios que su expresión produzca en arabisidopsis. Para ello, mediante aplicaciones informáticas de predicción de dominios proteicos, como la pagina web <http://pfam.xfam.org>, pudimos comprobar que la proteína de 728 aminoácidos codificada por el gen *CtHSR1*, posee un solo dominio HSF (del inglés, *Heat Shock Factor*; Figura 4.2.1), descrito en el artículo publicado por Ali y colaboradores (2001).

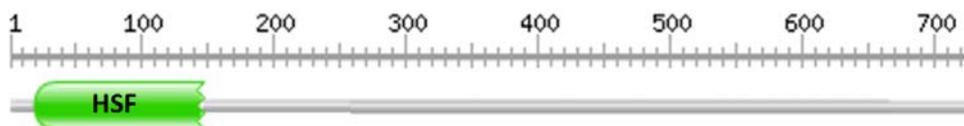


Figura 4.2.1. Estructura de la proteína codificada por el gen *HSR1* de *Candida tropicalis*, según la base de datos de Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), formada solamente por un dominio HSF. En la parte superior se muestran el tamaño de la proteína en aminoácidos.

Como hemos visto en la Introducción, el dominio HSF es un dominio de unión a ADN, y reconoce elementos en los promotores del tipo HSE (del inglés, *Heat Shock Elements*), que son secuencias palindrómicas compuestas por el triplete GAA/TTC repetido 3 veces con espaciamiento de dos nucleótidos (5'-GAAnnTTCnnGAA, donde "n" es cualquier nucleótido).

Utilizando el programa de alineamientos múltiples CLUSTALw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), comparamos las secuencias proteicas de múltiples factores de transcripción HSF de arabisidopsis, el factor de transcripción HSF1 de levadura y el *CtHSR1*. Como se puede observar en la Figura 4.2.2, el factor

de transcripción de candida, posee un dominio de unión al ADN similar al del resto de factores de transcripción HSF.

Tal y como se comentado anteriormente, estas proteínas de respuesta a choque térmico, poseen un dominio de trimerización. Este dominio, se caracteriza por poseer 3 heptarrepeticiones de leucinas (LX₆LX₆L; Figura 4.2.3), que les permiten formar trímeros aumentando así su afinidad con la secuencia diana, reconociendo los elementos de unión de respuesta a estrés térmico de tres en tres. Por el contrario, la proteína CtHSR1 carece de este dominio de trimerización, como podemos ver en la Figura 4.2.3, por lo que podemos deducir que necesitará de alguna otra proteína de unión al ADN para hacer efectiva la activación de la transcripción.

Por otro lado, realizamos una búsqueda *in silico* mediante BLAST de proteínas con elevada homología al dominio de unión al ADN del factor CtHSR1, y así poder identificar en arabidopsis genes funcionalmente homólogos al factor de transcripción CtHSR1. Para ello, delimitamos este dominio de unión a ADN en el factor de transcripción de candida (como la región comprendida entre el aminoácido 17 y el 156), y con la secuencia proteica realizamos un análisis BLASTp contra la base de datos del TAIR. Como observamos en la Tabla 4.2.1, obtuvimos una lista genes con elevada homología con el dominio de unión a ADN del factor CtHSR1, entre los que se encuentran principalmente los factores de transcripción inducibles por choque térmico en arabidopsis.

Los HSFs, además del dominio de unión al ADN, poseen un dominio de trimerización propio de los factores de transcripción inducibles por choque térmico, pero, sorprendentemente, aparecieron dos genes (At4g18870 y At4g19630) de tamaño reducido, con elevada homología con el dominio de unión al ADN del factor de transcripción CtHSR1, pero que al igual que el factor de transcripción de candida, no poseen dominio de oligomerización. Por lo tanto, identificamos estas dos proteínas como posibles candidatas ortólogas a la proteína CtHSR1 en arabidopsis.

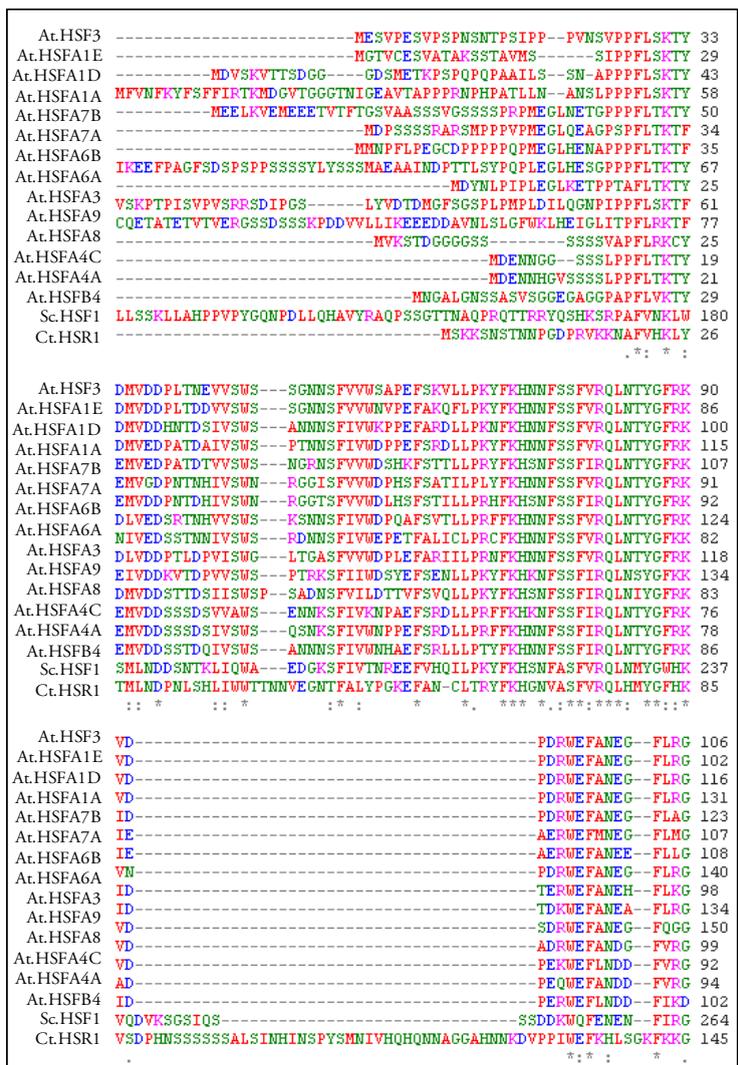


Figura 4.2.2. Alineamiento múltiple del dominio de unión a ADN (DBD) de los factores de transcripción inducibles por choque térmico en arabisopsis con las proteínas HSF1 de levadura y CtHSR1 de *Candida tropicalis*. Los colores indican las propiedades fisicoquímicas de las proteínas; el rojo, verde y azul corresponden a residuos hidrofóbicos, hidrofílicos y polares con carga, respectivamente. El asterisco (*) indica si hay alineamiento correcto entre los residuos, los dos puntos (:) indican residuos superpuestos con propiedades estructurales y fisicoquímicas similares, el punto (.) indica que no hay superposición entre todas las proteínas alineadas y la línea (-) indica que en esa posición no existen aminoácidos para ser alineados.

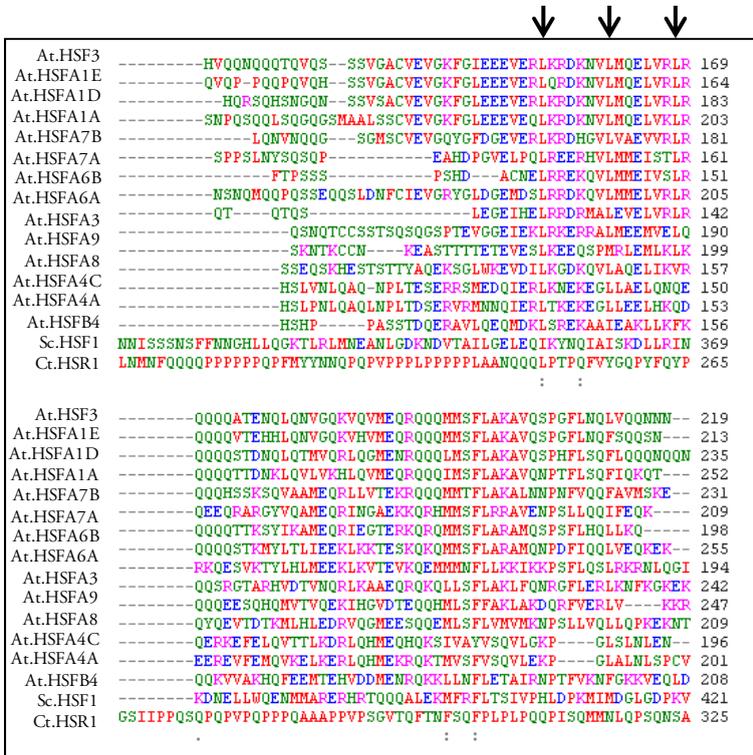


Figura 4.2.3. Alineamiento múltiple de los factores de transcripción inducibles por choque térmico en arábidopsis, con el factor HSF1 de levadura y el CtHSR1 de *Candida tropicalis*, mostrando la región perteneciente al dominio de trimerización. Los colores indican las propiedades fisicoquímicas de las proteínas; el rojo, verde y azul corresponden a residuos hidrofóbicos, hidrofílicos y polares con carga, respectivamente. El asterisco (*) indica si hay alineamiento correcto entre los residuos, los dos puntos (:) indican residuos superpuestos con propiedades estructurales y fisicoquímicas similares, el punto (.) indica que no hay superposición entre todas las proteínas alineadas y la línea (-) indica que en esa posición no existen aminoácidos para ser alineados.

El gen At4g18870 que codifica una proteína de 219 aminoácidos, posee dos dominios de unión a ADN, clasificados según el TAIR de tipos HSF o de tipos “doble hélice alada” (del inglés *Winged Helix-turn-Helix*; en adelante wHTH). Este dominio wHTH está formado por dos pequeñas laminas beta (P1, P2), tres hélices alfa (A1, A2, A3) y tres laminas beta (B1, B2, B3), en el siguiente orden A1-B1-A2-A3-B2-P1-B3-P2, y es propio de proteínas represoras de la transcripción. El gen At4g19630, codifica

una proteína de 131 aminoácidos con un solo dominio de unión a ADN, clasificado también según el TAIR como dominio HSF o dominio wHTH.

Tabla 4.2.1. Resultado de la búsqueda en la base de datos del TAIR, de proteínas con homología de secuencia al DBD del HSR1 mediante Blastp.

Secuencias	bits	p-valor
AT5G16820.1 HSF3, HSFA1B, ATHSFA1B, ATHSF3 hea...	62	7e-11
AT4G11660.1 AT-HSFB2B, HSFB2B winged-helix DNA...	62	8e-11
AT3G02990.1 ATHSFA1E, HSFA1E heat shock transc...	60	3e-10
AT4G17750.1 HSF1, HSFA1A, ATHSF1, ATHSFA1A hea...	58	1e-09
AT1G32330.1 ATHSFA1D, HSFA1D heat shock transc...	58	1e-09
AT3G51910.1 AT-HSFA7A, HSFA7A heat shock transc...	58	1e-09
AT1G46264.1 AT-HSFB4, HSFB4, SCZ heat shock tr...	58	1e-09
AT4G13980.1 AT-HSFA5, HSFA5 winged-helix DNA-b...	58	1e-09
AT2G26150.1 ATHSFA2, HSFA2 heat shock transcri...	57	3e-09
AT5G43840.1 AT-HSFA6A, HSFA6A heat shock transc...	56	4e-09
AT3G63350.1 AT-HSFA7B, HSFA7B winged-helix DNA...	56	4e-09
AT4G36990.1 HSF4, HSFB1, AT-HSFB1, ATHSF4 heat...	56	4e-09
AT3G22830.1 AT-HSFA6B, HSFA6B heat shock transc...	56	6e-09
AT3G24520.1 AT-HSFC1, HSFC1 heat shock transcr...	55	1e-08
AT5G03720.1 AT-HSFA3, HSFA3 heat shock transcr...	54	3e-08
AT5G62020.1 AT-HSFB2A, HSFB2A heat shock transc...	53	3e-08
AT1G67970.1 AT-HSFA8, HSFA8 heat shock transcr...	53	4e-08
AT2G41690.1 AT-HSFB3, HSFB3 heat shock transcr...	51	1e-07
AT5G54070.1 AT-HSFA9, HSFA9 heat shock transcr...	50	4e-07
AT5G45710.1 AT-HSFA4C, RHA1, HSFA4C winged-hel...	48	1e-06
AT4G18880.1 AT-HSFA4A, HSF A4A heat shock tran...	40	2e-04
AT4G18870.1 E2F/DP family winged-helix DNA-bi...	37	0.003
AT4G19630.1 winged-helix DNA-binding transcri...	30	0.26

Para estudiar la posible implicación de estos genes sobre la tolerancia al estrés abiótico en arábidopsis, se solicitaron mutantes SALK de pérdida de función (SALK_070620 para el gen At4g19630 y SALK_035324 para el gen At4g18870), y se realizaron análisis de germinación en presencia de NaCl y manitol. Mediante estos ensayos observamos que el mutante para el gen At4g18870 presenta tolerancia respecto al control, tanto en la germinación en presencia de NaCl como de manitol, mientras que el mutante para el gen At4g19630 presenta una germinación similar al control silvestre en ambas condiciones. Además, se realizaron mediciones de diferentes parámetros fotosintéticos y se observó que los mutantes de pérdida de función del gen At4g18870 poseen una menor conductividad estomática y una menor tasa de transpiración que su control silvestre (Anexo 2 y 3). Por lo tanto, aunque es necesaria

una caracterización más profunda de estos mutantes para poder obtener una conclusión clara, podemos sugerir el gen At4g18870 como posible candidato ortólogo en arábidopsis al gen *CtHSRI*.

4.2.2- Caracterización cualitativa de la funcionalidad del promotor de *CtHSRI* en arábidopsis

En el rastreo realizado por Ali y colaboradores (2001) la región genómica aislada poseía solo una única pauta abierta de lectura de 2187 pares de bases, que codificaba una proteína de 728 aminoácidos, y una región genómica en el extremo 5' de 3003 pares de bases y otra en el extremo 3' de 635 pares de bases (Figura 4.2.4).

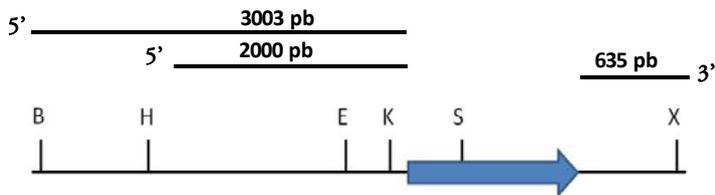


Figura 4.2.4. Región genómica de 5,8 kb, aislada en un rastreo de una genoteca para la identificación de genes de halotolerancia (modificado de Ali y col., 2001).

Aunque esta región reguladora presente en el extremo 5' de la secuencia codificante es la responsable de la expresión del gen *CtHSRI*, desconocíamos su funcionalidad en arábidopsis. Aunque la región aislada tenía un tamaño de 3 kb, quisimos saber si la funcionalidad dependía de esta región al completo, o si por el contrario, un fragmento de menor tamaño era igualmente funcional y capaz de desencadenar una respuesta óptima frente a diferentes tipos de estreses. Además, también estábamos interesados en conocer cuál era el tejido vegetal en el que se estaba expresando el gen. Para ello, expresamos el gen reportero *GUS* bajo dos fragmentos diferentes de esta región reguladora, uno de 3000 pares de bases y otro de 2000 (Figura 4.2.4), tal y como se describe en el Apartado 3.10.9.2.

Para este experimento se obtuvieron plantas transgénicas de arábidopsis mediante inmersión floral (Apartado 3.4.5), se seleccionaron 5 líneas homocigotas T₃ de una inserción para cada construcción, y se realizó un análisis cualitativo de la expresión del gen reportero *GUS* en estas líneas seleccionadas.

Para ello, se tomaron plántulas de 7 días de desarrollo, y se sometieron a tinción GUS según se describe en el Apartado 3.16.1. Como se observa en la Figura 4.2.5, tanto la región reguladora de 2000 pares de bases como la de 3000, fueron capaces de expresar el gen reportero *GUS* en arábidopsis. Esta expresión, de forma generalizada, se sitúa en tejido vascular, tanto en la raíz, como en el hipocotilo y en los cotiledones.

También se estudió la expresión del gen reportero en otros estadios de desarrollo, ya que queríamos confirmar la funcionalidad del promotor en estadios avanzados del desarrollo, y en diferentes órganos vegetales. De este modo, se analizaron semillas, plántulas con 2 días después de la germinación, tejidos de planta adulta, e incluso órganos florales (Figura 4.2.6).

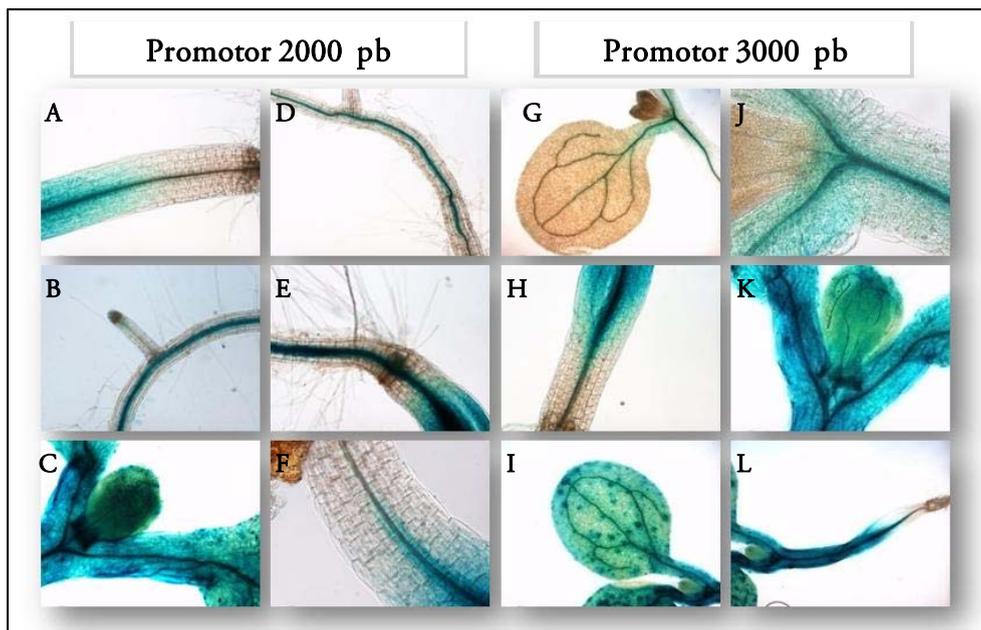


Figura 4.2.5. Análisis cualitativo de la expresión del gen *GUS*, bajo diferentes fragmentos reguladores de 2000 (A-F) y 3000 (G-L) pares de bases, del promotor del gen *CtHSR1* tras 7 días de desarrollo. A, E, F, H, J y L son hipocotilos; B y D muestran raíces; C, G, I y K muestran cotiledones.

En todos los casos, la expresión del gen *GUS* se sitúa nuevamente en tejido vascular, tal y como se observa claramente en las fotografías de estambres y pétalos realizadas con el microscopio. Por otro lado, no se aprecia coloración azul en las

puntas de las raíces, ya que estas células aún no se han diferenciado en células del tejido vascular (Figura 4.2.6).

Utilizando microscopía Nomarsky, pudimos reconocer el tipo de tejido en el que situaba la señal del gen reportero. Como observamos en la Figura 4.2.7A, en la sección transversal de la raíz de arábidopsis, se pueden distinguir el eje formado por las células que forman el xilema en sentido perpendicular al eje formado por las células que forman el floema.

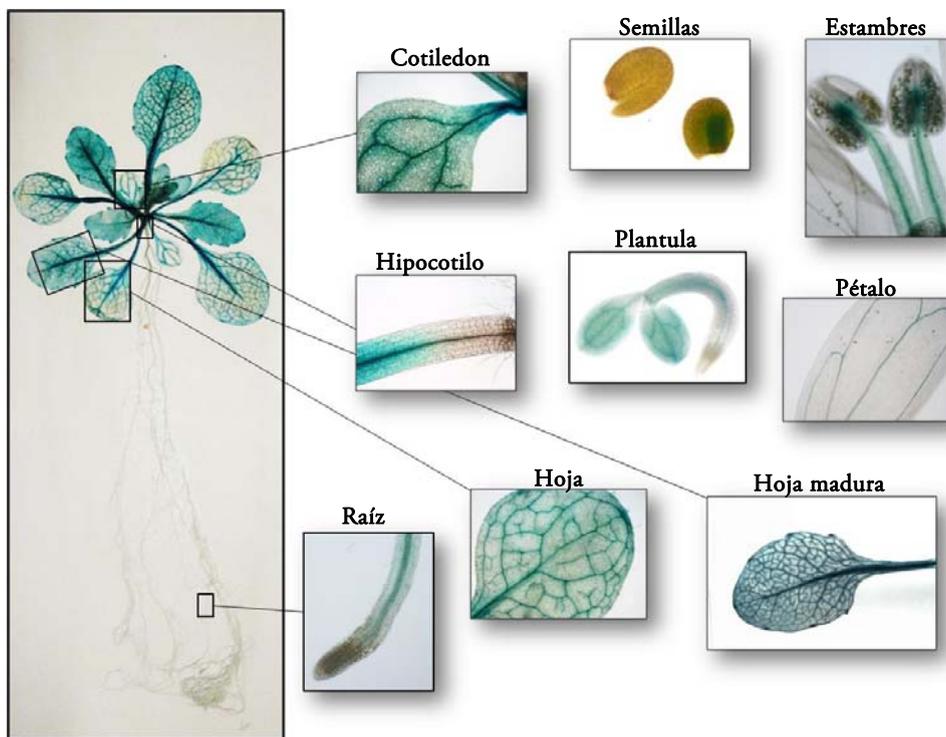


Figura 4.2.6. Análisis cualitativo de la expresión del gen *GUS*, bajo el promotor completo de 3000 pares de bases del gen *CtHSR1* en diferentes estadios de desarrollo.

De esta forma, si observamos una sección longitudinal de raíz de arábidopsis en la dirección que marca el ojo en la Figura 4.2.7A, podemos identificar en la Figura 4.2.7B las células de las traqueidas propias del xilema en la parte exterior de la señal *GUS*, quedando ésta rodeada por las células helicoidales. De este modo, podríamos aventurarnos a situar la expresión de la región reguladora de candida en células del floema en arábidopsis.

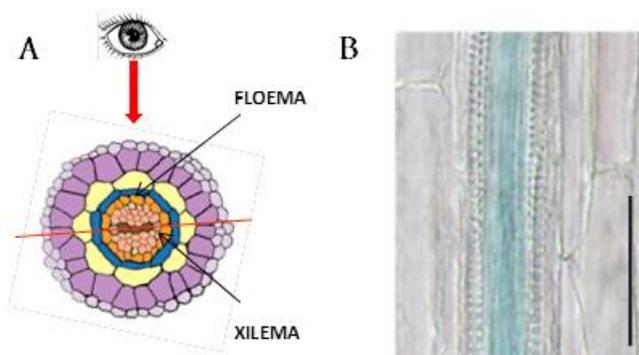


Figura 4.2.7. Observación de la expresión del gen *GUS* bajo el promotor del gen *CtHSR1* en raíz de *arabidopsis* mediante la técnica Nomarsky. A) Esquema de visualización de una sección transversal de raíz de *arabidopsis*. B) Fotografía Nomarsky de la sección longitudinal de raíz de *arabidopsis* con señal *GUS*. La barra indica una longitud de 50µm.

Aunque parece clara la expresión específica en tejido vascular para la región reguladora del gen *CtHSR1*, realizamos diferentes ensayos para la identificación de los tipos celulares en los que este promotor estaba dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS*. Para ello, realizamos secciones de tallo floral (Figura 4.2.8) y cortes histológicos de hipocotilos (Figura 4.2.9) en plantas de *arabidopsis*.

Como se observa tanto en las secciones de tallo (Figura 4.2.8), como en los cortes histológicos de hipocotilo (Figura 4.2.9), podemos situar la expresión de gen reportero *GUS* en células del floema, tejido importantísimo en el balance hídrico vegetal, ya que se encarga del transporte de compuestos orgánicos e inorgánicos desde la parte superior de la planta a las zonas sumidero.

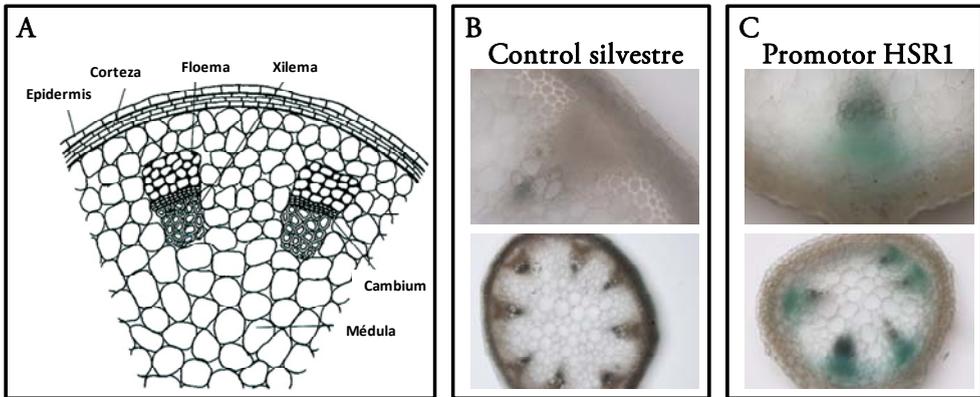


Figura 4.2.8. Observación al microscopio de la expresión del gen *GUS* bajo el promotor del gen *CtHSR1* en secciones transversales de tallo de arábidopsis. A) Esquema de una sección transversal de tallo floral en arábidopsis (Boyko y col., 2006). B) Sección transversal de tallo de arábidopsis de una línea control tras la realización de un ensayo de tinción GUS. C) Sección transversal de tallo de arábidopsis de una línea que expresa el gen *GUS* bajo el control del promotor de *candida*, tras la realización de un ensayo de tinción GUS.

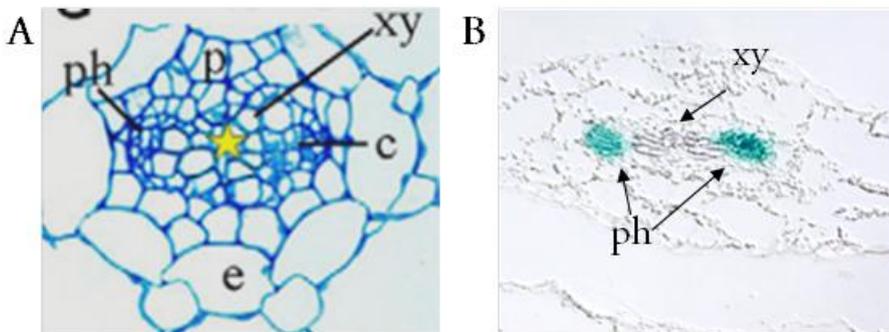


Figura 4.2.9. Observación al microscopio de la expresión del gen *GUS* bajo el promotor del gen *CtHSR1* en secciones transversales de hipocotilo de arábidopsis. A: estructura celular de una sección de hipocotilo de arábidopsis (Ilegems y col., 2010). B: Sección transversal de hipocotilo de arábidopsis de una línea que expresa el gen *GUS* bajo el control del promotor de *CtHSR1*, tras la realización del ensayo histoquímico. Ph: floema, xy: xilema, p: periciclo, e: endodermis, c: cambium.

4.2.3- Caracterización cuantitativa de la funcionalidad del promotor de *CtHSR1*

Además de conocer el tejido donde se expresa el promotor del gen *CtHSR1* mediante ensayos cualitativos, quisimos conocer si este promotor era inducible por diferentes estímulos, y de ser así, si estos cambios eran específicos de la longitud del promotor. Para ello, realizamos un ensayo de hidrólisis del sustrato MUG (4-metilumbelliferil- β -D glucurónido) mediante la enzima β glucuronidasa, la cual es expresada bajo el promotor del gen *CtHSR1*. Esta enzima hidroliza el sustrato y produce fluorescencia a una longitud de onda de 448nm. Del mismo modo, quisimos comprobar mediante tratamientos de 2 horas con NaCl, calor y manitol, si el promotor de candida de 3000 pares de bases, era capaz de inducir la expresión de la enzima β glucuronidasa bajo diferentes tipos de estrés. Decidimos realizar este análisis con las líneas que contenían el promotor completo, ya que al no encontrar diferencias en el análisis cualitativo entre ambas construcciones, pensamos que la mejor opción era analizar el promotor completo, y así no eliminar alguna posible región reguladora presente en las primeras 1000 pares de bases. Como observamos en la Figura 4.2.10, las líneas analizadas mostraron unas tendencias similares entre sí. Esta región del promotor fue capaz de inducir modestamente (1,2-1,5 veces) la expresión de la enzima β glucuronidasa bajo el tratamiento de 2 horas con manitol 250mM, ya que los tratamientos con NaCl y calor produjeron una señal similar al tratamiento control. De esta forma pudimos observar que el promotor propio del gen *CtHSR1* mostró unos valores de actividad en hidrólisis de MUG de entre 0,5 y 5 pmolMU/min* μ g. Además, observando la secuencia de las 1000 pares de bases diferenciales, entre la construcción de 2000 y la de 3000 pares de bases, identificamos 3 motivos de respuesta a estrés; el AAAAAATTTTC (*HSE*, del inglés *Heat Shock Element*), el TAACTG (*MBS*, del inglés *Myb Binding Site*), y el ATTTTCTTCA (NT-TC, *Rich Repeats*; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), que podrían ser relevantes para la respuesta de este factor de transcripción ante episodios de estrés.

Por último, analizamos la actividad glucuronidasa bajo el promotor constitutivo *35S*, y los datos obtenidos muestran unos niveles de actividad aproximados de 60 pmolMU/min μ g (de 10 a 100 veces superiores a los del promotor del gen *CtHSR1*).

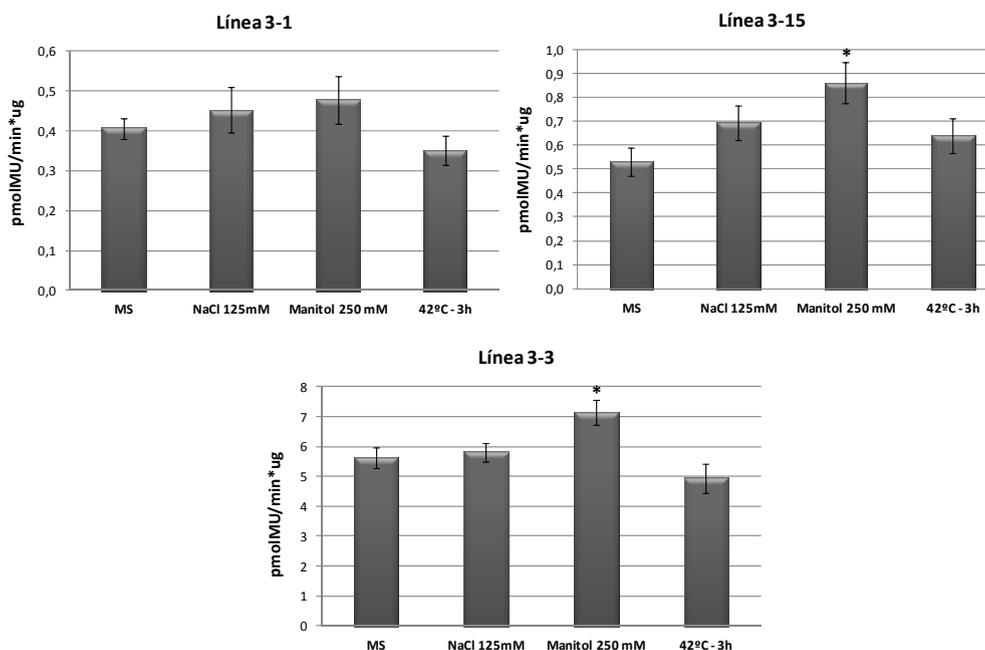


Figura 4.2.10. Análisis cuantitativo de la expresión del gen *GUS* inducido por el promotor de 3000 pares de bases del gen *CtHSR1* de candida, bajo diferentes estímulos como NaCl, manitol y calor. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

4.2.4- Localización subcelular del factor CtHSR1 expresado en plantas

Una vez comprobada la funcionalidad del promotor de este gen, y la tolerancia conferida por la expresión del gen *CtHSR1* bajo su propia región reguladora de 3000 pares de bases frente al estrés osmótico, se realizaron experimentos de transformación estable en *arabidopsis* para determinar la localización subcelular de la proteína sintetizada. Para ello, se realizaron diferentes construcciones genéticas, tal y como se describe en el Apartado 3.10.9.4 de Materiales y Métodos, fusionando la secuencia codificante del factor de transcripción *CtHSR1* a la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente GFP. Mediante el plásmido pMDC43, se fusionó la GFP en el extremo N-terminal del factor de transcripción *CtHSR1*. Por otro lado, se utilizó el plásmido pMDC83 para fusionar la GFP al factor de transcripción, pero en este caso en el extremo C-terminal del gen *CtHSR1*. Finalmente, se llevaron a cabo diferentes eventos de transformación estable en *arabidopsis*, y tras analizar y

seleccionar la población T₃ homocigota para el transgén, fruto que dichas transformaciones, no conseguimos detectar esta fusión proteica bajo microscopía confocal. Tras no poder detectar mediante transformación estable en arabisopsis la fusión proteica GFP-CtHSR1 o CtHSR1-GFP, se pensó en utilizar otro sistema modelo como *Nicotiana benthamiana*, realizando experimentos de transformación transitoria en células epidérmicas. Para ello, se cultivaron plantas de *Nicotiana benthamiana* en invernadero durante 20 días, y posteriormente fueron sometidas a agroinfiltración foliar tal y como se describe en el Apartado 3.5.2 de Materiales y Métodos. Como se observa en la Figura 4.2.11, conseguimos localizar la fusión proteica en los núcleos de células epidérmicas. Para comprobar que la señal observada provenía del núcleo, se hizo necesario el uso del colorante DAPI como control de localización nuclear, ya que se une a la doble hélice del ADN y emite luz azul cuando lo observas bajo luz ultravioleta. La señal GFP se detectó tanto con la fusión obtenida en el extremo N-terminal (pMDC43), como con la fusión en el extremo C-terminal (pMDC83).

Sin embargo, la tinción DAPI se realizó solo con la fusión expresada mediante el plásmido pMDC83 y como se observa en la Figura 4.2.11 podemos observar que la señal DAPI, colocaliza perfectamente con la señal de la fusión proteica CtHSR1-GFP.

4.2.5- Obtención de plantas transgénicas que expresan la región codificante del gen *CtHSR1* bajo diferentes promotores

Conociendo que en trabajos previos realizados por Anjuman Arif (no publicados), se observó que la expresión del gen *CtHSR1* bajo su propia región reguladora, era capaz de conferir resistencia a salinidad, calor y sequía en *Nicotiana tabacum*, nos marcamos el objetivo de reproducir estos fenotipos en arabisopsis ya que en este sistema era más fácil para la caracterización de los mecanismos. Para ello, transformamos esta especie con diferentes construcciones para expresar el factor de transcripción CtHSR1 bajo su propio promotor, bajo el promotor constitutivo 35S, y bajo el promotor del gen *UBQ10*.

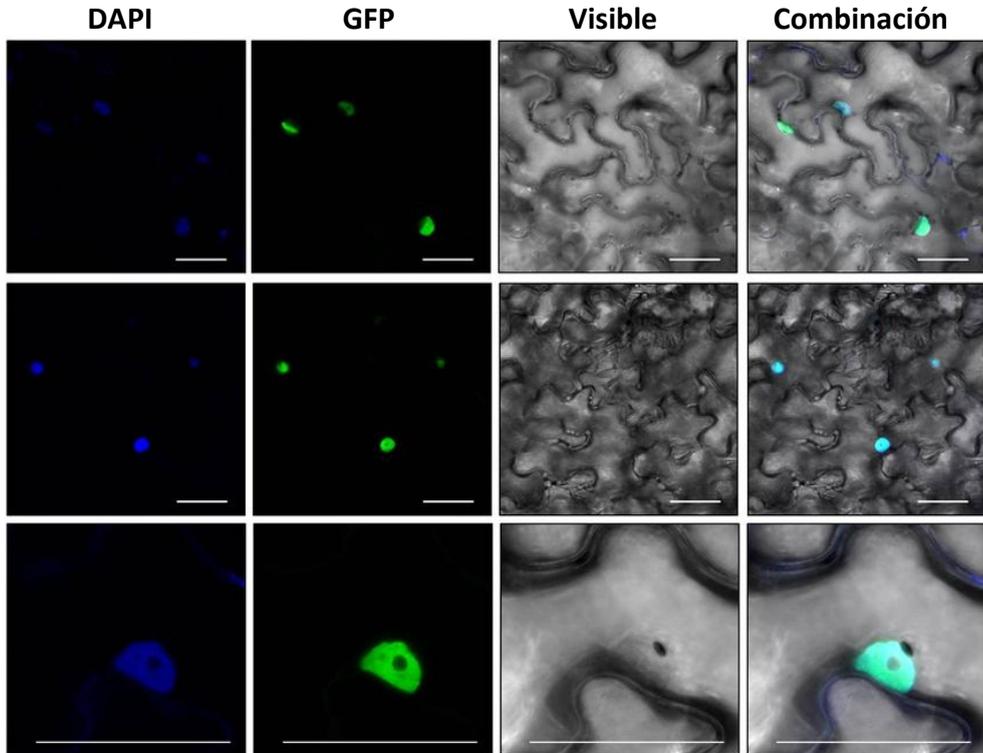


Figura 4.2.11. Análisis cualitativo de la localización subcelular del gen *CtHSR1* de *Candida tropicalis*, mediante microscopía confocal en células epidérmicas de *Nicotiana benthamiana*, transformadas con la construcción pMDC83-*CtHSR1*. Se muestra de izquierda a derecha la fluorescencia debida a la tinción de núcleos con DAPI, la fluorescencia de la proteína GFP, las fotografías tomadas en rango visible, y finalmente la combinación de las tres anteriores. Las barras indican una longitud de 50 μ m.

4.2.5.1- Caracterización genética y fenotípica de plantas expresoras del gen *CtHSR1* bajo su propio promotor

Una vez obtenidas plantas transgénicas de arabis de Arabidopsis mediante infiltración floral con la construcción pBIN19-*CtHSR1*, se seleccionaron 5 líneas homocigotas T₃ de una inserción para el transgén, y se analizaron mediante PCR semicuantitativa para comprobar la expresión del gen *CtHSR1*. Como podemos observar en la Figura 4.2.12, todas las líneas analizadas poseen expresión del gen introducido (en las líneas 22-2, 14-3 y 18-4, la expresión es mayor que en las líneas 16-3 y 20-1). Una vez comprobada la expresión del factor de transcripción de *C. tropicalis*, se realizaron

diferentes experimentos para valorar el efecto de la inserción del gen *CtHSR1* sobre la tolerancia a diferentes tipos de estrés.

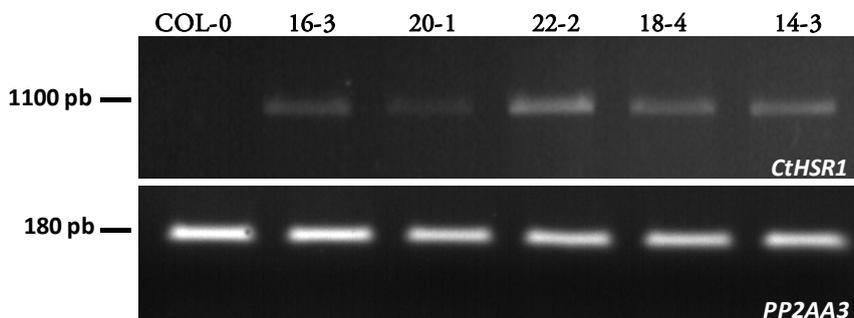


Figura 4.2.12. Electroforesis en gel de agarosa del producto de una PCR semicuantitativa del transgén *CtHSR1* para las líneas que lo expresan bajo toda su región reguladora. COL-0: control silvestre. En esta reacción se ha utilizado como control endógeno el gen *PP2AA3*, uno de los tres genes que codifican la subunidad reguladora de 65kDa de la proteína fosfatasa PP2A. El producto de PCR fue amplificado durante 30 ciclos.

Uno de los caracteres buscados en primer lugar, basado en la tolerancia conferida por la expresión del *CtHSR1* en plantas de tabaco (datos no publicados), fue la tolerancia a la sequía. Para ello, sometimos las líneas seleccionadas a estrés hídrico durante 2 semanas (tratamiento 1). De igual forma, plantas de la misma edad fueron regadas de forma continuada como control de desarrollo (tratamiento 2). Tras estas dos semanas, se tomaron los datos de peso fresco para ambos tratamientos, y después de secar el tejido en una estufa a 50°C durante 72 horas, tomamos los valores de peso seco para todos los individuos ensayados. Como podemos observar en la Figura 4.2.13 en condiciones normales (regadas de forma continuada con solución nutritiva), las líneas modificadas genéticamente con el gen *CtHSR1* poseen un menor desarrollo que su control silvestre (Figura 4.2.13 A y B). Sin embargo, este menor desarrollo causado probablemente por la expresión del transgén, ayuda a las líneas transgénicas a tolerar mejor la sequía, manteniendo un mayor contenido hídrico tras el tratamiento.

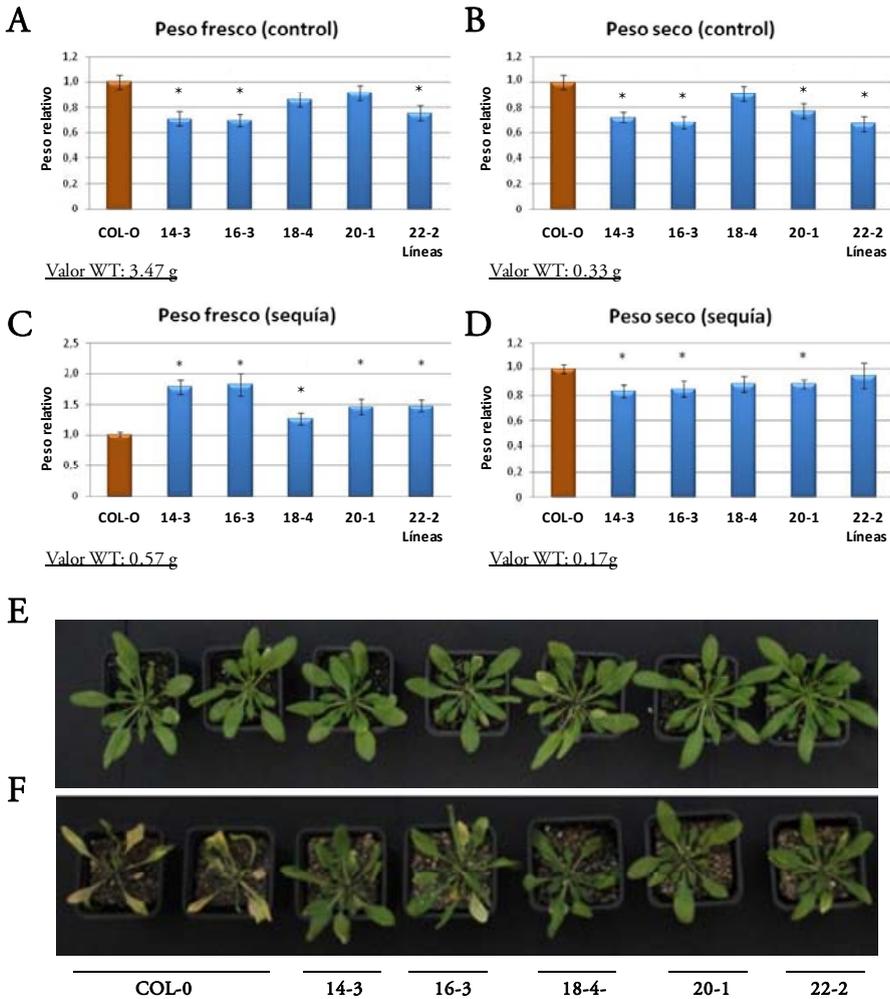


Figura 4.2.13. Caracterización fenotípica en relación con la tolerancia a sequía en las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo toda su región reguladora, respecto a su control silvestre. A) indica el peso fresco en condiciones control. B) indica el peso seco en condiciones control. C) indica el peso fresco tras el tratamiento de sequía. D) indica el peso seco tras el tratamiento de sequía. E) fotografía del aspecto de las plantas en condiciones control, antes de la toma de datos y F) fotografía del aspecto de las plantas tras el tratamiento de sequía, antes de la toma de datos. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Todas las líneas analizadas mostraron de forma significativa un mayor peso fresco tras el tratamiento de sequía que la línea silvestre (Figura 4.2.13C) y también muestran un aspecto más vigoroso que la línea control (Figura 4.2.13F).

Continuando con la caracterización fenotípica, se realizaron ensayos de aparición de cotiledones tras la germinación en presencia de NaCl y manitol. A los seis días de la germinación, tres de las líneas analizadas mostraban un porcentaje de cotiledones verdes y expandidos un 20% mayor que el control silvestre. Estos resultados indican que la expresión del *CtHSR1* confiere tolerancia al estrés osmótico en los primeros estadios del desarrollo (Figura 4.2.14).

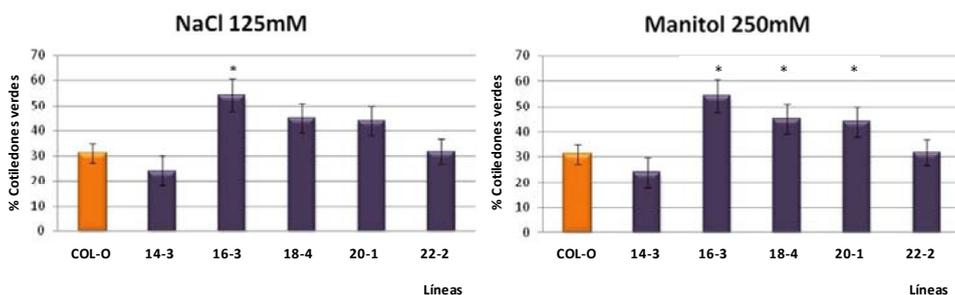


Figura 4.2.14. Análisis de aparición de cotiledones verdes tras la germinación para las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo toda su región reguladora. Cada valor representa la media de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

4.2.5.2- Caracterización genética y fenotípica de plantas sobreexpresoras del gen *CtHSR1* bajo el promotor del gen *UBQ10*

Al igual que en el apartado anterior, un vez obtenidas plantas transgénicas de *Arabidopsis* con la construcción pGPTVII-UBQ10-*CtHSR1*, se seleccionaron 4 líneas homocigotas T₃ de una inserción para el transgén, y se analizaron mediante PCR semicuantitativa para comprobar la expresión del gen *CtHSR1*.

Bajo la acción del promotor de ubiquitina, también pudimos confirmar la expresión del gen *CtHSR1* para las líneas seleccionadas, siendo las líneas U19 y U21 las de mayor expresión (Figura 4.2.15). En este caso, al igual que con la construcción anterior, realizamos ensayos de germinación, como ensayos de tolerancia a la sequía en planta adulta (Figura 4.2.16 y Figura 4.2.17).

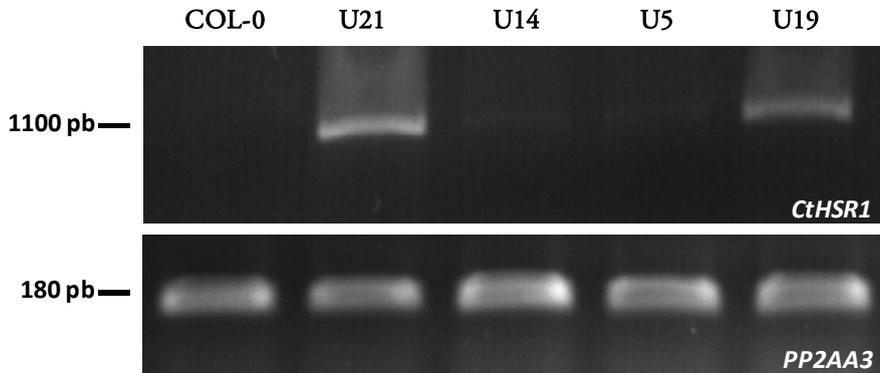


Figura 4.2.15. Electroforesis en gel de agarosa del producto de una PCR semicuantitativa del transgén *CtHSR1* para las líneas que lo expresan bajo el promotor de ubiquitina10. COL-0: control silvestre. En esta reacción se ha utilizado como control endógeno el gen *PP2AA3*, uno de los tres genes que codifican la subunidad reguladora de 65kDa de la proteína fosfatasa PP2A. El producto de PCR fue amplificado durante 30 ciclos.

En estos ensayos podemos observar que, al igual que sucedía en las líneas en las que se expresaba el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, la expresión de dicho gen conlleva una reducción en el desarrollo normal de las líneas seleccionadas en condiciones control (dado por su menor peso fresco y seco en condiciones normales), así como una mejora en la capacidad de retención de agua bajo condiciones de sequía (Figura 4.2.16). Por el contrario, estas líneas poseen una tolerancia al estrés osmótico en condiciones tempranas del desarrollo similar a la del control, hecho que queda demostrado mediante los ensayos de germinación en presencia de NaCl y manitol (Figura 4.2.17).

4.2.5.3- Caracterización genética y fenotípica de plantas sobreexpresoras del gen *CtHSR1* bajo el control del promotor constitutivo *35S*

Finalmente, también se obtuvieron plantas transgénicas de arábidopsis mediante infiltración floral con la construcción pMDC32-*CtHSR1* (promotor *35S*), se seleccionaron 4 líneas homocigotas T₃ de una inserción para el transgén, y se analizaron mediante PCR semicuantitativa para comprobar la expresión del *CtHSR1*.

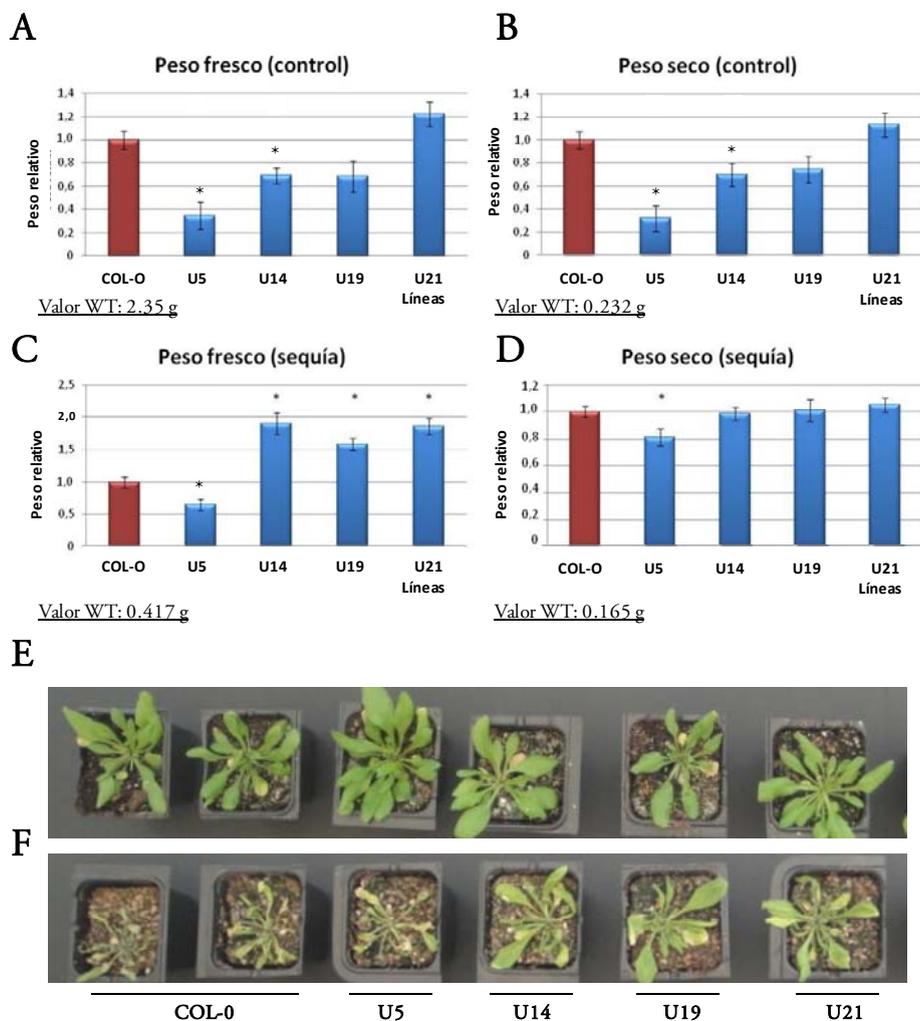


Figura 4.2.16. Caracterización fenotípica en relación con la tolerancia a sequía en las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo el promotor de ubiquitina10, respecto a su control silvestre. A) indica el peso fresco en condiciones control. B) indica el peso seco en condiciones control. C) indica el peso fresco tras el tratamiento de sequía. D) indica el peso seco tras el tratamiento de sequía. E) fotografía del aspecto de las plantas en condiciones control, antes de la toma de datos y F) fotografía del aspecto de las plantas tras el tratamiento de sequía, antes de la toma de datos. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

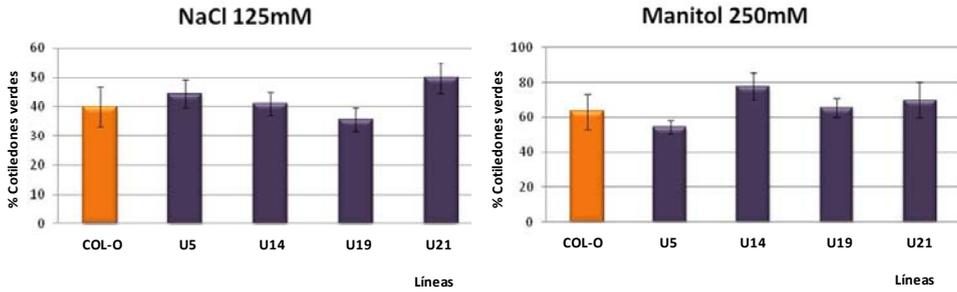


Figura 4.2.17. Análisis de aparición de cotiledones verdes tras la germinación para las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo el control del promotor del gen *UBQ10*. Cada valor representa la media de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

A través del análisis mediante PCR semicuantitativa pudimos confirmar la expresión del gen *CtHSR1* en las líneas seleccionadas en esta transformación. En este caso, todas las líneas analizadas mostraban niveles de expresión similares, ya que se trata de un promotor fuerte, que se expresa en toda la planta de forma constitutiva (Figura 4.2.18).

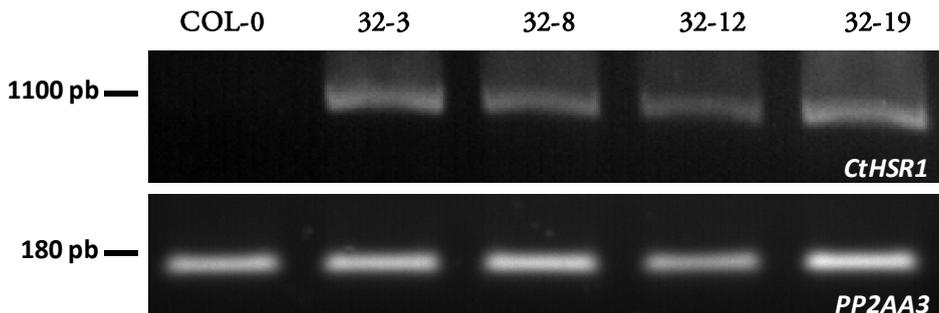


Figura 4.2.18. Electroforesis en gel de agarosa del producto de una PCR semicuantitativa del transgén *CtHSR1* para las líneas que lo expresan bajo el promotor constitutivo *35S*. COL-0: control silvestre. En esta reacción se ha utilizado como control endógeno el gen *PP2AA3*, uno de los tres genes que codifican la subunidad reguladora de 65kDa de la proteína fosfatasa PP2A. El producto de PCR fue amplificado durante 25 ciclos.

Mediante el ensayo de tolerancia a la sequía, pudimos observar que en esta ocasión las líneas analizadas poseían, al contrario que en las otras transformaciones, un crecimiento similar a la línea control en condiciones normales de riego. En este caso, la sobreexpresión del gen *CtHSRI* no suponía un limitante en el desarrollo. Del mismo modo, la expresión de este gen bajo el promotor *35S* tampoco suponía una ventaja en la tolerancia a la sequía, ya que, según observamos en la Figura 4.2.19, las líneas modificadas genéticamente no mostraban, de forma general, un mayor peso fresco tras el tratamiento de sequía que la línea control.

En cuanto a los ensayos de germinación en presencia de NaCl y manitol (Figura 4.2.20), dos de las líneas que expresan el factor de transcripción de *Candida* (32-8 y 32-19) muestran un porcentaje de germinación un 20-30% superior que el control silvestre en los dos tratamientos. Por otro lado, las otras dos líneas (32-2 y 32-12) muestran unos valores de germinación muy similares al control, por lo que no podemos concluir que la expresión del gen *CtHSRI* bajo el promotor constitutivo *35S*, confiera tolerancia al estrés osmótico en estadios tempranos del desarrollo en *arabidopsis*.

Una vez concluida la caracterización fenotípica para las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor, bajo el promotor del gen *UBQ10* y bajo el promotor constitutivo *35S*, decidimos continuar los experimentos solo con las líneas que expresan el factor de transcripción de *Candida tropicalis* bajo su propia región reguladora. Estas líneas, mostraban una mejor tolerancia a la sequía en planta adulta, ya que tras el tratamiento de dos semanas conservaban de forma generalizada un mayor contenido hídrico respecto a su control silvestre.

Además, en estadios tempranos del desarrollo, también mostraban una germinación superior frente al estrés osmótico en medio suplementado con NaCl y manitol cuando son comparadas con las líneas control, las líneas que expresan *CtHSRI* bajo el promotor constitutivo *35S* o las líneas que expresan el factor de transcripción de *Candida* bajo el control del promotor de ubiquitina10.

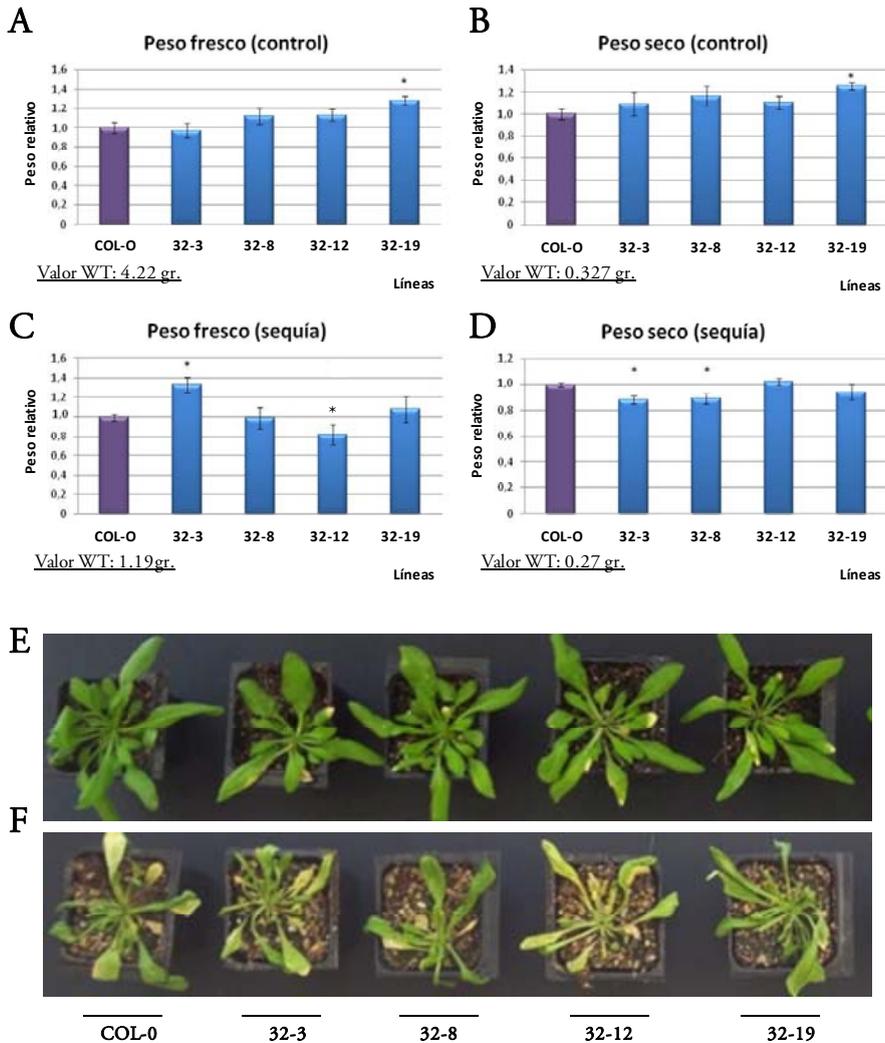


Figura 4.2.19. Caracterización fenotípica en relación con la tolerancia a sequía en las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo el promotor constitutivo *35S*, respecto a su control silvestre. A) indica el peso fresco en condiciones control. B) indica el peso seco en condiciones control. C) indica el peso fresco tras el tratamiento de sequía. D) indica el peso seco tras el tratamiento de sequía. E) fotografía del aspecto de las plantas en condiciones control, antes de la toma de datos y F) fotografía del aspecto de las plantas tras el tratamiento de sequía, antes de la toma de datos. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

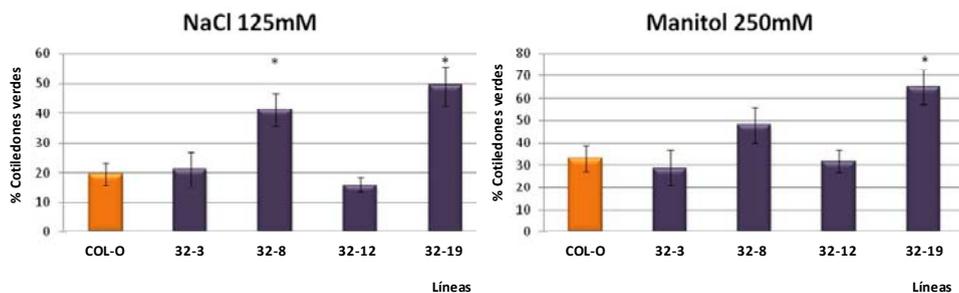


Figura 4.2.20. Análisis de aparición de cotiledones verdes tras la germinación para las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo el promotor constitutivo *35S*. Cada valor representa la media de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

4.2.6- Caracterización de la respuesta a Ácido Abscísico de las plantas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propia región reguladora

El ABA es la principal hormona implicada en la señalización y tolerancia frente al estrés osmótico, ya que juega un papel importantísimo en el cierre de estomas para evitar grandes pérdidas de agua por transpiración, y también está involucrada en la síntesis de osmolitos compatibles, que además de mejorar la retención del contenido hídrico celular, mejoran la estabilidad e integridad de las membranas y proteínas, evitando daño celular. Debido a ello, quisimos conocer la respuesta de nuestras plantas modificadas con el gen *CtHSR1* frente a esta hormona vegetal. Para ello, realizamos ensayos de germinación, desarrollo vegetativo y apertura estomática en presencia de ABA, y también cuantificamos la acumulación total de esta hormona en las plantas que expresan el factor de transcripción de *Candida tropicalis*. Como observamos en la Figura 4.2.21, realizamos ensayos de germinación en ausencia y en presencia de ABA a concentraciones de 0,2, 0,4 y 0,6 μM .

El ácido abscísico interviene en el proceso de maduración de la semilla, inhibiendo la germinación. A los seis días después de la siembra, no detectamos diferencias en el porcentaje de plántulas que mostraban cotiledones verdes y expandidos entre las líneas que expresan el gen *CtHSR1* y su control silvestre. Por lo

tanto, la expresión de este gen no confiere tolerancia ni sensibilidad a esta hormona vegetal, en estadios tempranos del desarrollo.

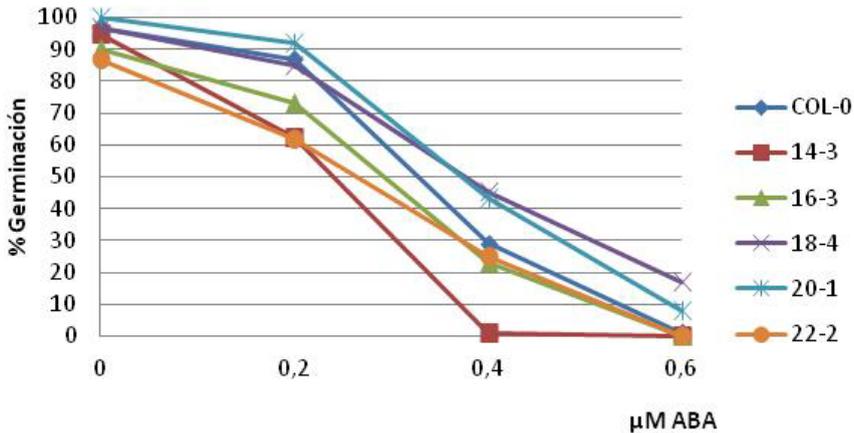


Figura 4.2.21. Ensayo de germinación en presencia de diferentes concentraciones de ácido abscísico para las líneas que expresan el gen *CHSR1* bajo su propio promotor, y su control silvestre COL-0. Las medidas se tomaron a los 6 días después de la siembra. Cada valor representa la media de 4 determinaciones. En ningún caso se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

De igual forma, plántulas de 7 días de desarrollo, fueron transplantadas a placas de cultivo vertical, con una concentración de $10 \mu\text{M}$ de ABA, durante 14 días. Además de inhibir la germinación, esta hormona es la responsable de la señalización de múltiples estreses, por lo que las plantas en presencia de ácido abscísico cesan su desarrollo hasta que la señalización del estrés cesa. Así, podemos observar en la Figura 4.2.22 que, en ausencia de ABA, todas las líneas analizadas poseen un desarrollo similar a su control silvestre.

Esto ocurre también bajo la presencia de esta hormona, excepto en la línea 14-3, por lo que no existen tampoco diferencias en la tolerancia a esta molécula en estadios avanzados del desarrollo.

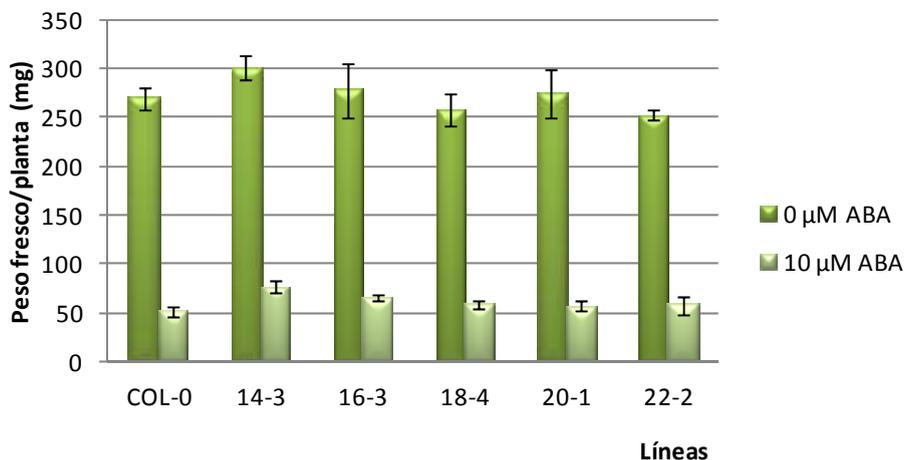


Figura 4.2.22. Ensayo de crecimiento en presencia de 0 y 10 μM de ácido abscísico, para las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, y su control silvestre COL-0 durante 14 días de crecimiento. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su tratamiento control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

También se realizó la determinación de la apertura estomática en condiciones normales y en presencia de 0,5 μM de ABA, mediante la relación ancho/largo del ostiolo. Como hemos comentado al inicio de este apartado, el ácido abscísico es la hormona encargada del cierre estomático frente al estrés hídrico. Nuestros resultados muestran que, las líneas que expresan en factor de transcripción *CtHSR1*, en condiciones normales poseen de forma significativa, una menor apertura estomática que su control silvestre, aproximadamente del 5% (Figura 4.2.23).

En presencia de 0,5 μM de ABA, las líneas transgénicas tienen un nivel de cierre estomático un 20% mayor al de la línea control, por lo que se observa un comportamiento diferencial en el cierre estomático mediado por ABA. Esa menor apertura estomática en las líneas modificadas genéticamente respecto al control silvestre en presencia de ABA puede ser uno de los factores determinantes para la tolerancia de estas plantas a la sequía.

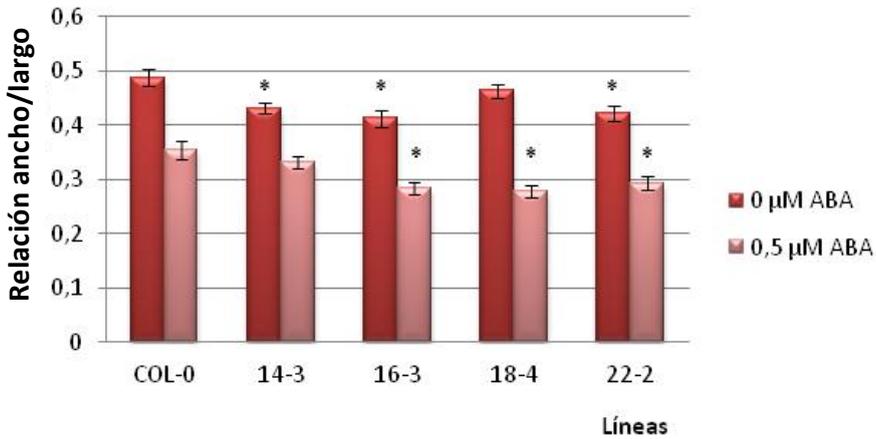


Figura 4.2.23. Ensayo de apertura estomática en ausencia y presencia de ácido abscísico, para las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a las plantas control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Para comprobar que realmente la planta no había desarrollado mecanismos de adaptación a esta menor apertura estomática, como podrían ser una mayor densidad estomática o una mayor área de los estomas, se realizaron mediciones de estos dos parámetros. Como se observa en la Figura 4.2.24, en cuanto al área de los estomas, no existen diferencias significativas entre las líneas *CtHSR1* y su control silvestre.

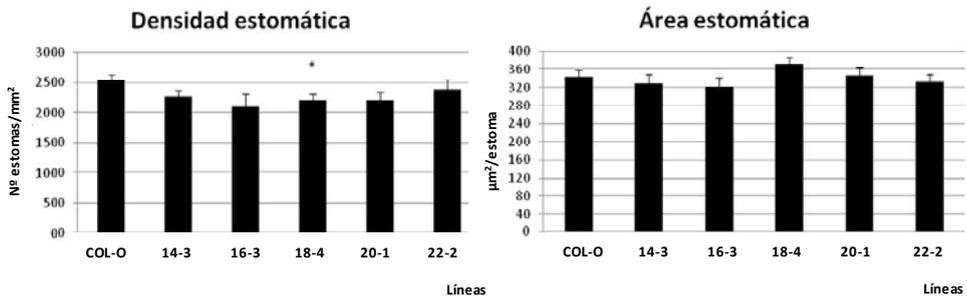


Figura 4.2.24. Medidas de la densidad y área estomática en condiciones normales, para las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor. Cada valor representa la media \pm SE de 4 determinaciones biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Por el contrario, aunque solo aparece significativa la reducción en la densidad estomática para la línea 18-4, la tendencia general en las líneas modificadas genéticamente con el gen *CtHSR1* es hacia una menor densidad estomática, que junto con la menor apertura de estomas en condiciones normales, confieren una mejor adaptación a situaciones de estrés hídrico.

4.2.7- Cuantificación hormonal de las plantas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propia región reguladora

Aunque en la caracterización de las líneas *CtHSR1* no identificamos ninguna alteración en el desarrollo mediado por ácido abscísico, la menor apertura estomática aparece como un posible indicador de que el balance hormonal este alterado. Por ello, en el servicio de cuantificación de hormonas del IBMCP nos dispusimos a medir el contenido hormonal en ácido abscísico, ácido jasmónico y ácido indolacético en varias de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo el control de su propia región reguladora.

En cuanto al contenido en ABA, no aparecen diferencias significativas entre las líneas transgénicas y el control silvestre, mostrando valores aproximados de 9,5 y 8 ng de hormona por cada gramo de peso fresco, respectivamente (Figura 4.2.25).

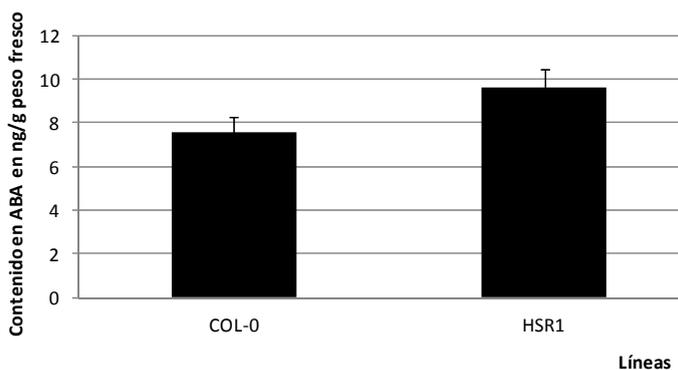


Figura 4.2.25. Contenido en ABA de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, respecto a su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media de 3 determinaciones biológicas, de COL-0 o de tres líneas independientes. No se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Por otro lado, pudimos observar que el contenido en ácido jasmónico se ve alterado en las plantas que expresan el gen *CtHSR1*. Este aumento en las plantas transgénicas de aproximadamente 2 veces el valor de su control, puede ser el causante del cierre estomático observado en las mediciones *in vivo* (Figura 4.2.26).

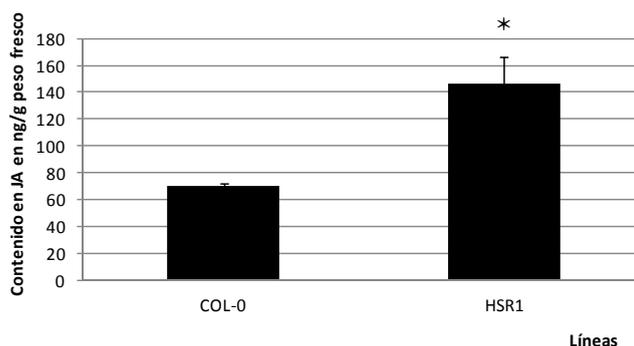


Figura 4.2.26. Contenido en JA de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, respecto a su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media de 3 determinaciones biológicas, de COL-0 o de tres líneas independientes. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Además, también pudimos observar un aumento de 1,3 veces en el contenido de ácido indolacético en las líneas *CtHSR1* respecto al COL-0, hormona involucrada principalmente en el desarrollo celular (Figura 4.2.27).

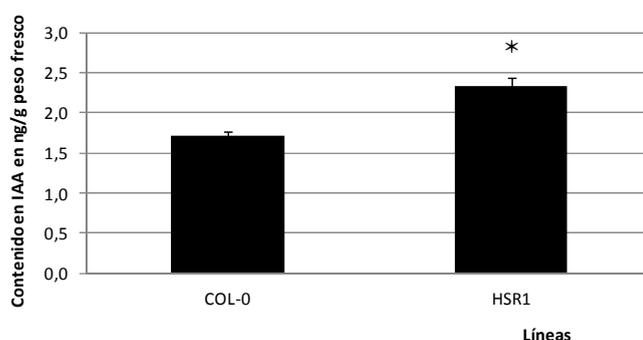


Figura 4.2.27. Contenido en IAA de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, respecto a su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media de 3 determinaciones biológicas, de COL-0 o de tres líneas independientes. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

4.2.8- Caracterización de parámetros fotosintéticos en las plantas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propia región reguladora

En colaboración con el Dr. Sergio González Nebauer (Departamento de Producción Vegetal, UPV), realizamos la medición de diferentes parámetros fisiológicos de la planta. Para ello, tal y como se describe en el Apartado 3.13.9, con ayuda de la estación fotosintética LICOR LIG 6400, se realizaron mediciones de la tasa de fijación de CO₂, la conductividad estomática (que refleja la tasa de apertura estomática), la tasa de transpiración y la eficiencia cuántica efectiva (que refleja el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico), para las líneas modificadas genéticamente y su control silvestre crecidas en condiciones normales.

Como se observa en la Tabla 4.2.2, de las 5 líneas ensayadas que expresan el gen *CtHSRI*, 3 de ellas (16-3, 18-4 y 20-1) poseen significativamente menor conductividad estomática (g_s), aunque esta menor conductividad aparece como una tendencia generalizada en todas las líneas analizadas. Además, este dato correlaciona con el análisis de apertura estomática descrito en el Apartado 4.2.6.

Tabla 4.2.2. Valores de tasa de fijación neta de CO₂ (A_n , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conductividad estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tasa de transpiración (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y eficiencia cuántica efectiva del PSII (PhiPS2) en plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan el gen *HSRI*. Cada valor es media de 5 determinaciones en plantas diferentes \pm SE. * indica diferencias significativas ($P < 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Genotipo	A_n	g_s	E	PhiPS2
COL-0	7,4 \pm 0,99	0,11 \pm 0,01	2 \pm 0,10	0,160 \pm 0,02
14-3	6,4 \pm 0,37	0,09 \pm 0,00	1,7 \pm 0,08*	0,155 \pm 0,00
16-3	7,2 \pm 0,66	0,07 \pm 0,01*	1,5 \pm 0,12*	0,155 \pm 0,01
18-4	5,5 \pm 1,09	0,06 \pm 0,01*	1,3 \pm 0,10*	0,123 \pm 0,03
20-1	7,1 \pm 0,96	0,08 \pm 0,01*	1,5 \pm 0,16*	0,165 \pm 0,03
22-2	6,5 \pm 0,29	0,09 \pm 0,00	1,7 \pm 0,07*	0,122 \pm 0,02

En cuanto a la tasa de transpiración (E), observamos una tendencia común en las líneas transgénicas presentando valores significativamente menores que su control silvestre en todos los casos analizados. Además, parece que existe también menor tasa de fijación de CO₂, mientras que la eficiencia cuántica efectiva (PhiPS2) aparece con valores similares para todas las líneas. La menor tasa de CO₂ (A_n ; aunque no

significativa) puede deberse a la menor apertura estomática, ya que estaría limitando la entrada de este gas al interior de la planta. Además, como veíamos en los experimentos de sequía, en condiciones normales estas plantas poseen un desarrollo menor que su control silvestre (Figura 4.2.13).

Por lo tanto, podemos concluir que en condiciones normales la expresión de gen *CtHSR1* de *Candida tropicalis* produce una menor apertura estomática que reduce la tasa de transpiración. Este efecto se acentúa en condiciones de sequía (ABA elevado, ver figura 4.2.23) y debe contribuir a que las líneas modificadas genéticamente con este gen mantengan mejor su contenido hídrico, tolerando en mayor medida la sequía.

4.2.9- Caracterización del balance hídrico de las plantas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propia región reguladora

También en colaboración con el Dr. Sergio González Nebauer, nos dispusimos a realizar medidas de diferentes parámetros del balance hídrico de las plantas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor. Entre los caracteres analizados se encuentra el potencial hídrico, el potencial osmótico, y el contenido hídrico relativo. El contenido hídrico relativo podría indicarnos una mayor capacidad de almacenamiento de agua en nuestras líneas modificadas respecto al control silvestre. Por otro lado, el potencial osmótico podría indicarnos diferencias en la acumulación de solutos compatibles, una de las estrategias empleadas por las plantas para tolerar de forma más efectiva la falta de agua.

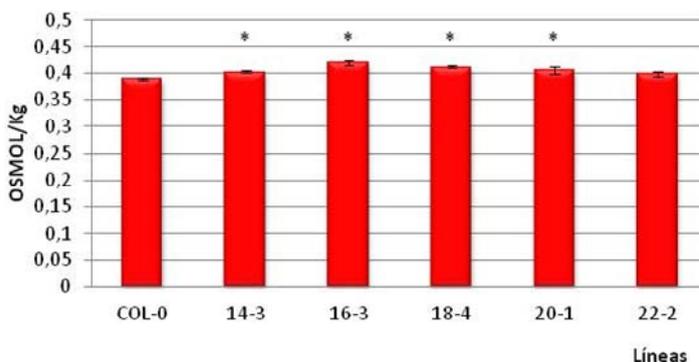


Figura 4.2.28. Medida del potencial osmótico en extractos de hojas de arabisopsis para las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Debido a la mínima superficie existente en el corte transversal del peciolo de las hojas de *arabidopsis*, nos fue prácticamente imposible realizar mediciones correctas del potencial hídrico con ayuda de la cámara de Scholander. Como observamos en la Figura 4.2.28, el potencial osmótico medido en OSMOMAT 030 a partir de extractos de hoja es significativamente superior en las líneas que expresan el factor de transcripción de *candida* que su control silvestre. Se trata de un aumento del 5-8% (equivalente a 20 miliosmoles), que contribuye a mejorar la tolerancia a la sequía observada.

Del mismo modo, en la Figura 4.2.29 podemos observar que no existen diferencias significativas en cuanto al contenido hídrico relativo. Esto demuestra que aunque las líneas *CtHSR1* no poseen una mayor capacidad de acumulación de agua, están acumulando alguna molécula osmóticamente activa en mayor concentración que la línea silvestre.

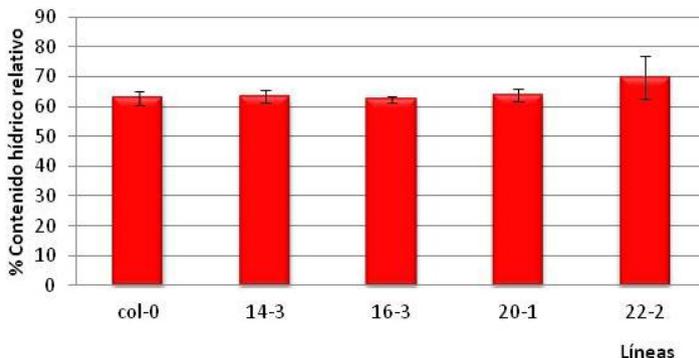


Figura 4.2.29. Medida del contenido hídrico relativo en hojas de *arabidopsis* para las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

4.2.10- Caracterización del ajuste osmótico de las plantas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propia región reguladora

Tras conocer que la expresión del gen *CtHSRI* en *arabidopsis* provoca la acumulación de algún osmolito, en primer lugar pensamos que, puesto que los cationes con mayor importancia en el ajuste osmótico a nivel intracelular son el Na^+ y el K^+ , alguno de ellos debería estar acumulándose en nuestras líneas modificadas.

Para comprobarlo, tomamos los mismos extractos celulares en los que habíamos medido el potencial osmótico, y mediante un espectrofotómetro de absorción atómica, cuantificamos la concentración molar de dichos iones. Como se observa en la Figura 4.2.30, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de sodio o potasio entre las líneas que expresan el gen *CtHSRI* y el control silvestre. En ambos genotipos, el sodio se encontraba a una concentración en torno a 10mM, mientras que el K^+ , catión mayoritario a nivel intracelular, se encontraba a una concentración de 90mM.

Otra de las posibles moléculas osmóticamente activas que podrían estar acumulándose son azúcares (como la sacarosa, glucosa y fructosa), ya que se trata de una estrategia comúnmente empleada por las células en el ajuste osmótico. En colaboración con el Dr. José María Bellés Albert (Departamento de Biotecnología, UPV), realizamos medidas de azúcares solubles en los mismos extractos celulares anteriormente utilizados, para el control silvestre COL-0 y la línea 14-3, que era la línea que mayor potencial osmótico mostraba.

Como se observa en la Figura 4.2.31, no se encontraron diferencias significativas en la concentración total de azúcares solubles en los extractos celulares de la línea *CtHSRI* respecto a su control silvestre.

Como se ha comentado en la Introducción, otro de los solutos orgánicos que la célula emplea en el ajuste osmótico a nivel intracelular es la prolina. Mediante el método descrito por Bates y colaboradores (1973), se cuantificó la concentración de prolina en las líneas que expresan el factor de transcripción de candida.

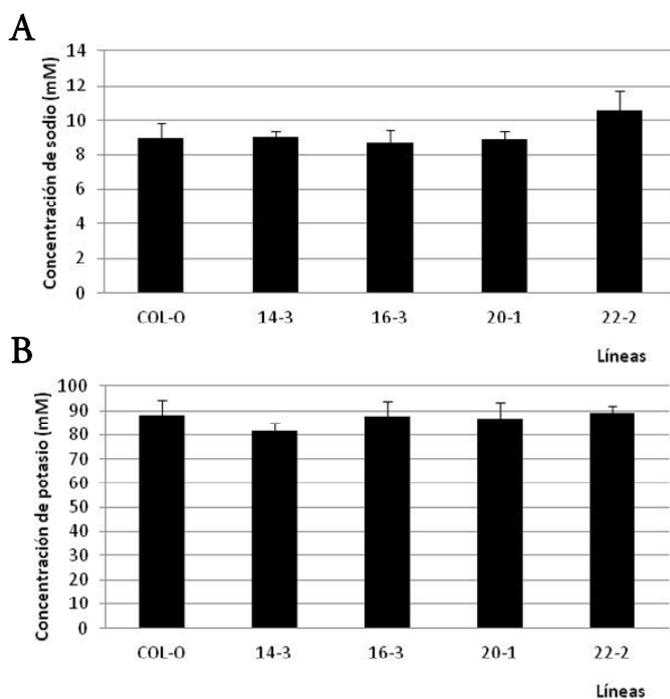


Figura 4.2.30. Medida del contenido en sodio (A) y potasio (B), de extractos de hojas de arabis en condiciones normales, para las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Para ello, tal y como se describe en el Apartado 3.13.8 de Materiales y Métodos, cuantificamos la concentración de prolina en condiciones normales, y como se puede observar en la Figura 4.2.32 encontramos diferencias significativas en todas las líneas analizadas con la línea silvestre. Las líneas que expresan en el gen *CtHSR1* contienen de 1,4 a 1,8 veces la concentración de prolina de su control. Por lo tanto, esta acumulación podría explicar el aumento en el potencial osmótico en las líneas modificadas genéticamente, que les permitiría mantener en mayor medida el contenido hídrico frente a una situación de estrés

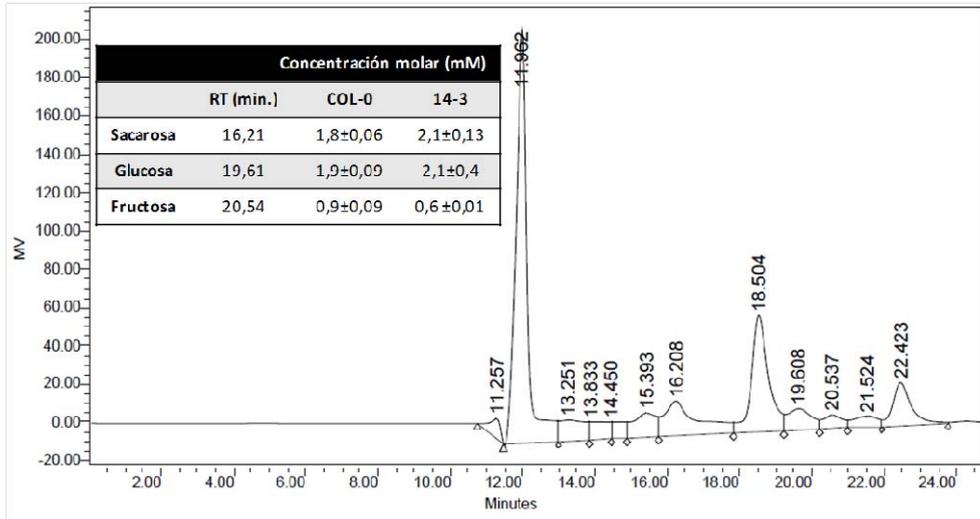


Figura 4.2.31. Medida del contenido en azúcares totales en extracto de hojas de arábidopsis para la línea 14-3 que expresa el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Se muestra un cromatograma típico de mediciones por HPLC, con los picos de absorción a diferentes tiempos (RT minutos), y en su interior se muestra una tabla con los datos obtenidos para cada línea analizada (mM). Estos datos son media de 3 determinaciones biológicas \pm el error estándar.

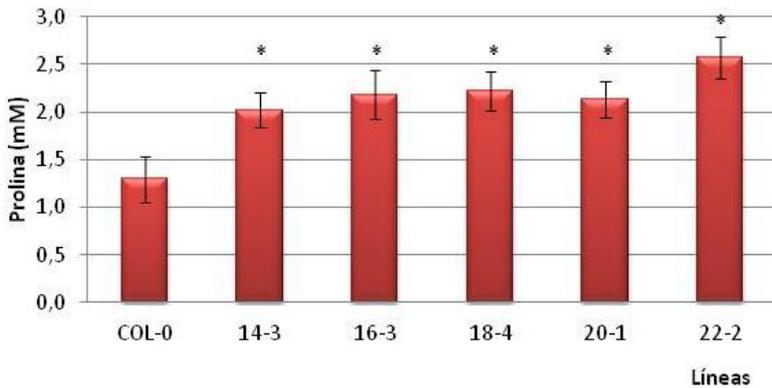


Figura 4.2.32. Medida de la concentración de prolina en las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

También se realizó una determinación del contenido de prolina en condiciones de sequía. Para ello, sometimos a las líneas CtHSR1 a estrés hídrico durante 10 días, y posteriormente analizamos el contenido en prolina. Como se observa en la Figura 4.2.33, aunque la línea silvestre es capaz de aumentar dos veces la concentración de este soluto, respecto al valor obtenido en condiciones normales, las líneas que expresan el gen de candida llegan a triplicar esta concentración, llegando a obtener unos valores de prolina intracelular de 7mM, (como es el caso de la línea 18-4).

Tras este resultado pensamos que, al igual que los niveles de prolina, la expresión de los genes de síntesis de este osmoprotector deberían estar alterados en las plantas que expresan el gen *CtHSR1*.

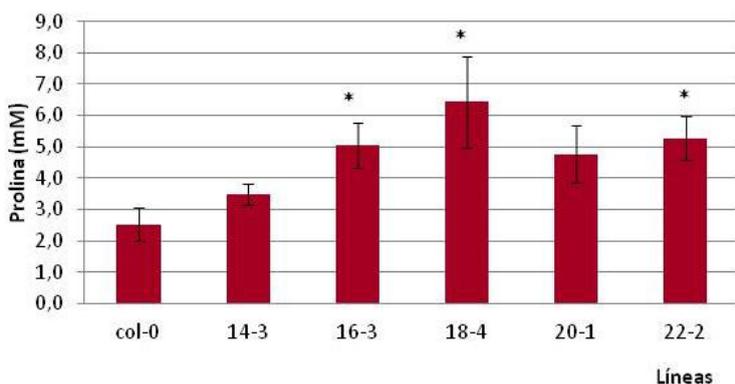


Figura 4.2.33. Medida de la concentración de prolina tras tratamiento de sequía, en las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Este análisis se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los genes implicados en el metabolismo de la prolina, tanto los responsables de la síntesis (los genes *P5CS1* y *P5CS2*) como los responsables de la degradación (los genes *PDH1*, *PDH2* y *P5CDH*).

En la Figura 4.2.34 podemos observar que el gen *P5CS1*, responsable de la síntesis de este aminoácido, se encuentra inducido 2,3 veces en las plantas que expresan el gen *CtHSR1* respecto a la línea control. Además, también apareció inducido el gen *PDH2*, uno de los genes encargados de la degradación de este soluto,

con valores de 1,5 veces superior al de su control silvestre. Este resultado podría sugerir que al estar inducida la síntesis y degradación de la prolina, la mayor acumulación existente en las plantas que expresan el factor CtHSR1 no estaría justificada.

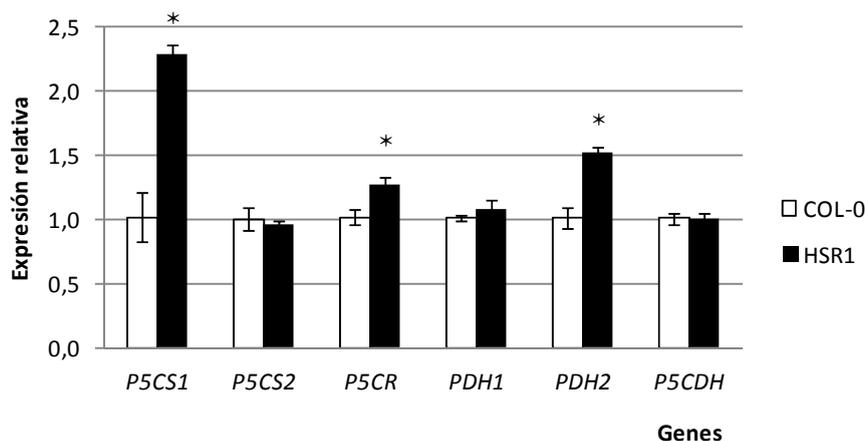


Figura 4.2.34. Análisis de expresión mediante qRT-PCR de los genes involucrados en el metabolismo de prolina, en las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Sin embargo, si observamos la Figura 4.2.32 en la que se ha tomado como referencia de expresión el valor del gen *PDH2* en la línea silvestre COL-0, observamos que el nivel de expresión del gen de síntesis *P5CS1* respecto al nivel de expresión del gen de degradación *PDH2* en las plantas transgénicas es 200 veces mayor. Por este motivo, la inducción del gen de degradación *PDH2* en las plantas transgénicas no tiene un efecto tan patente en el contenido total de prolina (Figura 4.2.35).

Por lo tanto, uno de los posibles mecanismos que emplean las plantas que expresan el factor de transcripción de *Candida tropicalis* para tolerar mejor la sequía, consistiría en reducir la apertura estomática, lo que conlleva una menor tasa de transpiración, sumada a un aumento del potencial osmótico mediado a través de la concentración de prolina. Todo ello, permite una mayor retención del contenido hídrico celular, permitiendo que estas plantas toleren mejor las situaciones de estrés hídrico.

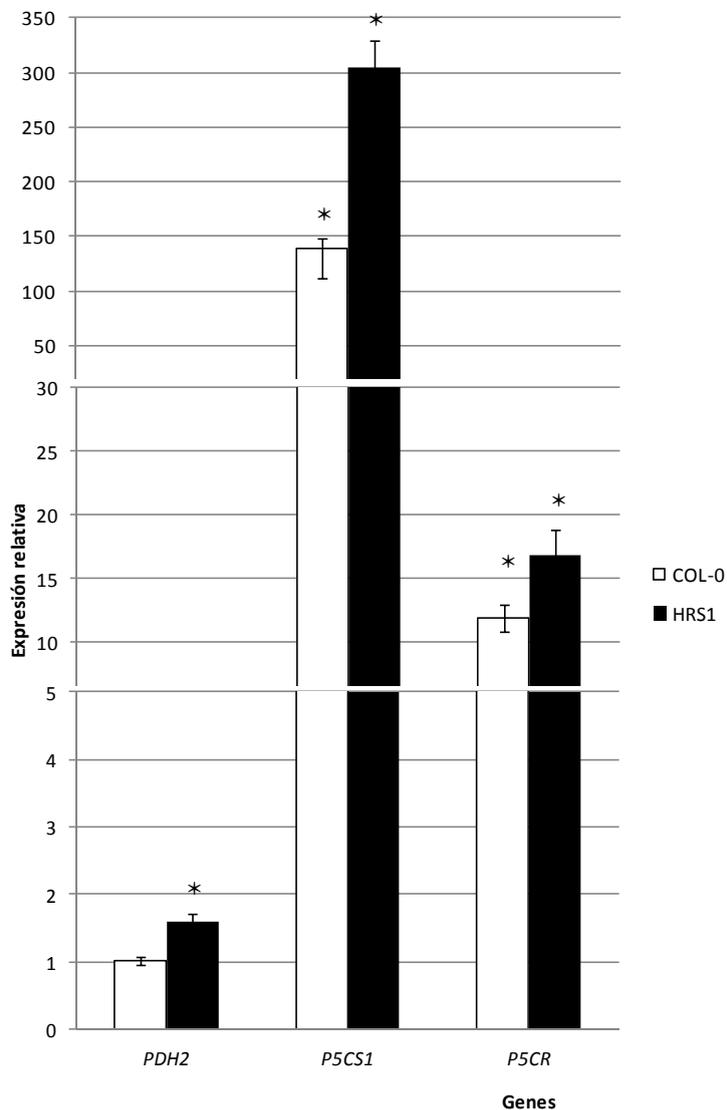


Figura 4.2.35. Comparación de los niveles de expresión de los genes de síntesis de prolina *P5CS1* y *P5CR*, respecto al nivel de expresión del gen de degradación de prolina *PDH2* en las líneas que expresan el gen *C:HRS1* bajo su propio promotor, y su control silvestre COL-0. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

4.2.11- Análisis transcriptómico de las plantas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propia región reguladora

Para poder identificar cual es la respuesta de la célula por la expresión del gen *CtHSR1* y sus posibles mecanismos para la tolerancia al estrés hídrico, se realizó un análisis transcriptómico comparando el genotipo silvestre y el genotipo *CtHSR1* en condiciones normales de desarrollo (líneas 14.3 y 22.2). Se realizaron 6 réplicas biológicas (3 con cada línea independiente), de las cuales se tomaron solo 5 para el procesamiento de los datos. Como primer resultado, se obtuvo una lista de 107 genes inducidos mediante la expresión del factor de transcripción *CtHSR1* (Anexo 4).

Una vez identificados aquellos genes cuya expresión se veía aumentada al expresar en la planta el factor de transcripción *CtHSR1*, se identificaron las categorías funcionales significativamente representadas a las que pertenecen dichos genes. Para ello, los 107 genes inducidos se clasificaron según la categorías establecidas por el catalogo funcional MIPS (del inglés, *Munich Information Center for Protein Sequences*), a través de la pagina web <http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb/>. De este modo, obtuvimos una visión global de la respuesta provocada por el factor *CtHSR1* en *arabidopsis*.

Como podemos observar en la Figura 4.2.36, muchas de las categorías esperadas como las derivadas de la transcripción mediada por este factor *CtHSR1*, categorías de modificación del ADN y localización nuclear propias de factores de transcripción, aparecieron sobrerrepresentadas. Además, categorías más específicas como las de interacción con el medio ambiente y la respuesta a estrés, reflejan posibles mecanismos de respuesta a este tipo de estímulos, mediados por la expresión del gen *CtHSR1*.

Asimismo, en las categorías propias de inducción de la transcripción (20% del total de genes inducidos), aparece un enriquecimiento en factores de transcripción inducibles mediante estrés, pertenecientes a las familias WRKY (por su dominio conservado WRKYGQK en el extremo amino terminal), ERF (del inglés, *Ethylene-Responsive Element Binding Factor*), la familia MYB (del primer gen aislado, del virus del mieloblastoma aviar), y bZIP (del inglés, *Basic Leucine Zipper*).

		CATEGORIA FUNCIONAL	p-valor
R11912664	R15946640		
R11914770	R15918020		
R11919970	R15915450	10	0.00427
R11912700	R15915050		
R11915260	R15926740	10.01.09.05	0.000529
R11918300	R15943200		
R11919120	R15944260		
R11915300	R15944900	11	0.00124
R1192550	R1594660		
R1192720	R15947160	11.02.03.04	0.000529
R1192770	R15947340		
R1192830	R15947340	11.02.03.04.03	0.00785
R1192830	R15947340		
R1192830	R1594630		
R11928370	R1594950	32	0.000529
R1192920	R15949790	32.01	0.00731
R1194910	R1595240		
R1194950	R1595440	32.05	0.0027
R11955450	R1596100		
R1195790	R15962070	34	0.00229
R1196100	R15962550		
R1196400	R15961250		
R1196610	R15965070	34.11	0.000985
R1196800	R15910910		
R1197250	R15915210	34.11.01	0.00324
R1197280	R1592430		
R11972910	R15924570	34.11.03	0.00268
R1197350	R15927410		
R1197450	R15927450	34.11.05	0.00426
R1197460	R1592970		
R1197840	R15935770	34.11.10	0.0099
R1198440	R15936040		
R1198400	R1593650	36	0.000529
R1198920	R15936050		
R1291500	R15937610	36.20	0.00189
R1291500	R1593630		
R1291700	R15911070	36.20.18	0.0027
R12917450	R15916370		
R1291870	R15919120	36.20.18.05	0.00324
R1292030	R1592020		
R1292570	R15922920	36.25	0.00524
R1292900	R15927420		
R1292830	R15937770	36.25.16	0.00442
R1292700	R1593920		
R1292800	R1594500	36.25.16.08	0.0027
R12929670	R15947220		
R12932150	R15947230	42	0.00582
R1293400	R15949450		
R1294000	R15950450	42.10	0.000529
R12941100	R15951190		
R12941100	R15956100	42.10.03	0.000529
R12941400	R1596000		
R12941400	R15960470		
R12941640	R15963160	70.10	0.00321
R12941130	R15965207		

Figura 4.2.36. Clasificación funcional de las categorías sobrerrepresentadas, como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor.

Por otro lado, aparece sobrerrepresentada la categoría de defensa frente al estrés (16% del total de genes inducidos), en la que aparece un enriquecimiento en genes como el *ERD15* y *RD26*, de respuesta frente a la deshidratación.

La validación de los datos obtenidos en el análisis se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real de alguno de los genes inducidos. Como se puede observar en la Figura 4.2.37, la inducción de la expresión para los genes seleccionados va desde 1,3 veces para el gen *WRKY26*, hasta 4,5 veces para el gen *DIN6*. Aunque se trata de niveles de inducción moderados, ya que en el análisis transcriptómico no aparecían inducciones superiores a 4 veces comparado con el control silvestre, parecen ser suficiente para desencadenar en la planta una respuesta efectiva frente a la tolerancia al estrés hídrico en arábidopsis.

Así, el factor de transcripción bZIP1, que aparece en la literatura como regulador positivo de la tolerancia a la salinidad, calor y sequía, es inducido dos veces

en las líneas sobreexpresoras del gen *CtHSR1* respecto a la línea silvestre (Figura 4.2.37).

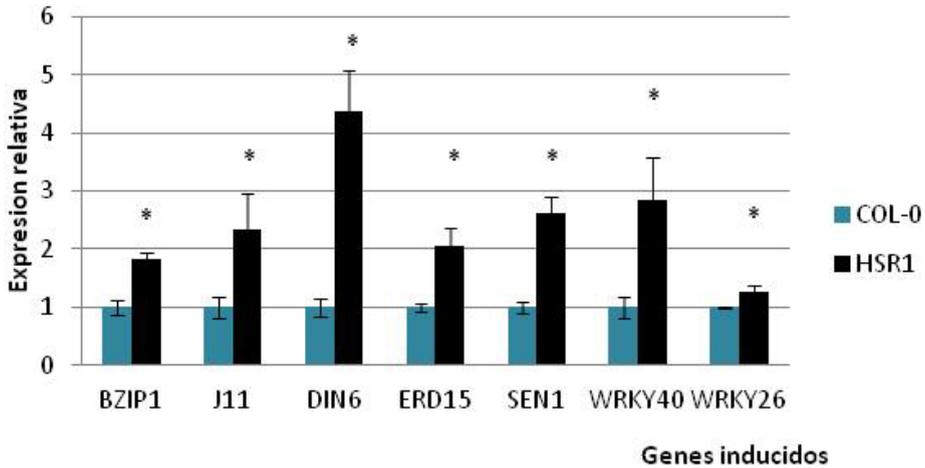


Figura 4.2.37. Validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real de algunos genes inducidos mediante el análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor. Cada valor representa la media \pm SE de 3 replicas técnicas y 3 biológicas. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

En base a estos resultados, se realizó una comparación de la respuesta transcripcional obtenida mediante la expresión del gen *CtHSR1* de candida, con las respuestas frente a diferentes tipos de estreses (osmótico, oxidativo y térmico). Para ello, se emplearon datos de micromatrices disponibles en la base de datos NASCArrays (<http://affymetris.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl>), de plantas tratadas durante tres horas con manitol 300mM, con metil viológeno 10 μ M y bajo 38°C de temperatura, respectivamente.

Mediante este análisis pudimos observar que, en el tratamiento con manitol 300mM durante 3 horas, se inducía el 40% de los genes que se inducen mediante la expresión del factor de transcripción *CtHSR1* (Anexo 5), por lo que la respuesta mediada por este factor en condiciones normales coincide en gran parte con la respuesta inducida a través del estrés osmótico en arabidopsis. Además, un 13% de los

genes inducidos por el factor CtHSR1 se reprime bajo condiciones de estrés osmótico (Anexo 5), por lo que estos no podrían ser candidatos en la tolerancia de nuestras plantas al estrés hídrico (Figura 4.2.38). Por lo tanto, la tolerancia a la sequía mostrada por las plantas que expresan el factor de transcripción CtHSR1, es mediada a través de una respuesta transcripcional con elevada homología con la respuesta desencadenada bajo estrés osmótico.

Al comparar los datos transcripcionales derivados del tratamiento con metil viologeno 10µM, pudimos comprobar que en este caso, solo un 1% de la respuesta mediada a través de la expresión del gen *CtHSR1* coincide con la respuesta inducida por estrés oxidativo (Anexo 6).

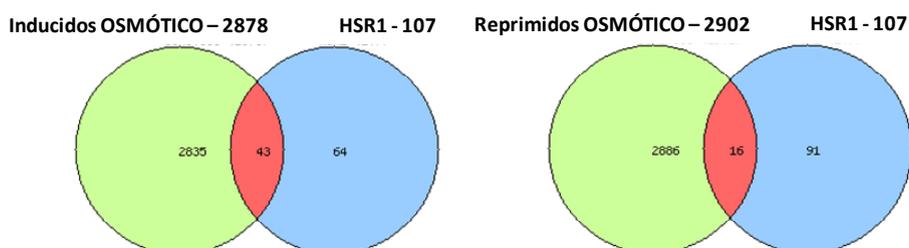


Figura 4.2.38. Comparación mediante diagramas de Venn de los genes inducidos, obtenidos como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, con los genes inducidos y reprimidos bajo tratamiento osmótico, inducido

Al mismo tiempo, solo un 3,7% de los genes inducidos en las plantas que expresan el gen *CtHSR1* se reprimen bajo este tipo de estrés (Anexo 6), por lo que se puede interpretar que la respuesta mediada por la expresión del factor de transcripción de candida, no posee ninguna homología con la respuesta a estrés oxidativo (Figura 4.2.39).

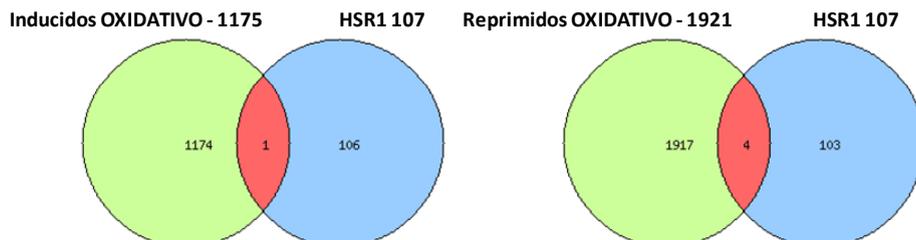


Figura 4.2.39. Comparación mediante diagramas de Venn de los genes inducidos, obtenidos como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, con los genes inducidos y reprimidos, bajo tratamiento oxidativo inducido por metil viologeno 10µM durante 3h.

Ya que el gen objeto de estudio es un factor de transcripción, con elevada similitud a factores de transcripción inducidos por choque térmico, se realizó también la comparación de los datos obtenidos en nuestras micromatrices con la respuesta transcripcional mediada por tratamiento con calor durante 3 horas a 38°C. Como se puede observar en la Figura 4.2.40, un 20% de los genes inducidos en las plantas que expresan el factor de transcripción CtHSR1, son inducidos bajo tratamiento con calor. El mismo porcentaje de genes resultó de la comparación entre los genes reprimidos por calor, y los inducidos por el factor CtHSR1. De esta forma podemos deducir que la respuesta mediada por el factor de transcripción de *Candida* posee cierta homología con la respuesta transcripcional medida por estrés térmico (Anexo 7).

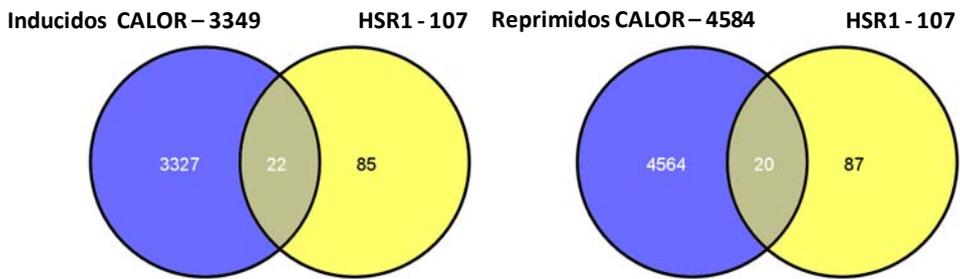


Figura 4.2.40. Comparación mediante diagramas de Venn de los genes inducidos, obtenidos como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, con los genes inducidos y reprimidos, bajo tratamiento con calor inducidos durante 3h a 38°C.

Analizando los genes solapantes entre los diferentes tratamientos respecto a los resultados obtenidos en nuestro experimento, encontramos que un 12% de los genes inducidos por el CtHSR1 se inducen bajo estrés osmótico y térmico (Anexo 8). De igual forma, encontramos que 5 de los genes obtenidos en nuestro análisis transcriptómico son reprimidos bajo tratamientos de estrés térmico y osmótico, y 1 solo gen es reprimido bajo los tres tipos de estreses (calor, osmótico y oxidativo), mientras que se induce mediante la expresión del gen *CtHSR1* (Figura 4.2.41; Anexo 8).

Observando la implicación de los genes pertenecientes a la familia WRKY en la respuesta mediada a través del factor de transcripción CtHSR1 en *Arabidopsis*, quisimos comprobar si la respuesta provocada por la ganancia o pérdida de función de

alguno de estos genes (WRKY) tenía similitudes con la respuesta mediada a través del *CtHSR1*.

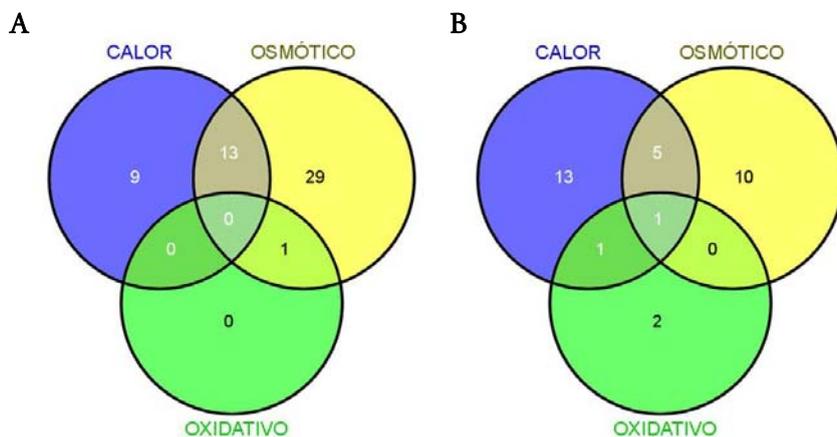


Figura 4.2.41. Comparación mediante diagramas de Venn de los genes inducidos, obtenidos como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, con los genes inducidos (A) y reprimidos (B), bajo tratamiento con calor, osmótico y oxidativo, inducidos mediante los tratamientos anteriormente indicados.

En el artículo publicado por Rainer y colaboradores (2012), realizaron un análisis transcriptómico mediante micromatrices de ADN en mutantes de pérdida de función del gen *WRKY33*, en condiciones normales y tras la infección con *Botrytis cinerea*. Así, descubrieron la implicación de este gen en la regulación hormonal y metabólica de la respuesta vegetal frente a este patógeno.

Gracias a este trabajo pudimos observar que en condiciones normales, la pérdida de función de *WRKY33* provoca la inducción de 784 genes. Tras realizar una comparación de estos genes con los 107 inducidos a través del *CtHSR1* en arábidopsis, comprobamos que el 52% de los genes que se inducen al expresar de forma heteróloga el gen *CtHSR1* en arábidopsis, se inducen también mediante la pérdida de función del gen *WRKY33* (Figura 4.2.42; Anexo 9).

Mediante un análisis de los motivos presentes en los promotores de los 107 genes inducidos por *CtHSR1*, pudimos comprobar que existe un enriquecimiento en el motivo TGAC (caja WRKY) de un 68% en comparación con el 48% presente en el genoma de arábidopsis.

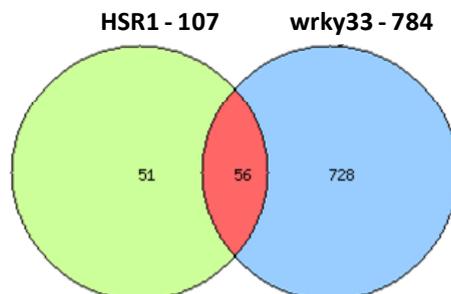


Figura 4.2.42. Comparación mediante diagrama de Venn de los genes inducidos, obtenidos como resultado del análisis transcriptómico de las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, con los genes inducidos mediante la pérdida de función del gen *WRKY33*, en *Arabidopsis*.

Por último analizamos también mutantes de pérdida de función de *WRKY33*, mediante la medición de diferentes parámetros fotosintéticos. Tal y como observamos en la Tabla 4.2.3, el genotipo de pérdida de función del gen *WRKY33* posee una significativa menor apertura estomática (g_s) y una menor tasa de transpiración (E) que el control silvestre.

Tabla 4.2.3. Valores de tasa de fijación neta de CO₂ (A_n , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conductividad estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tasa de transpiración (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y eficiencia cuántica efectiva del PSII (PhiPS2) en mutantes de pérdida de función del gen *WRKY33* en *Arabidopsis thaliana* y su control silvestre COL-0. Cada valor es media de 10 determinaciones en plantas diferentes \pm SE. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Genotipo	A_n	g_s	E	PhiPS2
COL-0	$8,6 \pm 0,25$	$0,22 \pm 0,01$	$5,7 \pm 0,25$	$0,227 \pm 0,01$
<i>wrky33</i>	$6,4 \pm 0,2$ *	$0,19 \pm 0,01$ *	$4,7 \pm 0,15$ *	$0,187 \pm 0$ *

De este modo, podemos sugerir que el gen *WRKY33* puede estar involucrado en la tolerancia frente al estrés abiótico en *Arabidopsis*. Para confirmarlo, harán falta más experimentos con tal de elucidar cual puede ser el mecanismo empleado.

4.2.12- Rastreo de doble híbrido en levadura para la identificación de interactores del factor de transcripción *CtHSR1* en arabisidopsis

La proteína CtHSR1 podría ejercer sus efectos en arabisidopsis interaccionando con otras proteínas de la planta, por lo que se realizó un rastreo de doble híbrido para identificar posibles interactores. Para la realización del experimento, en primer lugar se procedió a la transformación de la cepa AH109 de levadura con el plásmido pGBKT7, conteniendo la secuencia codificante del gen *CtHSR1*. Algunas de las colonias obtenidas, fueron analizadas mediante western blot, para confirmar la correcta expresión de nuestra proteína antes de realizar el rastreo. Como se observa en la Figura 4.2.43, el control del plásmido vacío muestra que el epitopo myc, empleado para la visualización de nuestra proteína mediante western blot, migra en el gel de acrilamida con un peso molecular en torno a 25kDa. Los clones 1 y 6 muestran una banda en torno a 120kDa, mientras que el clon 4 muestra una banda en torno a 35kDa. La proteína CtHSR1 posee un peso molecular de 75kDa, que sumado a los 25kDa del epitopo formarían una fusión proteica de alrededor de 100kDa. De esta forma, podemos deducir que los clones 1 y 6 eran capaces de expresar de forma correcta la proteína CtHSR1, cuya banda aparece en torno a los 120kDa, mientras que el clon 4 estaría expresando una forma truncada de la proteína CtHSR1, o esta proteína estaría siendo degradada mediante procesos de regulación post-traducciona.

Una vez confirmada la correcta expresión del factor de transcripción en la cepa AH109 de levadura, procedimos a la preparación de células competentes del clon 1 para realizar el rastreo, tal y como se describe en el Apartado 3.8.1 de Materiales y Métodos. Se rastrearon un total de 200000 colonias, de las cuales solo apareció un clon putativo para la interacción proteína-proteína entre el factor CtHSR1 y la proteína codificada en la genoteca de arabisidopsis.

La Figura 4.2.44, muestra el crecimiento en medio YPDA (control positivo de crecimiento), SD sin aminoácidos (control negativo de crecimiento), SD-2 (medio de selección para los plásmidos pGBKT7 y pACT2) y SD-4 (medio de selección de la interacción). Como podemos observar, el clon DH41 aislado en el rastreo de doble híbrido, es capaz de crecer en medio SD-4 (sin leucina, triptófano, histidina y adenina, ya que mediante la interacción proteína-proteína la célula es capaz de sintetizarlos).

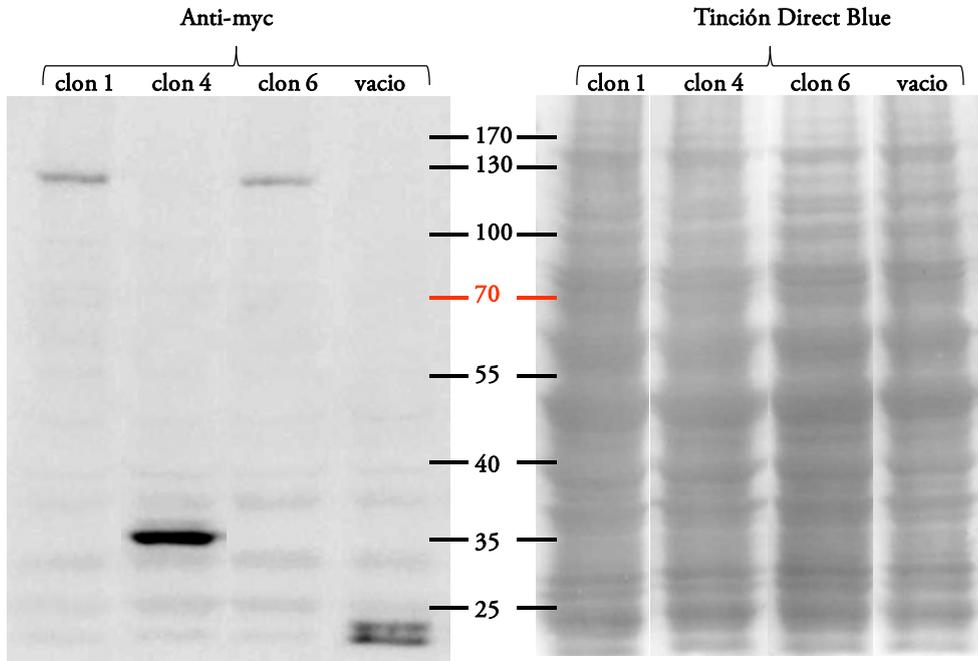


Figura 4.2.43. Western blot para las colonias de la cepa AH109 que expresan el gen *CtHSR1*, mediante incubación con anticuerpos específicos para el epitopo myc. Se muestra también la tinción con Direct Blue, correspondiente con el control de carga.

Sin embargo, los controles en los que no es posible la interacción no son capaces de crecer en SD-4.

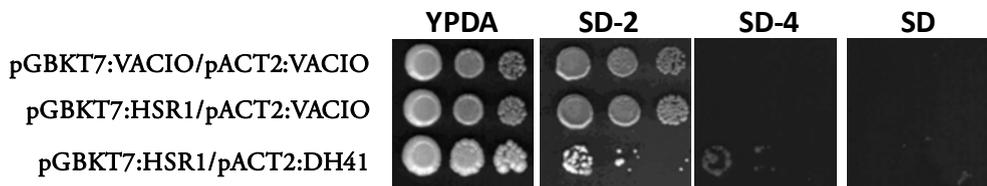


Figura 4.2.44. Ensayo de crecimiento en medio SD sólido selectivo de las líneas control y el clon DH41 obtenido mediante el rastreo de doble híbrido en levadura. SD-2: Medio sólido SD sin leucina y triptófano. SD-3: Medio sólido SD sin leucina, triptófano e histidina. SD-4: Medio SD sólido sin leucina, triptófano, histidina y adenina.

Una vez aislado el clon DH41, procedimos a la extracción de su plásmido para secuenciar el fragmento clonado que codifica la proteína capaz de interactuar con el factor CtHSR1. Además, también procedimos con la realización de un ensayo de doble híbrido entre el plásmido recuperado, y nuestra construcción pGBKT7-*CtHSR1*, para confirmar que la interacción era real y no fruto de la elevada selección en el rastreo (lo que se denominan falsos positivos). La secuenciación, reveló que el posible interactor con el factor CtHSR1 era la proteína codificada por el gen At1g33680, que codifica una proteína de unión a ARN y a ADN de simple cadena. Se trata de una proteína de 763 aminoácidos, cuyo peso molecular es de 80 KDa. Según la base de datos de SMART (del inglés, *Simple Modular Architecture Research Tool*; http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.pl) posee dos dominios KH capaces de unir moléculas de ARN y ADN de simple cadena, y estrechamente ligado a procesos de regulación transcripcional y traduccional (Figura 4.2.45).

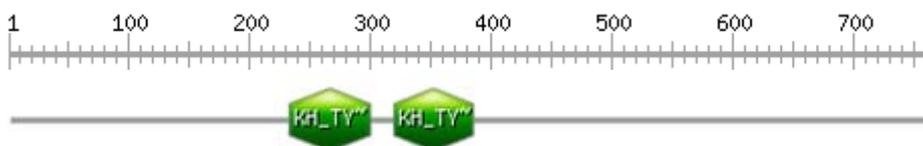


Figura 4.2.45. Estructura de los dominios proteicos presentes en la proteína de 763 aminoácidos codificada por el gen At1g33680 de arabisidopsis, según la base de datos de PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>).

El ensayo de doble híbrido dirigido entre el clon DH41 y el factor de transcripción CtHSR1, resultó positivo tal y como muestra la Figura 4.2.46. Las células transformadas con el plásmido rescatado del DH41 y con el plásmido pGBKT7 vacío, fueron incapaces de crecer en medio sin histidina y sin adenina, por lo que la activación transcripcional responsable del crecimiento en SD-4 es específica de la interacción. Finalmente, aunque no podemos confirmar con total certeza la interacción del factor CtHSR1 con la proteína codificada por el gen At1g33680, puesto que serían necesarios más ensayos de interacción proteína-proteína *in vivo*, este gen y sus mutantes de pérdida y ganancia de función, son buenos candidatos para el estudio de la respuesta frente al estrés hídrico en arabisidopsis.

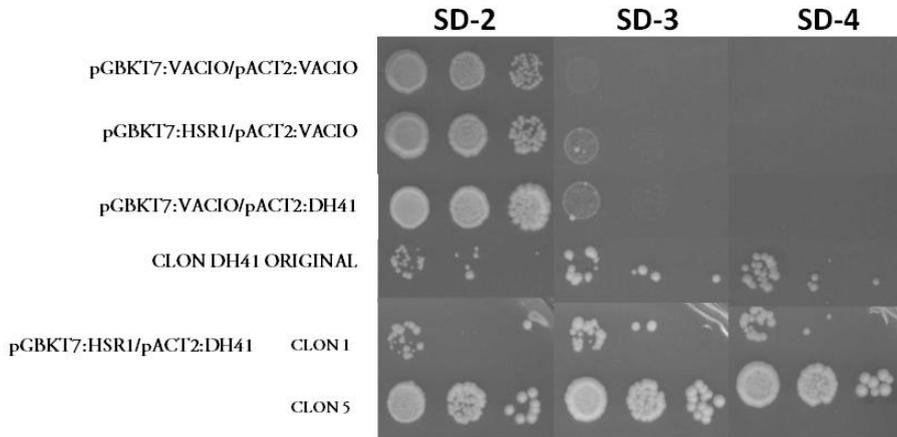


Figura 4.2.46. Ensayo de crecimiento en medio sólido, de las líneas control y el clon DH41 obtenido mediante el rastreo de doble híbrido y el ensayo de doble híbrido dirigido con el clon DH41 en levadura. SD-2: Medio sólido SD sin leucina y triptófano. SD-3: Medio sólido SD sin leucina, triptófano e histidina. SD-4: Medio SD sólido sin leucina, triptófano, histidina y adenina.

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

5.1- El rastreo de mutantes

Los abordajes de genética directa, mediante el rastreo de colecciones de mutantes generadas por inserción de T-DNA, han quedado ampliamente validados para el estudio de los componentes genéticos y la asignación de funciones génicas para diferentes procesos bioquímicos y de señalización en *arabidopsis*. El rastreo realizado en esta tesis doctoral se ha realizado en el estadio de germinación y establecimiento de plántula, ya que esta técnica permite el uso de cientos de miles de semillas en muy poco espacio. Esta decisión puede ser criticada, ya que existen claras diferencias en el desarrollo vegetal durante la germinación y establecimiento de las plántulas en comparación con estadios posteriores, por lo que fenotipos observados en germinación, podrían no mantenerse en la planta adulta.

En nuestro caso, hemos obtenido líneas mutantes que presentan un porcentaje de germinación hasta del 80% para la colección de Weigel. Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Alejandro y colaboradores (2007), donde se emplea la misma colección de mutantes, pero se obtienen porcentajes de germinación del 60% aproximadamente (porcentaje descrito para el mutante *par1-1D*). En esta tesis se han empleado colecciones de mutantes de pérdida y ganancia de función. Las colecciones de pérdida de función poseen algunas limitaciones, como puede ser una mayor dificultad en la obtención de mutantes en determinados genes, ya que puede existir redundancia génica como se ha observado en los genomas actualmente secuenciados, donde existen numerosos genes duplicados. Además, la pérdida de función de genes esenciales para el desarrollo vegetal causa letalidad en el embrión, los gametofitos o en la planta, por lo que su aislamiento en rastreos es prácticamente imposible. De esta forma, las colecciones de mutantes de ganancia de función poseen ventajas al resolver algunos de estos problemas. Estas colecciones se obtienen mediante inserción en el T-DNA de un activador transcripcional, capaz de inducir la transcripción de genes cercanos a la inserción. Otra forma de obtener mutantes de ganancia de función, sería la inclusión de promotores fuertes en el T-DNA, aunque al poseer caja TATA propia, limitaría la inducción al gen más cercano.

El objetivo del rastreo realizado en esta tesis era la identificación de mutantes tolerantes a estrés abiótico, y más concretamente al estrés producido por cationes tóxicos. Para llevarlo a cabo, se ha empleado la noespermidina, una policación que resulta tóxico a concentraciones muy bajas (<6mM) sin aportar efecto osmótico. Hasta el momento, en la mayoría de rastreos realizados en busca de mutantes tolerantes a cationes tóxicos se ha empleado NaCl como agente selectivo, pero la elevada concentración utilizada de entre 150 y 250mM, resultó en la identificación de genes involucrados en la síntesis o señalización del ABA, y no al efecto tóxico del catión Na^+ (Quesada y col., 2000; González-Guzmán y col., 2002; González-Guzmán y col., 2004; Ruggiero y col., 2004), por lo que el uso de esta policación, permitirá evitar el efecto osmótico generado por las altas concentraciones empleadas. Además, su utilización en mutantes del transporte de potasio en levadura, provocó cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática (Forment y col., 2002).

En esta tesis doctoral, a diferencia de los rastreos realizados hasta el momento, se han empleado numerosas colecciones de mutantes (Somerville y Scheible; Weigel; INRA-Versailles y Feldmann), y se han podido aislar un total de 30 mutantes tolerantes a la poliamina noespermidina. Este número de mutantes supone un 0,0027% de individuos seleccionados respecto al total de líneas empleadas (109972 líneas). Aunque parece un número muy bajo de mutantes, en otros rastreos a gran escala realizados para otros objetivos, como por ejemplo el llevado a cabo por Bueso y colaboradores (2014), se rastrearon 30000 líneas, y se obtuvieron 3 mutantes confirmados, lo que supone un 0,01% sobre el total de líneas empleadas. Este resultado bajo es debido a que la mayoría de individuos seleccionados en el rastreo primario, no mantuvieron la tolerancia a noespermidina en el rastreo secundario. Esto puede ser debido a la mala calidad de las semillas de las colecciones empleadas, o a la elevada concentración de noespermidina empleada (entre 5 y 6mM), ya que en el rastreo realizado por Alejandro y colaboradores (2007), se empleó una concentración de noespermidina de 3,2mM. Estos autores rastrearon un total de 16398 líneas pertenecientes a la colección de Weigel y aislaron 8 mutantes tolerantes a noespermidina de los cuales solo 4 mostraban inserción de T-DNA, con múltiples inserciones. Finalmente, se identificó el gen *QSO2* (quiescina sulfidril oxidasa), involucrado en la carga de K^+ al xilema, y causando de este modo un aumento de potencial de membrana en la interfase simplasto:xilema, lo que provoca una menor entrada de cationes tóxicos al xilema y con ello una menor traslocación a la parte aérea.

Como se ha observado, los análisis mediante Southern blot de los mutantes seleccionados para cada una de las colecciones empleadas revelan numerosas diferencias en cuanto al número de inserciones. Esto puede ser debido al proceso de transformación de los distintos fondos genéticos. De esta forma, para las colecciones de Somerville y Weigel transformadas con el T-DNA conteniendo un activador transcripcional, los 6 mutantes con varias inserciones podrían tener hasta 20 genes afectados por esta activación, mientras que para las colecciones de Feldmann e INRA-Versailles, al tratarse simplemente de disrupción génica mediante inserción del T-DNA, el número de genes afectados es mucho menor.

Para la identificación de los genes afectados en nuestra selección de mutantes, se deben realizar diversos análisis, como el análisis de cosegregación. Este ensayo permite conocer si existe correlación entre el fenotipo de resistencia a norespermidina y la inserción de T-DNA presente en el genoma. Para ello se seleccionan, de la población F₂ del cruce entre el mutante y el control silvestre, plantas resistentes al medio MS pH 5,7 suplementado con 4 mM de NE, en un ensayo de aparición de cotiledones, se extrae el ADN genómico de cada plántula individualmente y se realiza una PCR, para determinar la presencia o ausencia del T-DNA. Si el fenotipo de resistencia está ligado a la inserción de T-DNA, cualquier plántula seleccionada por tolerar norespermidina presentará el T-DNA. Si el fenotipo se debe a cualquier otra mutación, tan sólo un 75% de las plántulas presentaran el T-DNA en su genoma. De forma paralela, se realiza un análisis Southern blot para conocer las inserciones de cada uno de los cruces realizados y poder relacionarlas con su fenotipo de tolerancia a NE.

Una vez comprobado, se deberá identificar la región genómica en la que se ha insertado en T-DNA, y cuál es el gen o genes afectados, tanto por sobreexpresión o por pérdida de función, para determinar el mecanismo celular de tolerancia a NE. La técnica del rescate plasmídico válida para todas las colecciones empleadas excepto para la colección de INRA-Versailles, consiste en digerir el ADN genómico del mutante con una enzima de restricción y circularizar todos los fragmentos, siendo únicamente capaz de transformar y replicarse en *E. coli* el ADN circularizado que presente el plásmido pBluescriptKS presente en el T-DNA. Este ADN circularizado contiene la región genómica flanqueante a la inserción del T-DNA, que es posible secuenciar utilizando cebadores específicos del T-DNA. Sin embargo, para la colección de INRA-

Versailles esto se logra mediante la TAIL-PCR. Esta técnica se basa principalmente en el uso de tres cebadores específicos, en tres reacciones consecutivas, junto con un cebador degenerado el cual posee una temperatura de anillamiento baja.

Gracias a estas diferencias en las temperaturas de hibridación, se puede controlar la frecuencia de amplificación en sitios específicos e inespecíficos, amplificando finalmente un fragmento de T-DNA y el fragmento genómico contiguo.

De este modo, el abordaje realizado para la identificación de nuevas funciones génicas mediante el rastreo de colecciones de mutantes, es una opción ampliamente validada que permite la atribución de nuevas funciones a proteínas y genes hasta el momento desconocidos.

5.2- Expresión heteróloga del gen *CtHSR1* en arabisidopsis

El abordaje realizado mediante la expresión del gen *CtHSR1* en arabisidopsis, ha permitido dilucidar uno de los posibles mecanismos genéticos mediante el cual las plantas de arabisidopsis, son capaces de tolerar episodios de sequía. Como se ha comentado en la Introducción, este gen fue aislado durante un rastreo de una genoteca creada a partir de la cepa NCYC2512 de *Candida tropicalis*, para la identificación de genes de halotolerancia en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Ali y col., 2001). Esta cepa fue aislada en suelos salinos de Pakistan, en una búsqueda de microorganismos halotolerantes realizada durante la elaboración del trabajo publicado por Rodriguez y colaboradores (1996).

Mediante un análisis *in silico* pudimos determinar que en arabisidopsis existen dos posibles genes ortólogos al *CtHSR1*, ya que poseen elevada homología al dominio de unión al ADN del factor de transcripción de candida, y carecen al igual que *CtHSR1* del dominio de trimerización. Mediante ensayos de germinación y análisis de parámetros fotosintéticos, pudimos situar el gen *At4g18870* como firme candidato ortólogo al gen *CtHSR1* en arabisidopsis.

En esta tesis doctoral también se aportan nuevos datos sobre el patrón de expresión tisular del gen de candida, a través de la realización de numerosos ensayos histoquímicos GUS realizados en diferentes estadios del desarrollo. Los resultados han mostrado un patrón de expresión característico tanto en plántulas de 7 días como en plantas adultas en tejido vascular de cotiledones, hojas, hipocotilos, raíces y órganos

florales (Figura 4.2.5 y 4.2.6). Además, las puntas de las raíces no mostraban señal GUS tras los ensayos, ya que en estas zonas aun no existe tejido vascular diferenciado.

El gen *CtHSRI* se expresa por tanto fundamentalmente en tejido vascular, y más concretamente en células del floema, hecho que pudo ser comprobado mediante ensayos histoquímicos GUS en secciones transversales de tallo y cortes histológicos de hipocotilo (Figura 4.2.7, 4.2.8 y 4.2.9). El análisis bioinformático de la secuencia del promotor de *Candida* mediante la aplicación web <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> reveló la presencia de regiones consenso de motivos implicados en la respuesta frente al estrés térmico como el AAAAAATTTTC, motivos de unión de proteínas MYB como el TAACTG y motivos implicados en defensa y en respuesta frente a estrés como el ATTTTCTTCA. Además, según Yanhai y colaboradores (1997), existen motivos específicos de floema como el GATA (AnnnGATA), la caja ASL (GCAn(8-15)GCA) y la caja II (CCCC), presentes todos ellos en el promotor de 3000 pares de bases del gen *CtHSRI*.

La expresión del gen reportero *GUS* pudo ser cuantificada mediante ensayos de hidrólisis de MUG, sustrato de la beta-glucuronidasa. De esta forma, pudimos comprobar que el promotor de 3000 pares de bases del gen *CtHSRI*, fue capaz de inducir la expresión de *GUS* bajo tratamiento con manitol, lo que implica una posible respuesta del promotor de *Candida* frente al estrés osmótico (Figura 4.2.10).

También se ha conseguido observar el factor de transcripción de *Candida* fusionado a la proteína verde fluorescente. Esta fusión proteica fue localizada en núcleos de células epidérmicas de *Nicotiana benthamiana*, bajo el control del promotor constitutivo *35S*, y confirmada mediante tinción con DAPI (Figura 4.2.11).

5.2.1- Tolerancia a la sequía

La estrategia desarrollada en esta tesis doctoral para la correcta evaluación del efecto de la expresión del gen *CtHSRI* en la tolerancia al estrés abiótico en *Arabidopsis*, fue la expresión de dicho gen bajo diferentes promotores. Se empleó su propia región reguladora proveniente de *Candida tropicalis* de 3000 pares de bases, el promotor del gen *ubiquitina10* y el promotor constitutivo *35S*. Mediante las líneas que expresan el gen *CtHSRI* bajo el promotor *35S*, no se pudo observar tolerancia a NaCl y manitol en estadios de germinación, ni tolerancia a la sequía en planta adulta.

En las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo el promotor de ubiquitina tampoco se observó tolerancia a NaCl y manitol en estadios de germinación, pero 3 de las líneas analizadas mostraron tolerancia a la sequía en planta adulta. Sin embargo, las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor presentan tolerancia a manitol en estadios de germinación, y tolerancia a la sequía en planta adulta. Por este motivo, se decidió continuar con los experimentos sobre las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propia región reguladora. La expresión de este factor de transcripción produce en arabidopsis una mayor tolerancia a la sequía, inducida mediante la ausencia de riego durante 14 días (Figura 4.2.13). Como se observa en los datos de peso fresco en condiciones control extraídos de estos tratamientos, las plantas que expresan en gen *CtHSR1* poseen un menor crecimiento que las plantas control (reducción del 20%). Esto podría deberse a la activación en condiciones normales de sistemas de defensa contra episodios de estrés. De esta forma, la planta ve penalizado modestamente su crecimiento, siendo capaz de alcanzar su estado adulto sin problemas. Además, esta pequeña reducción en el crecimiento se observa también en los datos de peso seco en condiciones control (regadas de forma continuada con solución nutritiva). Así, tanto las líneas *CtHSR1* como el control silvestre en condiciones de riego constante, poseen una cantidad de agua por unidad de peso seco de 9,81 y 9,44 respectivamente (gr de H₂O/gr peso seco). De igual forma, de los datos extraídos de los tratamientos de sequía (Figura 4.2.13), podemos observar que esta penalización en el crecimiento permite a las líneas *CtHSR1* conservar mejor el contenido hídrico vegetal, e incluso continuar con su desarrollo, ya que el peso seco de las líneas transgénicas aunque sigue siendo algo menor que la línea silvestre, esta diferencia es menor que la observada durante el tratamiento control. Así, en condiciones de sequía las líneas transgénicas retienen el doble de cantidad de agua por unidad de peso seco que la línea silvestre, siendo de 4,04 para las líneas *CtHSR1* y de 2,35 para la línea control (gr de H₂O/gr peso seco).

5.2.2- Respuesta hormonal

El ácido abscísico es la principal hormona vegetal involucrada en la señalización del estrés abiótico. Por ello, una de nuestras primeras hipótesis para la tolerancia a la sequía en las líneas *CtHSR1* fue la alteración en la respuesta a esta hormona.

Tal y como hemos observado en el Apartado 4.2.6, la expresión del gen *CtHSR1* no posee ningún efecto en estadios de germinación durante tratamientos con ABA, ya que tanto nuestras líneas transgénicas como las plantas control, son capaces de germinar y desarrollar cotiledones verdes expandidos de forma similar (Figura 4.2.21). También, esta respuesta fue probada en estadios más avanzados del desarrollo, y tal y como muestra la Figura 4.2.22 ambos genotipos (línea silvestre y líneas *CtHSR1*) mostraban la misma inhibición mediada por ABA durante su desarrollo.

Mediante el servicio de medición de hormonas del IBMCP nos dispusimos a medir en nuestras líneas sobreexpresoras del gen *CtHSR1* y en la línea silvestre COL-0 el contenido total en ácido abscísico, ácido jasmónico y ácido indolacético. Como se observa en las Figuras 4.2.25 y como cabía esperar según la respuesta observada en estadios de germinación y desarrollo, no aparecieron diferencias significativas en el contenido total de ácido abscísico en las líneas *CtHSR1* respecto a su control silvestre. Sin embargo, existe una mayor acumulación en ácido indolacético y ácido jasmónico en las líneas transgénicas *CtHSR1* respecto al control (Figuras 4.2.26 y 4.2.27).

El ácido jasmónico o jasmonato es una hormona lipídica derivada de las oxilipinas, que es necesaria para la regulación de numerosos procesos fisiológicos del crecimiento vegetal, desarrollo y defensa frente a condiciones adversas, como el ataque de patógenos, daño mecánico, exposición al ozono y déficit hídrico (Devoto y col., 2005; Browse y Howe, 2008). En experimentos de micromatrices de ADN realizados por diferentes autores, se han identificado los factores de transcripción MYC2 y MYB2, como inductores de la expresión de genes de respuesta a ácido abscísico y ácido jasmónico. Así, se obtuvieron plantas sobreexpresoras de estos factores de transcripción, y los resultados mostraron que eran tolerantes frente al estrés osmótico (Abebe y col., 2003; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Además, el factor de transcripción RD26 parece inducirse en respuesta a sequía, salinidad, ABA y jasmónico, por lo que muchos genes de respuesta a esta hormona lipídica son dianas directas de este factor de transcripción (Fujita y col., 2004). Por lo tanto, es interesante destacar que la acumulación de ácido jasmónico podría mediar en la respuesta de las líneas *CtHSR1* frente al estrés hídrico (Figura 5.1).

Por último, diferentes grupos de investigación han demostrado que el ácido indolacético, otra hormona vegetal involucrada en el desarrollo vegetal, es capaz de inducir la expresión de genes de degradación de ácido jasmónico. Además, la

señalización por ácido jasmónico participa en la regulación de la homeostasis de auxinas, induciendo su expresión (Grunewald y col., 2009). Puesto que las auxinas son pequeñas moléculas nucleares de vida corta, que dimerizan con factores de transcripción de respuesta a auxinas, la degradación de éstas por el proteasoma promueve la acción de dichos factores de transcripción en la inducción de genes (Ulmasov y col., 1999). Así, el mayor contenido en ácido indolacético observado en las líneas CtHSR1 puede ser provocado por la acumulación de jasmonatos, permitiendo a su vez la activación de genes de degradación de esta hormona vegetal.

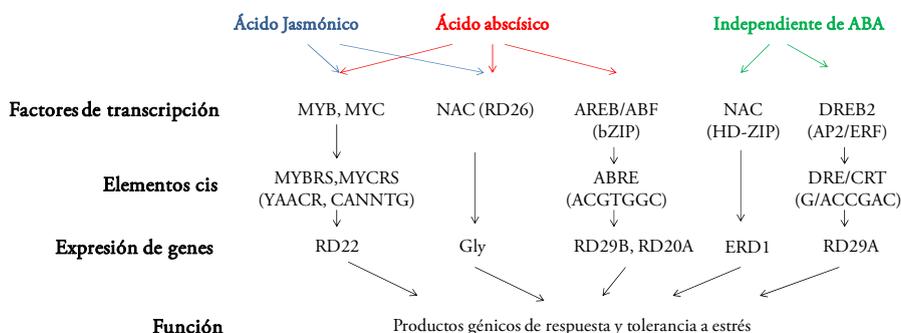


Figura 5.1. Vías de señalización mediadas a través de ácido jasmónico y ácido abscísico. Extraído y adaptado de Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007

5.2.3- Apertura estomática

La respuesta a ácido abscísico de las líneas que expresan el factor CtHSR1 también fue probada mediante el cierre estomático. Como se ha observado en la Figura 4.2.23, el cierre estomático mediado por ABA fue muy similar en las líneas transgénicas y en su control silvestre. Sin embargo, se observó que en condiciones normales las líneas CtHSR1 mostraban una menor apertura estomática que su control silvestre, aproximadamente del 13,5% medida como la relación entre la anchura de la apertura del ostiolo dividido por la longitud del mismo.

Esta menor apertura también fue observada en unas mediciones de diferentes parámetros fotosintéticos con el aparato LICOR LI6400 (Tabla 4.2.2), por lo que podría ser uno de los mecanismos en la tolerancia frente al estrés hídrico mediados a través del gen *CtHSR1*, ya que no existen diferencias significativas entre la densidad

estomática y el tamaño medio por estoma en las líneas que expresan el transgén y la línea control. Este misma respuesta se ha observado en mutantes de pérdida de función del gen *AtCPK23*, y mutantes de sobreexpresión de los genes *AtNCED3* y *VfPIP1*, que resultaron en una menor apertura estomática y una mayor tolerancia al estrés hídrico (Iuchi y col., 2001; Shu-Ying y Wei-Hua, 2007; Xiang-Huan y col., 2008).

El cierre estomático es uno de los procesos más importantes para la conservación del contenido hídrico vegetal, ya que una menor apertura estomática asegura una menor tasa de transpiración. Este proceso, es controlado hormonalmente a través del ABA y los jasmonatos, que como hemos visto son hormonas capaces de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno, mediando así la entrada de calcio y la salida de aniones en las células guarda, provocando el cierre del ostiolo (Suhita y col., 2004; Torres y Dangel, 2005; Zhang y col., 2006; Munemasa y col., 2007).

Por lo tanto, parece ser que la menor apertura estomática en las plantas que expresan el gen *CtHSR1* respecto a la línea control, es mediada a través de la señalización por ácido jasmónico, hormona inducida mediante el factor de transcripción de *Candida tropicalis*.

5.2.4- Balance hídrico y ajuste osmótico

En condiciones de sequía, donde la disponibilidad de agua es escasa, mantener el balance hídrico es indispensable para garantizar la supervivencia. Este balance viene dado por múltiples variables como son el potencial hídrico, el potencial osmótico y el contenido hídrico relativo. Durante la realización de esta tesis, se realizaron medidas de estos tres parámetros hídricos para las líneas transgénicas que expresan el factor *CtHSR1* y su control silvestre. El único parámetro diferencial entre ambos genotipos fue el potencial osmótico, que fue un 5% superior en las líneas *CtHSR1* respecto a su control silvestre.

Este aumento en el potencial osmótico, sugería la acumulación de alguna molécula osmóticamente activa producida en respuesta a la expresión del factor de transcripción de *Candida*. Una de las moléculas que se acumula en situaciones moderadas de falta de agua es la prolina, mientras que en situaciones extremas son azúcares. La prolina, además de acumularse ante situaciones de estrés hídrico también

se acumula en situaciones de estrés salino actuando como osmoprotector (Zhu, 2002). Así, observamos que la concentración total de prolina en las líneas que expresan el gen *CtHSR1* es de 1,4 a 1,8 veces superiores a las de su control silvestre en condiciones normales (Figura 4.2.32), acumulándose en mayor cantidad en situaciones de estrés hídrico, entre 1,3 y 2,6 veces el valor de su control (Figura 4.2.33). Sin embargo, no se observaron diferencias en las concentraciones de azúcares totales medidos por HPLC (Figura 4.2.31).

Utilizando la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real, se pudo confirmar la inducción de los genes de síntesis de prolina *P5CSI* y *P5CR* (Figura 4.2.34 y 4.2.35). En la literatura se indica que altas concentraciones de prolina de forma permanente se han relacionado con una posible fuente de toxicidad celular (Deuschle y col., 2001; Nanjo y col., 2003), hecho que puede explicar también el menor desarrollo en condiciones normales observado en los ensayos de sequía, en las plantas que expresan el gen *CtHSR1*.

En numerosos trabajos ha sido demostrado la implicación de este aminoácido en la tolerancia frente al estrés abiótico (Kishor y col., 1995; Nanjo y col., 1999a y b; Nuccio y col., 1999; Rontein y col., 2002; Ludmila y col., 2014). El aumento en prolina producido por la expresión del factor de transcripción *CtHSR1* podría ser uno de los mecanismos que favorecen la tolerancia a la sequía en estas líneas transgénicas.

5.2.5- Respuesta transcripcional

El análisis transcripcional realizado en esta tesis doctoral, determinó que 107 genes de *A. thaliana* están inducidos de forma significativa bajo la expresión del factor de transcripción *CtHSR1*. Si bien la mayoría de genes diferencialmente expresados están involucrados en procesos del ciclo celular, la transcripción y la biogénesis de los componentes celulares, aparecen numerosos genes involucrados en el rescate celular, defensa y virulencia, así como en la interacción con el medio ambiente (Figura 4.2.36).

En estas categorías sobrerrepresentadas, aparecen genes como el *BT2*, *bZIP1*, *CML24*, *ERD15*, *ERF2*, *ERF5*, *ERF11*, *JAZ7*, *LOX4*, *MYB96*, *NTL6*, *ORA47*, *RAV1*, *RAV2*, *RD26*, *SEN1*, *SYP122*, *WRKY 22*, *WRKY40*, *WRKY70* y *ZAT10*. Muchos de estos genes están involucrados en la señalización de diferentes tipos de estrés, como es el caso del gen *BT2* que aparece como regulador positivo de la tolerancia a ABA en

germinación (Mandadi y col., 2009). El gen *bZIP1*, en el artículo publicado por Sun y colaboradores (2012), aparece como regulador positivo de la tolerancia al estrés hídrico y salino, confirmado mediante mutantes de pérdida de función y sobreexpresión. Por otro lado, el gen *CML24* encargado de la unión a iones Ca^{+2} , está involucrado en la respuesta celular a ABA y se expresa en estomas, por lo que podría mediar el cierre estomático en condiciones de estrés (Delk y col., 2005). Muchos de los factores de transcripción de la familia ERF, además de estar involucrados en la señalización del etileno, como es el caso de ERF1 implicado en la represión de la síntesis de esta hormona (Li y col., 2011), también aparecen como reguladores positivos de genes de respuesta a ácido jasmónico y etileno en la defensa frente a la infección por *Botrytis cinerea*, como es el caso del gen *ERF5* y *ERF6* (Moffat y col., 2012), genes que también se encargan de controlar el crecimiento de las hojas en situaciones de estrés hídrico, frenando su desarrollo (Marieke y col., 2013). Como hemos visto en los resultados de esta tesis doctoral, uno de los posibles mecanismos que emplea el gen *CtHSR1* para inducir la tolerancia frente al estrés hídrico puede ser la síntesis de ácido jasmónico para inducir el cierre estomático. En este sentido, en nuestro análisis transcriptómico han aparecido genes involucrados en la síntesis y degradación de esta hormona, como son el gen *LOX4* y el gen *JAZ7*. De esta forma, y como ha sido demostrado mediante la cuantificación de esta hormona (Figura 4.2.26), la activación en la síntesis de jasmonatos induciría a su vez la expresión de genes de degradación, para que una vez la situación de estrés cese, la célula pueda alcanzar con mayor rapidez su homeostasis. Por último, la inducción de genes como *ERD15*, *MYB96*, *RD26*, *RAVI* y *RAV2* que aparecen como genes de respuesta a la sequía (Kiyosue y col., 1994; Seo y Park, 2011; Aalto y col., 2012; Hickman y col., 2013; Kim y col., 2012; Guo y col., 2013; Mittal y col., 2014), podrían explicar la respuesta mediada a través del gen *CtHSR1* en la tolerancia observada frente a este tipo de estrés.

Dado que este es el único estudio de la variación en la expresión génica producido por este factor de transcripción de origen fúngico en células vegetales, se ha comparado también con los resultados obtenidos con diferentes tratamientos que inducen estrés. Cabe destacar entre los tratamientos comparados, los resultados obtenidos con la respuesta transcripcional mediada a través del estrés osmótico y por choque térmico. En la comparación realizada entre los 2878 genes inducidos mediante estrés osmótico y los 107 genes inducidos por *CtHSR1*, podemos observar que el 40% de los genes inducidos mediante la expresión del factor de transcripción *CtHSR1* se

inducen también mediante tratamiento con manitol a una concentración de 300mM durante 3 horas. Entre estos genes expresados de forma similar en ambos supuestos, se encuentran genes como los anteriormente citados *bZIP1*, *ERF2*, *ERF5*, *ERF11*, *JAZ7*, *MYB96*, *RD26*, *SYP122*, *WRKY40* y *ZAT10* y otros como el *BCB*, *CML38*, *CNI1*, *CCL*, *CAF1a*, *DIC2*, *FBS1*, *NHL3*, *HSPRO2*, *SRC2*, *TEM1*, *CAL4* y *TPS11*. Por lo tanto, parece que la expresión del gen *CtHSR1* provoca una respuesta muy similar a la provocada por el tratamiento con manitol, proporcionando así la tolerancia a la sequía observada en nuestras plantas transgénicas.

Por otro lado, en la comparación realizada entre los 3349 genes inducidos mediante el tratamiento con elevadas temperaturas y los 107 genes inducidos por el *CtHSR1*, podemos observar que el 20% de los genes inducidos mediante la expresión del factor de transcripción CtHSR1 se inducen también mediante tratamiento por calor, a una temperatura de 38°C durante 3 horas. Entre los genes inducidos por calor, también se encuentran los genes anteriormente citados *bZIP1*, *JAZ7*, *MYB96*, *RD26*, y *ZAT10* y otros como el *CML24*, *FBS1*, *NHL3*, *HSPRO2*, *SRC2*, y *TPS11*. Como se puede observar, existe cierta similitud entre los genes inducidos mediante la expresión del gen *CtHSR1* y mediante los tratamientos por estrés osmótico y por calor, y es que el 60% de los genes inducidos bajo tratamiento térmico y mediante CtHSR1, se inducen también por estrés osmótico. Entre estos genes podemos encontrar una proteína LEA (At2g27080), el gen *bZIP1*, *FBS1*, *JAZ7*, *MYB96*, *HSPRO2*, *RD26*, *SRC2*, *TPS11* y *ZAT10*, entre otros.

Cabe destacar en este punto la homología observada en la respuesta transcripcional mediada a través de la pérdida de función del gen *WRKY33* con la respuesta mediada por el gen *CtHSR1*. Este elevado solapamiento de más del 50%, indica la posible implicación del factor de transcripción WRKY33 en la respuesta frente al estrés abiótico en arabisidopsis (Figura 4.2.42).

5.2.6- Modelo para la tolerancia a la sequía mediada por el gen *CtHSR1*

Como hemos visto hasta el momento, la expresión del factor de transcripción CtHSR1 bajo el control de su propia región reguladora de 3000 pares de bases, es capaz de conferir tolerancia a la sequía en planta adulta en ensayos de invernadero, y tolerancia a manitol y NaCl en ensayos de germinación *in vitro* en arabisidopsis. Estos

caracteres pueden ser debidos a diversos factores, que como hemos ido viendo, permitirían a nuestras plantas tolerar mejor los episodios de escasez hídrica.

Considerando los resultados del análisis transcriptómico, la expresión del gen *CtHSR1* tal y como hemos visto activa numerosos genes de inducción de la transcripción y de respuesta a estrés, por lo que es posible que diferentes mecanismos sean capaces de aumentar la tolerancia al estrés abiótico en *Arabidopsis*, mediada por la expresión del factor de transcripción de *Candida tropicalis*.

Ha quedado demostrado que el ácido jasmónico, hormona vegetal cuya síntesis se ve aumentada mediante la expresión del gen *CtHSR1* en condiciones normales (Figura 4.2.26), es capaz de mediar el cierre estomático a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (Munemasa y col., 2007). Mediante el análisis transcriptómico utilizando micromatrices de ADN, se ha observado la inducción del gen *LOX4* respecto a la línea control, lo que estaría provocando la acumulación de jasmonatos. Además, los genes de síntesis de ácido jasmónico pertenecientes a la familia *LOX* (a excepción de *LOX1*) se ven inducidos bajo esta misma hormona, según los datos disponibles en “*Arabidopsis* eFP Browser”, y en el caso del gen *LOX6*, su expresión se sitúa principalmente en células guarda, por lo que puede ser el encargado de mediar el cierre estomático a través del ácido jasmónico. Aunque también aparezca inducido el gen de degradación *JAZ7*, es lógico pensar que la célula ha puesto en marcha mecanismos de degradación que le permitan frenar la respuesta una vez el estrés haya cesado. Si miramos las mismas bases de datos de expresión, podemos comprobar que este gen de degradación *JAZ7* se induce solo por ácido jasmónico, y su expresión se localiza principalmente en estomas.

Hemos podido confirmar también el aumento en la producción de osmolitos compatibles, en este caso la prolina. Esta acumulación deriva en un mejor ajuste osmótico que permite a las líneas *CtHSR1* mantener el contenido hídrico vegetal ante situaciones de estrés por sequía. El gen que se ve inducido en mayor medida es el gen de síntesis *P5CS1*, y si miramos los datos de expresión disponibles en la base de datos “*Arabidopsis* eFP Browser”, observamos que este gen se ve fuertemente inducido en condiciones de estrés osmótico. Por lo tanto, es posible que la inducción observada en nuestras líneas *CtHSR1* en condiciones normales, les permita una mejor adaptación en situaciones de estrés en comparación con las líneas control. Además, según el artículo publicado por Mei-Chun y colaboradores (2013), parece

que la familia de factores de transcripción ERF pueden provocar cambios en la expresión de genes como el *P5CS1*, por lo que puede ser que los ERFs inducidos por el *CtHSR1* sean los responsables del ajuste osmótico observado en las plantas transgénicas.

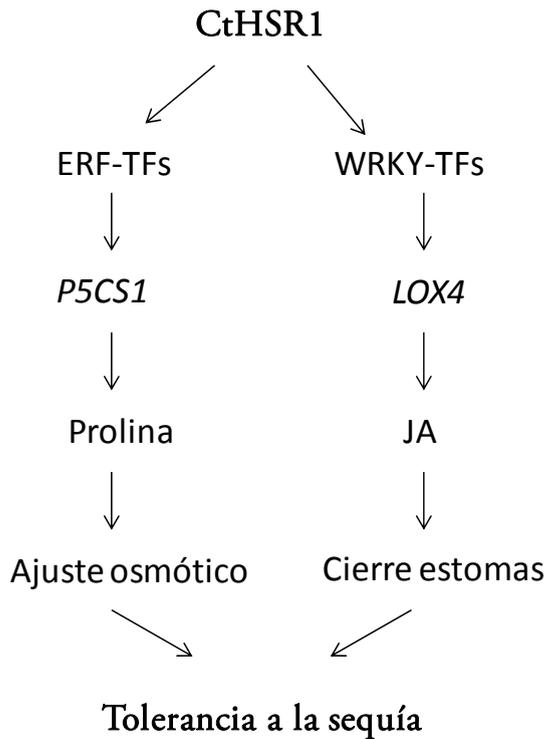


Figura 5.2. Mecanismo de acción propuesto para la tolerancia a la sequía mediada por *CtHSR1*.

CONCLUSIONES

6- CONCLUSIONES

6.1- Genética directa

1. Mediante el uso de la NE como agente de selección en rastreos de mutantes para la identificación de genes involucrados en la tolerancia a cationes tóxicos, se han podido obtener 9 mutantes de las colecciones de activación transcripcional de los doctores C. Somerville y W. Scheible, y del doctor D. Weigel. De las colecciones de pérdida de función cedidas por los doctores G. Pelletier y K. Feldmann, se obtuvieron 21 mutantes tolerantes a NE.
2. En el caso de las líneas rastreadas de la colección de los doctores S. Yokoi, H. Koiwa y R. Bressan, no se ha logrado aislar ningún mutante tolerante a NE, posiblemente por la baja cantidad de líneas utilizadas.
3. Los candidatos seleccionados han sido caracterizados parcialmente y tienen diferente grado de heterocigosidad y número de inserciones de T-DNA, por lo que será necesario continuar con esta caracterización para determinar los genes implicados y los mecanismos que regulan la tolerancia a estrés abiótico en *A. thaliana*.

6.2- Expresión del factor CtHSR1 en arabidopsis

4. Estudios previos permitieron identificar en el laboratorio el gen *CtHSR1* que confería resistencia a NaCl en levadura. Nuestros estudios *in silico* del factor de transcripción CtHSR1 muestran que posee solamente un sitio de unión al ADN, con elevada homología a los HSFs. Este único dominio ha permitido identificar la proteína codificada por el gen At4g18870 cuyos mutantes de pérdida de función parecen ser más tolerantes a la germinación inhibida por NaCl y manitol, además de tener una menor apertura estomática y tasa de transpiración. Por lo tanto, podemos sugerir a la proteína codificada por el gen At4g18870 como posible ortóloga de CtHSR1 en arabidopsis.

5. Mediante el estudio de la actividad del promotor del gen *CtHSR1* se ha podido demostrar la funcionalidad de este promotor fúngico en plantas. La localización de la enzima β -glucuronidasa expresada bajo este promotor es ubicua pero siempre asociada al tejido vascular, más concretamente en las células del floema. Además, este promotor es capaz de inducir significativamente, aunque de forma modesta, la expresión de la enzima β -glucuronidasa bajo tratamiento con manitol.
6. La caracterización fenotípica de las plantas transgénicas sobreexpresoras del *CtHSR1*, mostró que la proteína expresada bajo el promotor fúngico era la única capaz de conferir tolerancia durante la germinación inhibida por NaCl y manitol, y durante ensayos de sequía en planta adulta.
7. El estudio del balance hormonal de las plantas transgénicas, que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, indicó que dicha sobreexpresión causa un aumento en la concentración de ácido jasmónico, que podría ser el responsable del mayor cierre estomático observado. Además, el análisis transcripcional de estas plantas reveló la inducción del gen *LOX4*, responsable de la síntesis de jasmonatos.
8. El estudio del balance hídrico de las plantas transgénicas, que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propio promotor, reveló un mayor potencial osmótico dado principalmente por una mayor acumulación de prolina. Por otro lado, el análisis transcripcional reveló la inducción de varios miembros de la familia de factores de transcripción ERF, relacionados con la activación de genes de síntesis de prolina. Mediante qRT-PCR se comprobó la inducción de los genes *P5CS1* y *P5CR*, responsables de la acumulación de este osmoprotector.
9. Otro resultado del análisis transcriptómico relacionado con los promotores de los 107 genes inducidos por el gen *CtHSR1*, reveló un enriquecimiento del motivo TGAC presente en la caja WRKY de un 15% respecto al genoma de *Arabidopsis*. Además, la respuesta transcripcional mediada por *CtHSR1* posee un 52% de solapamiento con la respuesta transcripcional mediada por la pérdida de función del gen *WRKY33*, por lo que serán necesarios más

experimentos para relacionar la implicación de esta familia de factores de transcripción en el mecanismo de acción de CtHSR1.

10. Por último, mediante un ensayo de doble híbrido se pudo identificar un posible interactor del factor de transcripción CtHSR1, codificado por el gen no caracterizado At1g33680. Mediante análisis *in silico* se observó que posee dos dominios “KH”, capaces de unir moléculas de ARN y ADN de simple cadena, y estrechamente ligado a procesos de regulación transcripcional y traduccional. En futuros experimentos de interacción *in vivo* podremos determinar si se trata de un interactor real del factor CtHSR1 en la respuesta frente al estrés abiótico.

BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Aalto MK, Helenius E, Kariola T, Pennanen V, Heino P, Hórák H, Puzórzjova I, Kollist H, Palva ET. 2012. ERD15-an attenuator of plant ABA responses and stomatal aperture. *Plant Sci.* 182:19-28.
- Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC. 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 131:1748-1755.
- Acharya B, Assmann SM. 2009. Hormone interactions in stomatal function. *Plant Mol. Biol.* 69:451-462.
- Alejandro S, Rodríguez PL, Bellés JM, Yenush L, García-Sánchez M J, Fernández JA, Serrano R. 2007. An *Arabidopsis* quiescin-sulfhydryl oxidase regulates cation homeostasis at the root symplast–xylem interface. *EMBO J.* 26:3203-3215.
- Ali R, Pascual-Ahuir A, Marquez JA, Malik KA, Serrano R. 2001. Identification of *Candida tropicalis* *HSR1*, a gene of the heat-shock factor-related family, which confers salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18:605-610.
- Ames GFL, Lecar H. 1992. ATP-dependent bacterial transporters and cystic fibrosis: analogy between channels and transporters. *FASEB J.* 6:2660-2666.
- Amtmann A, Sanders D. 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29:75-112.
- Arthur CB, Kanefusa K, James RG, Howard R, Colleen M. Brophy. 1997. Cyclic nucleotide-dependent vasorelaxation is associated with the phosphorylation of a small heat shock-related protein. *J. Biol. Chem.* 272:11283-11287.
- Asada K, Takahashi M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition* (Kyle, D.J. et al., eds Elsevier) 227-287.
- Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodríguez PL, Ponce MR, Micol JL. 2005. A mutational analysis of the *ABA1* gene of *Arabidopsis*

- thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. J. Exp. Bot. 56:2071-2083.
- Bartels D, Salamini F. 2001. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. Plant Physiol. 127:1346-1353.
- Bartels D, Sunkar R. 2005. Link Drought and salt tolerance in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 24:23-58.
- Bates L, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39:205-207.
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. 1993. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. Comptes Rendus de Lacademie des Sciences serie III de la vie/Life sciences 316:1194-1199.
- Bent AF. 2000. “*Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species”. Plant Physiol. 124:1540-1547.
- Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J. Bac. 62:293-300.
- Berthomé R, Froger N, Hiard S, Balasse H, Martin-Canadell A, Budar F. 2003. The involvement of organelles in plant sexual reproduction: a post-genomic approach. Acta Biológica Cracoviensia. Series Botánica 45:119-124.
- Binzel ML, Hess FD, Bressan RA, Hasegawa PM. 1989. Mechanisms of adaptation to salinity in cultured glycophyte cells. In Cherry JH (Eds.), Biochemical and Physiological Mechanisms Associated with Environmental Stress Tolerance 139-157.
- Bohnert HJ, Sheveleva E. 1998. Plant stress adaptations - making metabolism move. Curr. Opin. Plant Biol. 1:267-274.
- Bonhomme S, Horlow C, Vezon D, de Laissardiere S, Guyon A, Ferault M, Marchand M, Bechtold N, Pelletier G. 1998. T-DNA mediated disruption

- of essential gametophytic genes in *Arabidopsis* is unexpectedly rare and cannot be inferred from segregation distortion alone. MGG 260:444-452.
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK. 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. Cell 123:1279-1291.
- Boston RS, Viitanen PV, Vierling E. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. Plant Mol. Biol. 32:191-222.
- Bouchez DC, Camilleri M, Caboche M. 1993. A binary vector based on Basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. Comptes Rendus de L'Académie des Sciences serie III de la vie/Life sciences. 316:1188-1193.
- Boyko A, Hudson D, Bhomkar P, Kathiria P, Kovalchuk I. 2006. Increase of homologous recombination frequency in vascular tissue of *Arabidopsis* plants exposed to salt stress. Plant Cell Physiol. 47:736-42.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254
- Browse J, Howe GA. 2008. New weapons and a rapid response against insect attack. Plant Physiol. 146:832-838.
- Bueso E, Muñoz-Bertomeu J, Campos F, Brunaud V, Martínez L, Sayas E, Ballester P, Yenush L, Serrano R. 2014. *ARABIDOPSIS THALIANA* HOMEBOX25 uncovers a role for Gibberellins in seed longevity. Plant Physiol. 164:999-1010.
- Chiu JC, Brenner ED, DeSalle R, Nitabach MN, Holmes TC, Coruzzi GM. 2002. Phylogenetic and Expression Analysis of the Glutamate-Receptor--Like Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Biol. Evol. 19:1066-1082.
- Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16:735-43.

- Couée I, Cecile S, Gwenola G, Abdelhak EA. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 57:449-459.
- Curtis MD, Grossniklaus U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133:462-469.
- Dalton FN. 1984. Dual pattern of potassium transport in plant cells: a physical artifact of a single uptake mechanism. *J. Exp. Bot.* 35:1723-1732.
- Dat J, Vandenabee S, Vranová E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:779-795
- Delk NA, Johnson KA, Chowdhury N, Braam J. 2005. CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca²⁺ sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. *Plant Physiol.* 139:240-53.
- Deng X, Phillips J, Meijer AH, Salamini F, Bartels D. 2002. Characterization of five novel dehydration-responsive homeodomain leucine zipper genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* 49:601-610.
- Deuschle K, Funck D, Hellmann H, Daschner K, Binder S, Frommer WB. 2001. A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *Plant J.* 27:345-356.
- Devoto A, Ellis C, Magusin A, Chang HS, Chilcott C, Zhu T, Turner JG. 2005. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol. Biol.* 58: 497-513.
- Eagles CF, Wareing PF. 1963. Dormancy regulators in woody plants: experimental induction of dormancy in *Betula pubescens*. *Nature* 199:874-875.

- Epstein E, Rains DW, Elzam OE. 1963. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. PNAS 49:684-692.
- Falkenmark M, Widstrand C. 1992. Population and water resources: a delicate balance. Population Bulletin, Population Reference Bureau 47:1-36.
- Falkenmark M. 1989. "The massive water scarcity threatening Africa-why isn't it being addressed." Ambio 18:112-118.
- FAO. 2002. Agricultura Mundial: hacia los años 2015/2030. Perspectivas por sectores principales, producción de alimentos.
- FAO. 2007a. FAO-UNESCO – Soil Map of the World, Geographic Projection, AGL-2007.
- FAO. 2007b. Water at a glance, the relationship between water, agriculture, food security and poverty.
- FAO. 2009. Forum de expertos de alto nivel “Cómo alimentar al mundo en 2050”.
- FAO. 2011. Perspectivas de cosechas y situación alimentaria, N° 2 – Junio 2011.
- FAO. 2013. AQUASTAT database, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Feldmann KA. 1991. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. Plant J. 1:71-82.
- Felle HH. 2001. pH: signal and messenger in plant cells. Plant Biol. 3:577-591.
- Ferrari S, Piconese S, Tronelli G, Migliaccio F. 2000. A new *Arabidopsis thaliana* root gravitropism and chirality mutant. Plant Sci. 158:77-85.
- Fields S, Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature 340:245-246.
- Flowers TJ. 2004. Improving crop salt tolerance. J. Exp. Bot. 55:307-319.

- Forment J, Mulet JM, Vicente O, Serrano R. 2002. The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1, 2 potassium transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1565:36-40.
- Forsthoefel NR, Wu YW, Shulz B, Bennett MJ, Feldmann KA. 1992. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: prospects and perspectives. *Aust. J. Plant Physiol.* 19:353-366.
- Fu HH, Luan S. 1998. AtKUP1: a dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 10:63-73.
- Fujita M, Yasunari F, Kyonoshin M, Motoaki S, Keiichiro H, Ohme-Takagi M, Lam-Son PT, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2004. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J.* 39:863-876.
- Funck D, Sonja E, Gudrun M. 2010. Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 10:70-83.
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS* 99:15898-15903.
- González-Guzmán M, Abia D, Salinas J, Serrano R, Rodríguez PL. 2004. Two new alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. *Plant Physiol.* 135:325-333.
- González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodríguez PL. 2002. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell.* 14:1833-1846.
- Goossens B, Chikhi L, Utami SS, De Ruiter JR, Bruford MW. 2000. A multi-samples, multi-extracts approach for microsatellite analysis of faecal samples in an arboreal ape. *Conservation Genetics* 1:157-162.

- Grelon M, Vezon D, Gendrot G, Pelletier G. 2001. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* 20:589-600.
- Grunewald W, Bartel V, Laurens P, Eva P, Dirk I, Godelieve G, Goossens A. 2009. Expression of the Arabidopsis jasmonate signaling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Rep.* 10:923-928.
- Guo L, Yang H, Zhang X, Yang S. 2013. Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 64:1755-1767.
- Gupta AK, Kaur N. 2005. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30:761-776.
- Hamana K. 1997. Polyamine distribution patterns within the families Aeromonadaceae, Vibrionaceae, Pasteurellaceae, and Halomonadaceae, and related genera of the gamma subclass of the Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43:49-59.
- Hamana K, Aizaki T, Arai E, Saito A, Uchikata K, Ohnishi H. 2004. Distribution of norspermidine as a cellular polyamine within micro green algae including non-photosynthetic achlorophyllous *Polytoma*, *Polytomella*, *Prototheca* and *Helicosporidium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50:289-295.
- Hamana K, Itoh T. 2001. Polyamines of the hyperthermophilic archaeobacteria belonging to the genera *Thermococcus* and *Methanothermus* and two new genera *Caldivirga* and *Palaeococcus*. *Microbios* 104:105-114.
- Hamana K, Niitsu M, Samejima K, Itoh T. 2001. Polyamines of the thermophilic eubacteria belonging to the genera *Thermosiphon*, *Thermaerobacter* and *Caldicellulosiruptor*. *Microbios* 104:177-185.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 136:557-580.

- Hare P, Cress W. 1997. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21:79-102
- Hellens Roger, Klee Harry, Mullineaux Philip. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5:446-451.
- Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Ros-Barceló A, Sevilla F. 2001. Antioxidant systems and O²-/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* 127:817-831.
- Hickman R, Hill C, Penfold CA, Breeze E, Bowden L, Moore JD, Zhang P, Jackson A, Cooke E, Bewicke-Copley F, Mead A, Beynon J, Wild DL, Denby KJ, Ott S, Buchanan-Wollaston V. 2013. A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* 75:26-39.
- Hilbricht T, Salamini F, Bartels D. 2002. CpR18, a novel SAP-domain plant transcription factor, binds to a promoter region necessary for ABA mediated expression of the CDeT27-45 gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant J.* 3:293-303.
- Hiroshi Murakami, Debkumar Pain, Günter Blobel. 1988. 70-kD Heat Shock-related Protein Is One of at Least Two Distinct Cytosolic Factors Stimulating Protein Import into Mitochondria. *J. Cell Biol.* 107:2051-2057.
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montagu M, Schell J. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *MGG* 163:181-187.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS. 2000. Removal of feedback inhibition of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* 122:1129-1136.

- Ilegems M, Douet V, Meylan-Bettex M, Uyttewaal M, Brand L, Bowman JL, Stieger PA. 2010. Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development*. 137:975-84.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*. 27:325-333.
- James C. 2010. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/MG en 2010 – ISAAA-.
- James P, Haliaday J, Craig EA. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-1436.
- Kaouass M, Audette M, Ramotar D, Verma S, De Montigny D, Gamache I, Torossian K, Poulin R. 1997. The STK2 gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17:2994-3004.
- Kconz C, Németh K Rédei GP, Schell J. 1992. T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 20:963-976.
- Kim MJ, Park MJ, Seo PJ, Song JS, Kim HJ, Park CM. 2012. Controlled nuclear import of the transcription factor NTL6 reveals a cytoplasmic role of SnRK2.8 in the drought-stress response. *Biochem. J.* 448:353-63.
- Kishor PBK, Hong Z, Miao GH, Hu CAA, Verma DPS. 1995. Overexpression of [delta]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108:1455-1460.
- Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. ERD15, a cDNA for a dehydration-induced gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106:1707.

- Landsman D, Wolffe AP. 1995. Common sequence and structural features in the heat-shock factor and Ets families of DNA-binding domains. *Trends Biochem. Sci.* 20:225-226.
- Larkindale J, Huang B. 2004. Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: Involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *J. Plant Physiol.* 161:405-413.
- Larkindale J, Mishkind M, Vierling E. 2005. Plant responses to high temperature. Book: *Plant Abiotic Stress*. Edited by Jenks MA, Hasegawa PM. Blackwell Publishing 100-144.
- Leung J, Giraudat J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:199-222.
- Li Z, Zhang L, Yu Y, Quan R, Zhang Z, Zhang H, Huang R. 2011. The ethylene response factor AtERF11 that is transcriptionally modulated by the bZIP transcription factor HY5 is a crucial repressor for ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 68:88-99.
- Lobstein E, Anouchka G, Antonia P, Sandrine B. 2003. Kynky pollen and Poly pollen tube are two novel genes required for tip growth and duplicated in the *Arabidopsis* genome. *Acta Biol. Cracov. Bot.* 45/1:125-128.
- Lobstein E, Anouchka G, Madina F, David T, Georges P, Sandrine B. 2004. The putative *Arabidopsis* homolog of yeast Vps52p is required for pollen tube elongation, localizes to Golgi, and might be involved in vesicle trafficking. *Plant Physiol.* 135:1480-1490.
- Ludmila R, Hongjian L, Joel S, Vladimir S, Sholpan D, Ron M. 2014. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134:1683-1696.
- MA, 2005. Millennium Ecosystem Assessment, Appendix A. 2005.

- Maathuis FJM, Verlin D, Smith FA, Sanders D, Fernández JA, Walker NA. 1996. The physiological relevance of Na⁺-coupled K⁺-transport. *Plant Physiol.* 112:1609-1616.
- Mackay AD, Barber SA. 1985. Soil moisture effects on potassium uptake by corn. *Agronomy J.* 77:524-527.
- MacRobbie EA. 1998. Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B* 353:1475-88
- Mandadi KK, Misra A, Ren S, McKnight TD. 2009. BT2, a BTB protein, mediates multiple responses to nutrients, stresses, and hormones in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 150:1930-1939.
- Mansour MMF. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.* 43:491-500.
- Marieke D, Aleksandra S, Hannes C, Katrien M, Stijn D, De Bodt S, Vanden Bossche R, De Milde L, Takeshi Y, Minami M, Dirk I. 2013. ETHYLENE RESPONSE FACTOR6 acts as a central regulator of leaf growth under water-limiting conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 162:319-33.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, 2nd Edn. Academic Press, London, 889.
- McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM, Meegher RB. 1995. Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants *act2-1* and *act4-1*. *Plant J.* 8:613-622.
- Mei-Chun C, Po-Ming L, Wei-Wen K, Tsan-Piao L. 2013. The *Arabidopsis* ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol.* 162:1566-1582.
- Meigs, P. 1953. World distribution of arid and semi-arid homoclimates. In, UNESCO, Reviews of Research on Arid Zone Hydrology, Paris: United Nations.

- Meyerowitz EM. 1987. *Arabidopsis thaliana*. Annual Review of Genetics. 21:92-111.
- Meyerowitz EM. 1994. Plant developmental biology: green genes for the 21st century. BioEssays. 16:621-625.
- Mirza JI, Iqbal M. 1997. Spermine-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with developmental abnormalities. Plant Growth Reg. 22:151-156.
- Mittal A, Gampala SS, Ritchie GL, Payton P, Burke JJ, Rock CD. 2014. Related to ABA-Insensitive3(ABI3)/Viviparous1 and AtABI5 transcription factor coexpression in cotton enhances drought stress adaptation. Plant Biotech. J. 12:578-89.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7:405-10.
- Moffat CS1, Ingle RA, Wathugala DL, Saunders NJ, Knight H, Knight MR. 2012. ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in Arabidopsis. PLoS One 7:e35995.
- Molinari HBC, Marur CJ, Daros E, de Campos MKF, de Carvalho JFRP, Filho JCB, Pereira LFP, Vieira LGE. 2007. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. Physiol. Plant. 130:218-229.
- Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C. 1990. Stress proteins in biology and medicine (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Motoaki S, Taishi U, Kaoru U, Shinozaki K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. Curr. Opin. Plant Biol. 10:296-302.
- Munemasa S, Oda K, Watanabe-Sugimoto M, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y. 2007. The coronatineinsensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in Arabidopsis guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. Plant Physiol. 143:1398-1407.

- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns R, Husain S, Rivelli AR, James RA, Condon AG, Lindsay MP. 2002. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant Soil* 247:93-105.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Rev. Plant Biol.* 59:651-681.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nambara E, Marion-Poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:165-185.
- Nandwal, A.S, Hooda, A, Datta, D. 1998. Effect of substrate moisture and potassium on water relations and C, N and K distribution in *Vigna radiata*. *Biol. Plant.* 41:149-153.
- Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K. 2003. Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 44:541-548.
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999a. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 461: 205-210.
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999b. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18:185-193.
- Nemeth K, Klaus S, Peter P, Rishikesh B, Zsuzsanna KK, Biljana SS, Laszlo B, Jaideep M, Laszlo O, Sylvia S, Peter G, Mark S, George PR, Jeff S, Csaba K. 1998. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 12:3059-3073.

- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. 1999. AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9:27-43.
- Nieves-Cordones M, Martínez-Cordero MA, Martínez V, Rubio F. 2007. An NH₄⁺ 1-sensitive component dominates high-affinity K⁺ uptake in tomato plants. *Plant Sci.* 172:273-280.
- Niñoles R. 2005. Aislamiento y caracterización de un mutante de *Arabidopsis thaliana* específicamente resistente a litio. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia-ETSIA.
- Niu X, Narasimhan ML, Salzman RA, Bressan RA, Hasegawa PM. 1993. NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiol.* 103:713-718.
- Nover L, Bharti K, Doring P, Mishra SK, Ganguli A, Scharf K. D. 2001. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?. *Cell Stress Chaperon.* 6:177-189.
- Nuccio ML, Rhodes D, McNeil SD, Hanson AD. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:128-134.
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE. 1963. Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* 142:1592-1593.
- ONU. 2007. Previsiones demográficas Mundiales, Revisión de 2006. Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División de Población. Naciones Unidas.
- ONU. 2009. United Nations Population Information network online database.
- Palmgren MG. 2001, Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:817-845.
- Pandey S, Zhang W, Assmann SM. 2007. Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Lett.* 581:2325-2336.

- Pier PA, Berkowitz GA. 1987. Modulation of water stress effects on photosynthesis by altered leaf K^+ . *Plant Physiol.* 85:655-661.
- Polle A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate peroxidase–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 126:445-462.
- Premachandra GS, Saneoka H, Ogata S. 1991. Cell membrane stability and leaf water relations as affected by potassium nutrition of water-stressed maize. *J. Exp. Bot.* 42:739-745.
- Procissi A, de Laissardiere S, Ferault M, Vezon D, Pelletier G, Bonhomme S. 2001. Five gametophytic mutations affecting pollen development and pollen tube growth in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 158:1773-1783.
- Qi Z, Spalding EP. 2004, “Protection of plasma membrane K^+ transport by the salt overly sensitive1 Na^+ - H^+ antiporter during salinity stress”. *Plant Physiol.* 136:2548-2555.
- Quesada V, Ponce MR, Micol JL. 2000. Genetic Analysis of Salt-Tolerant Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 154:421-436.
- Rains D, Epstein E. 1967. Sodium absorption by barley roots. Its mediation by mechanisms 2 of alkali cation transport. *Plant Physiol.* 42:319-323.
- Raven JA. 1987. Acquisition of nitrogen by the shoots of land plants: its occurrence and implications for acid-base regulation. *New Phytol.* 109: 1-20.
- Rédei GP. 1970. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. A review of the genetics and biology. *Bibliogr. Genet.* 20:1-151.
- Rédei GP. 1975. *Arabidopsis* as a genetic tool. *Annu. Rev. Genet.* 9:111-127.
- Rhodes D, Hanson AD. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:357-384.

- Ritossa F. 1962. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*; *Experientia* 18:571-573
- Rock CD. 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* 148:357-396.
- Rodrigues A, Santiago J, Rubio S, Saez A, Osmont KS, Gadea J, Hardtke CS, Rodriguez PL. 2009. The short-rooted phenotype of the *brevis radix* mutant partly reflects root abscisic acid hypersensitivity. *Plant Physiol.* 149:1917-1928.
- Rodriguez PL, Ali R, Serrano R. 1996. C+Cdc55p and CtHal3p: Two putative regulatory proteins from *Candida tropicalis* with long acidic domains. *Yeast* 12:1321-1329
- Rodriguez-Garay B, Gregory CP, Glenn DK. 1989. Detection of Norspermidine and Norspermine in *Medicago sativa* L. *Plant Physiol.* 89:525-529.
- Rontein D, Basset G, Hanson AD. 2002. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab. Eng.* 4:49-56.
- Ross KJ, Franz P, Armstrong SJ, Vizir I, Mulligan B, Franklin FC, Jones GH. 1997. Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis* isolated from T-DNA-transformed lines. *Chromosome Res.* 5:551-559.
- Ruggiero B, Koiwa H, Manabe Y, Quist TM, Inan G, Saccardo F, Joly RJ, Hasegawa PM, Bressan RA, Maggio A. 2004. Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto11nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136:3134-3147.
- Rus A, Lee B, Muñoz-Mayor A, Sharkuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM. 2004. AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in plants. *Plant Physiol.* 136:2500-2511.

- Sachin K, Larkindale J, Ung L, von Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:310-316.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Salaita L, Kar RK, Majee M, Downie AB. 2005. Identification and characterization of mutants capable of rapid seed germination at 10 degrees C from activation-tagged lines of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 56:2059-2069.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn: by, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, vol. 3.
- Sayas E. 2014. Mecanismos de toxicidad de poliaminas: Inhibición del recambio de proteínas. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- Schlesinger MJ. Heat-shock proteins. 1990. *J. Biol. Chem.* 265:12111-12114.
- Schuppler U, He PH, John PCL, Munns R. 1998. Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol.* 117: 667-678.
- Sen Gupta A, Berkowitz GA, Pier PA. 1989. Maintenance of photosynthesis at low leaf water potential in wheat. *Plant Physiol.* 89:1358-1365.
- Seo M, Jikumaru Y, Kamiya Y. 2011. Profiling of hormones and related metabolites in seed dormancy and germination studies. In AR Kermode, ed, *Seed Dormancy: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, NY, pp 99–111.
- Seo PJ, Park CM. 2011. Cuticular wax biosynthesis as a way of inducing drought resistance. *Plant Signal Behav.* 6:1043-5.

- Serrano R. 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms. Toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 165:1-52.
- Shabala S, Cuin TA. 2007. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol. Plant.* 133:651-669.
- Shen B, Jensen RG, Bohnert H. 1997. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.* 113: 1177-1183.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58:221-227.
- Shu-Ying M, Wei-Hua W. 2007. AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses. *Plant Mol. Biol.* 65:511-518.
- Siegel RS, Xue S, Murata Y, Yang Y, Nishimura N, Wang A, Schroeder JI. 2009. Calcium elevation- and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and Kin channels in Arabidopsis guard cells. *Plant J.* 59:207-220.
- Sorger PK, Nelson HCM. 1989. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 59:807-813.
- Sorger PK. 1991. Heat Shock Factor and the Heat Shock Response. *Cell* 65:363-366.
- Strasburger E, Noll F, Schenck H, Schimper AFW. 1994. *Tratado de Botánica*, Ediciones Omega, Barcelona.
- Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A. 2004. Cytoplasmic Alkalization Precedes Reactive Oxygen Species Production during Methyl Jasmonate- and Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure. *Plant Physiol.* 134:1536-154.
- Sun X, Li Y, Cai H, Bai X, Ji W, Ding X, Zhu Y. 2012. The Arabidopsis AtbZIP1 transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses. *J. Plant Res.* 125:429-438.

- Sutter JU, Sieben C, Hartel A, Eisenach C, Thiel G, Blatt MR. 2007. Abscisic acid triggers the endocytosis of the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane. *Curr. Biol.* 17:1396-1402.
- Szabados L, Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15:89-97.
- Tae-Houn K, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI. 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:561-591.
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29:417-426.
- Taji T, Seki M, Satou M, Sakurai T, Kobayashi M, Ishiyama K, Narusaka Y, Narusaka M, Zhu JK, Shinozaki K. 2004. Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol.* 135:1697-1709.
- Tester M, Davenport RJ. 2003. Na⁺ transport and Na⁺ tolerance in higher plants. *Ann. Bot.* 91:503-527.
- The Arabidopsis genome initiative. 2000. The involvement of organelles in plant sexual reproduction: a post-genomic approach. *Nature.* 408:796-815.
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs; *J. Mol. Biol.* 84:389-398.
- Torres MA, Dangl JL. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:397-403.
- Trivedi B, Danforth WH. 1966. Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 241:4110-4114.

- Tsugane K, Kobayashia K, Niwaa Y, Ohbab Y, Wadab K, Kobayashia H. 1999. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 11:1195-1206.
- Tusher Virginia G, Tibshirani Robert, Chu Gilbert. 2000. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *PNAS* 98:5116 -5121.
- Ullrich SJ, Robinson EA, Law LW, Willingham M, Appella E. 1986. A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein (amino-terminal sequence/isoforms/cell surface location). *Biochem. Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:3121-3125.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1999. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:5844-5849.
- Van Montfort RLM, Slingsby C, Vierling E. 2002. Structure and function of the small heat shock protein/-crystallin family of molecular chaperones. In A. L. Horwich (ed.) *Protein Folding in the Cell*. Vol. 59. Academic Press, New York, pp. 105-156.
- Vierling E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:579-620.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33:949-956.
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC. 1998. ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* 15:501-510.
- Wang H, Zhou Y, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC. 2000. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.* 24:613-623.

- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM. 2000. Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122:1003-1013.
- Weinl C, Marquardt S, Kuijt SJ, Nowack MK, Jakoby MJ, Hulskamp M, Schnittger A. 2005. Novel functions of plant cyclin-dependent kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. *Plant Cell* 17:1704-1722.
- Wyn Jones RG, Pollard A. 1983. Proteins, enzymes and inorganic ions. A. Lauchli, A. Person (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 15B, pp. 528-562.
- Xiang-Huan Cui, Fu-Shun Hao, Hui Chen, Jia Chen, Xue-Chen Wang. 2008. Expression of the *Vicia faba* *VfPIP1* gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance. *J. Plant Res.* 121:207-214.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell.* 14:S165-S183.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho TH, Wu R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* 110:249-257.
- Yanhai Y, Chen L, Beachy R. 1997. Promoter elements required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice. *Plant J.* 12:1179-1188.
- Yokoi S, Bressan RA, Hasegawa PM. 2002. Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report*, 25-33.
- Yong-Mei J, So YW, Hyesung J, Sang-Ryoung P, Minkyun K. 2011. Identification and molecular characterization of a low acid phosphatase 3 (*lap3*) mutant based on the screening of an *Arabidopsis* activation-tagged population. *Plant Biotech. Reports* 5:45-51.

Yuen CY, Sedbrook JC, Perrin RM, Carroll KL, Masson PH. 2005. Loss-of-function mutations of ROOT HAIR DEFECTIVE3 suppress root waving, skewing, and epidermal cell file rotation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138:701-714.

Zar JH. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey, USA.

Zhang Y, Wang Z, Zhang L, Cao Y, Huang D, Tang K. 2006. Molecular cloning and stress-dependent regulation of potassium channel gene in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*). *J. Plant Physiol.* 163:968-978.

Zhu JK. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:66-71.

Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53:247-273.

Páginas web consultadas

<http://affymetris.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl>

<http://benchling.com/benchling/yeast-plasmids/yep351>

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100004746

<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/jacob-daniela-2003-07-15/HTML/chapter6.html>

<http://en.wikipedia.org/wiki/PBR322>

http://es.wikipedia.org/wiki/Ninhidrina#mediaviewer/File:Ninhydrin_Reaction_Mechanism.svg

<http://genocon.org>

<http://pfam.xfam.org>

<http://prosite.expasy.org/>

http://smart.emblheidelberg.de/smart/show_motifs.pl

<http://trabajandoporunmundoverde.blogspot.com.es/2010/03/tipos-de-hojas.html>

<http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb/>

<http://www.addgene.org/11343/>

<http://www.b2b.invitrogen.com>

<http://www.clubgreen.nl>.

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfan/mirna/index.shtml>

<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>

<http://www.un.org/popin/>

<http://www.yrgene.com/product/vector/15791>

ANEXOS

8.- ANEXOS

Anexo 1: Secuencia de los cebadores empleados

Cebadores empleados en el genotipado de los mutantes SALK	
At4g19630 RP-Rv	aatcataactcgacgacgac
At4g19630 LP-Fw	ttgccaataacttagttgccg
At4g18870 RP-Rv	tgcaaaattcttggattcc
At4g18870 LP-Fw	tgttgggatccatcttatgc
LBb1	gcgtggaccgcttgctgcaact
LBb1.3	atthttgccgatttcggaac
LBa1	tggttcacgtagtgggcatcg
Cebadores empleados en el genotipado del mutante GABI_324B11	
At2g38470 LP-Fw	tccgttcaacgtttgagagtc
At2g38470 RP-Rv	gtttggctccattgttctgac
o8474	ataataacgctgcgacatctacatth
Cebadores empleados en análisis de expresión mediante qRT-PCR	
HSR1 RT Rv+1945	cactggcgttccattcatagg
HSR1 RT Fw+859	gcaccgccagttccatctgg
At5g62530 P5CDH Rv	tgggatcgtttgaaacaaca
At5g62530 P5CDH Fw	ggtggcaaggaattgaagaa
At5g38710 PDH2 Rv	cagaggacttaagccggaga
At5g38710 PDH2 Fw	aaaccgtcgaagctgctaaa
At3g30775 PDH1 Rv	gttaacggttccggttctga
At3g30775 PDH1 Fw	accattgaagctgccaatc
At5g14800 P5CR Rv	gcagcaacaactgcattcat
At5g14800 P5CR Fw	tggaggagtagctgctggtt
At3g55610 P5CS2 Rv	cacaagccttcccataagt
At3g55610 P5CS2 Fw	cgtaagcgtatcgtcgtca
At2g39800 P5CS1 Rv	ttaccccaacagtctctgg
At2g39800 P5CS1 Fw	gtttttgaatcccagactga
At2g41430 ERD15 RV+289	actcagcagcatcagtgta
At2g41430 ERD15 FW+53	ttattccggcagctgtacga
At4g35770 SEN1 RV+481	tgaagccagcagtgagaaga
At4g35770 SEN1 FW+275	ggacaccagacgaattcagc

At5g07100 WRKY26 RV+594	accgtctccattactgctgt
At5g07100 WRKY26 FW+397	agcgaaaacccgaggagtta

Cebadores empleados en análisis de expresión mediante qRT-PCR

At1g80840 WRKY40 RV+621	cgatggcattggatggttg
At1g80840 WRKY40 FW+412	gcttctgacactaccctcgt
At3g47340 DIN6 RV+799	gcaaaaggaatggagctgag
At3g47340 DIN6 FW+604	tcaacgccttatgacctct
At5g49450 BZIP1 RV+429	aaggacgccattggttgtag
At5g49450 BZIP1 FW+235	tcggagaagattggctctc
At4g36040 J11 RV+479	cactgatcggtttcccagtt
At4g36040 J11 FW+244	aatcggccttaccggagatt

Cebadores empleados en la clonación del gen *CtHSR1* o su región reguladora

HSR1 CDS RvHistKpnI	ggggtagccctagtggtggtggtggtggtgattttcttctt tttcaatagtaactatcc
HSR1 CDS FwBamHI	cgggatccatgagtaagaaaagcaacagtacc
HSR1 CDS Rv+stop	ctaattttcttcttttcaatagtaactatcc
HSR1 CDS Rv-stop	attttcttcttttcaatagtaactatcc
HSR1 CDS Fw+1	atgagtaagaaaagcaacagtacc
HSR1 promotor Fw -1381	caactcctcctcggctatacc
HSR1 promotor Fw -168	ttccccttattctccgatttt
HSR1 promotor Rv -1783	tttggtaggatttattattccaa
HSR1 promotor Rv-NcoI	catgccatggttctttttgcaatcttggga
HSR1 promotor Fw-BamHI	cgggatccttcattctttaatttaaccaattg

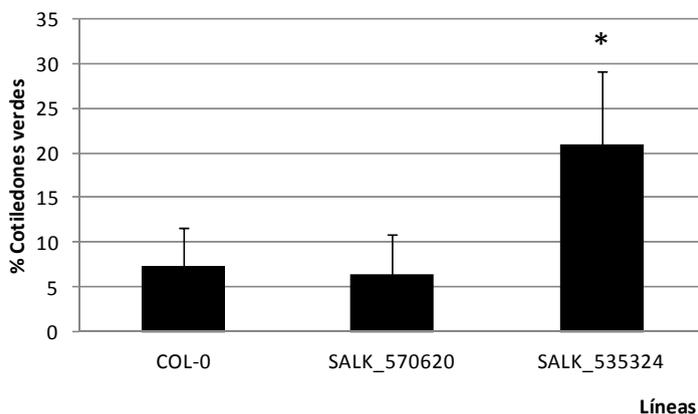
Cebadores empleados en las sondas de hibridación del southern blot

Kanamicina Fw+80	agacaatcggctgctctgat
Kanamicina Rv+255	agtgacaacgtcgagcacag
T-NOS Rv+471	ccgagaagggctttttcttt
T-NOS Fw+27	aacgtgggtagcaccaaaac
BAR Fw	ccaccgaggcggacatgc
BAR Rv	gctgaagtccagctgccagaaac
LB pGKB5 Fw+6875	cggactccagggcgtgtgc
LB pGKB5 Rv+7363	cagttcatcgatcaaatcggc
GUS Fw+1	atgttacgtcctgtagaaacccc
GUS Rv+547	acggtgatctcgtccacca

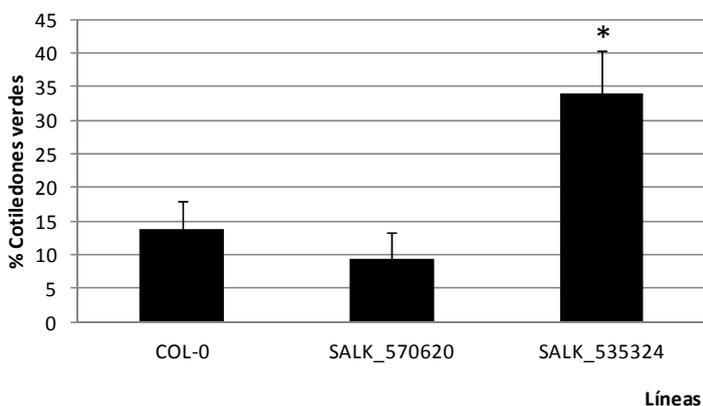
Cebadores empleados como controles endógenos

At1g13320 Fw	acctgcggtaataactgcatcta
At1g13320 Rv	ccgaacatcaacatctgggtc
At5g55840 Fw	gatgatattgcagttgtcaccgt
At5g55840 Rv	cactgtcttgcttgccttctctg

Anexo 2: Ensayo de germinación para los mutantes SALK_070620 para el gen At4g19630 y SALK_035324 para el gen At4g18870



Análisis de aparición de cotiledones verdes tras la germinación en MS + 125mM de NaCl para las líneas SALK_070620 y SALK_035324. Cada valor representa la media de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.



Análisis de aparición de cotiledones verdes tras la germinación en MS + 250mM de manitol para las líneas líneas SALK_070620 y SALK_035324. Cada valor representa la media de 4 determinaciones. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto a su control, de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Anexo 3: Análisis de parámetros fotosintéticos para los mutantes SALK_070620 para el gen At4g19630 y SALK_035324 para el gen At4g18870

Valores de tasa de fijación neta de CO₂ (A_n , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conductividad estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tasa de transpiración (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y eficiencia cuántica efectiva del PSII (PhiPS2) en mutantes de pérdida de función de los genes At4g18870 y At4g19630, y su control silvestre COL-0 en Arabidopsis. Cada valor es media de 10 determinaciones en plantas diferentes \pm SE. * indica diferencias significativas ($P \leq 0,05$), de acuerdo con la prueba "t" de Student.

Genotipo	A_n	g_s	E	PhiPS2
COL-0	8,6 \pm 0,25	0,22 \pm 0,01	5,7 \pm 0,25	0,227 \pm 0,01
At4g18870	7,772 \pm 0,2 *	0,162 \pm 0,01 *	4,353 \pm 0,19 *	0,203 \pm 0,01 *
At4g19630	8,427 \pm 0,29	0,2364 \pm 0,01	5,798 \pm 0,19	0,2424 \pm 0,01

Anexo 4: Tabla con los genes 107 inducidos, resultado del análisis transcripcional mediante micromatrices de ADN para las líneas que expresan el gen *CtHSR1* bajo su propia región reguladora.

Genes	Inducción	Descripción
At3g48360	2,01	BT2 - Componente esencial en la activación de la telomerasa, redundante con BT1 y BT3 en el desarrollo del gametofito femenino
At1g80840	1,74	WRKY40 - Factor de transcripción de la familia WRKY
At4g24570	1,36	DIC2 - Transportador mitocondrial de dicarboxilato
At1g02660	1,27	Alfa/beta Hidrolasa
At1g80440	1,23	Galactosa oxidasa
At2g40000	1,23	Ortólogo del gen de remolacha HSPRO2 que confiere resistencia a nematodos
At5g22920	1,21	RZPF34 - Proteína de dedo de zinc
At4g15210	1,17	BAM5 - Beta-amilasa inducible por azucares
At4g35770	1,13	SEN1 - Asociado a senescencia
At4g36850	1,12	Miembro de la superfamilia PQ-Loop
At4g10910	1,12	Desconocido
At3g47340	1,10	DIN6 - Asparagina sintetasa dependiente de glutamina, que se induce durante la senescencia
At2g18700	1,07	TPS11 - Trehalosa fosfatasa/sintasa 11
At1g76650	1,06	CML38 - Proteína con dominio calmodulina que une calcio
At3g15450	1,05	Proteína inducible por aluminio con dominio YGL y LRDR
At5g11070	1,02	Desconocido
At1g66090	1,01	TIR-NBS - Resistencia a patógenos
At3g44260	1,00	CAF1a - Deadenilación del ARN y defensa
At5g49450	1,00	bZIP1 - Factor de transcripción que actúa como regulador positivo de la tolerancia a la salinidad y la
At2g15890	0,92	MEE14 - Defensa frente a hongos
At5g20230	0,91	SAG14 - Asociado a senescencia
At2g41100	0,91	CAL4 - Proteína con dominio calmodulina que une calcio
At1g73540	0,90	NUDT21 - Hidrolasa nudix
At4g36500	0,90	Desconocido

Genes	Inducción	Descripción
At3g62550	0,89	Alfa Hidrolasa
At5g37770	0,88	CML24 - Proteína con dominio calmodulina que une calcio
At3g56400	0,87	WRKY70 - Factor de transcripción de la familia WRKY
At1g66160	0,87	CMPG1 - Proteína ubiquitina ligasa
At1g27730	0,86	ZAT10 - Confiere tolerancia a sal, y actúa como represor transcripcional
At1g68840	0,85	EDF2 - Factor de transcripción de respuesta a etileno
At3g10020	0,84	Desconocido
At1g49130	0,83	Proteína de dedo de zinc
At2g44130	0,83	Galactosa oxidasa
At3g26740	0,82	CCL - Transporte de iones
At4g32480	0,81	DUF506 - Desconocida
At4g37610	0,81	BT5 - Respuesta a estrés
At1g57990	0,81	PUP18 - Relacionada con el transporte de purina
At1g55450	0,81	Metiltransferasa
At2g25735	0,81	Desconocido
At3g49790	0,81	Proteína que une ATP
At1g13260	0,81	EDF4 - Factor de transcripción de respuesta a etileno
At3g46600	0,80	Factor de transcripción de la familia GRAS
At4g36040	0,79	J11 - Chaperona de repuesta a estrés
At3g04640	0,78	Proteína rica en glicina
At1g28370	0,78	ERF11 - Factor de transcripción de la familia ERF
At5g45830	0,78	DOG1 - Involucrado en el control de la dormancia
At1g19380	0,77	Desconocido
At1g80920	0,77	TOC12 - Proteína presente en el cloroplasto
At5g19120	0,76	Aspartil proteasa
At5g06320	0,76	NHL3 - Respuesta a estrés
At5g62470	0,75	MYB96 - Factor de transcripción de la familia MYB
At4g27450	0,73	Proteína inducible por aluminio con dominio YGL y LRDR
At2g25900	0,73	CTH - Proteína de dedos de zinc
At2g26530	0,73	AR781 - Desconocida
At2g32150	0,73	HAD - Hidrolasa de tipo haloácido dehalogenasa
At2g27830	0,73	Desconocido

Genes	Inducción	Descripción
At5g63160	0,73	BT1 - Respuesta a estrés
At1g19020	0,72	Desconocido
At2g15960	0,71	Desconocido
At1g18300	0,71	NUDT4 - Hidrolasa nudix
At5g65207	0,71	Desconocido
At1g78460	0,70	Proteína de la familia SOUL
At2g23810	0,70	TET8 - Tetraspanina
At5g60680	0,70	Desconocido
At2g41430	0,70	ERD15 - Respuesta a la deshidratación
At1g09070	0,70	SRC2 - Transporte a vacuola desde el ER
At4g24380	0,70	Síntesis de ácido fólico y derivados
At5g43620	0,69	Complejo de escisión del Pre-mARN
At3g49530	0,68	NAC062 - Factor de transcripción de la familia NAC
At3g15630	0,68	Desconocido
At1g72900	0,68	TIR - Resistencia a patógenos
At1g72520	0,67	LOX4 - Síntesis de ácido jasmónico
At2g28500	0,67	LBD11 - Factor de transcripción
At1g49500	0,66	Desconocido
At2g41640	0,66	Glicosiltransferasa
At2g17036	0,65	DUF295 - Desconocida
At1g28330	0,65	DRM1 - Proteína asociada con la dormancia
At5g50450	0,65	Proteína de dedo de zinc MYND con dominio HCP
At2g27080	0,65	LEA - Tolerancia a la desecación
At3g43280	0,65	Desconocido
At5g16370	0,65	AAE5 - Sintetasa/ligasa dependiente de AMP
At4g27410	0,65	RD26 - Factor de transcripción de la familia NAC de respuesta a la deshidratación
At5g47220	0,64	ERF2 - Factor de transcripción de la familia ERF
At1g72910	0,64	TIR - Resistencia a patógenos
At4g29780	0,64	Desconocido
At3g44900	0,64	CHX4 - Antiportador Na ⁺ /H ⁺
At2g29670	0,64	Proteína de la familia TPR
At1g04770	0,64	Proteína de la familia TPR
At2g34600	0,63	JAZ7 - Degradación del ácido jasmónico

Genes	Inducción	Descripción
At1g61340	0,63	FBS1 - Proteína de respuesta a estrés
At1g25560	0,63	EDF1 - Factor de transcripción de respuesta a etileno
At2g17450	0,63	RHA3A - Proteína de dedos de zinc
At1g74930	0,63	ORA47 - Factor de transcripción de la familia DREB
At3g47160	0,63	Proteína con dominio RING/U
At1g32920	0,62	Desconocido
At5g51190	0,62	ERF105 - Factor de transcripción de la familia ERF
At5g27420	0,62	CNI1 - Proteína ubiquitina ligasa en respuesta a carbón/nitrógeno
At4g05070	0,62	Proteína de respuesta a daño celular
At1g27290	0,62	Desconocido
At3g61060	0,62	Proteína del floema de respuesta a daño
At1g76600	0,61	Desconocido
At5g47230	0,61	ERF5 - Factor de transcripción de la familia ERF
At5g56100	0,61	Proteína rica en glicina
At4g01250	0,61	WRKY22 - Factor de transcripción de la familia WRKY
At1g12780	0,60	UGE1 - Epimerasa UDP-glucosa
At3g62070	0,60	Desconocido
At3g52400	0,60	SYP122 - Regulador negativo de repuesta a defensa

Anexo 5: Comparación entre la respuesta transcripcional mediada a través de la expresión del gen *CtHSR1* en arabisidopsis, y mediante la respuesta provocada por el tratamiento con manitol 300mM durante 3 horas.

Tabla con los 43 genes inducidos mediante la sobreexpresión del factor CtHSR1 y mediante tratamiento con manitol 300mM durante 3 horas.

Genes	Inducción	Descripción
At3g48360	2,01	BT2 - Componente esencial en la activación de la telomerasa, redundante con BT1 y BT3 en el desarrollo del gametofito femenino WRKY40 - Factor de transcripción de la familia WRKY
At1g80840	1,74	WRKY
At4g24570	1,36	DIC2 - Transportador mitocondrial de dicarboxilato
At1g02660	1,27	Alfa/beta Hidrolasa
At1g80440	1,23	Galactosa oxidasa
At2g40000	1,23	Ortólogo del gen de remolacha HSPRO2 que confiere resistencia a nematodos
At4g15210	1,17	BAM5 - Beta-amilasa inducible por azúcares
At4g35770	1,13	SEN1 - Asociado a senescencia
At2g18700	1,07	TPS11 - Trehalosa fosfatasa/sintasa 11 CML38 - Proteína con dominio calmodulina que une calcio
At1g76650	1,06	CAF1a - Deadenilación del ARN y defensa
At3g44260	1,00	bZIP1 - Factor de transcripción que actúa como regulador positivo de la tolerancia a la salinidad y la sequía
At5g20230	0,91	SAG14 - Asociado a senescencia CAL4 - Proteína con dominio calmodulina que une calcio
At2g41100	0,91	Desconocido
At4g36500	0,90	Desconocido
At1g66160	0,87	CMPG1 - Proteína ubiquitina ligasa
At1g27730	0,86	ZAT10 - Confiere tolerancia a sal, y actúa como represor transcripcional
At3g10020	0,84	Desconocido
At3g26740	0,82	CCL - Transporte de iones
At1g55450	0,81	Metiltransferasa
At3g04640	0,78	Proteína rica en glicina

Genes	Inducción	Descripción
At1g28370	0,78	ERF11 - Factor de transcripción de la familia ERF
At1g19380	0,77	Desconocido
At5g06320	0,76	NHL3 - Respuesta a estrés
At5g62470	0,75	MYB96 - Factor de transcripción de la familia MYB
At2g27830	0,73	Desconocido
At1g19020	0,72	Desconocido
At2g15960	0,71	Desconocido
At5g60680	0,70	Desconocido
At1g09070	0,70	SRC2 - Transporte a vacuola desde el ER
At1g72900	0,68	TIR - Resistencia a patógenos
At1g72520	0,67	LOX4 - Síntesis de ácido jasmónico
At2g27080	0,65	LEA - Tolerancia a la desecación
At4g27410	0,65	RD26 - Factor de transcripción de la familia NAC de respuesta a la deshidratación
At5g47220	0,64	ERF2 - Factor de transcripción de la familia ERF
At2g29670	0,64	Proteína de la familia TPR JAZ7 - Involucrado en la degradación del ácido jasmónico
At2g34600	0,63	
At1g61340	0,63	FBS1 - Proteína de respuesta a estrés
At1g25560	0,63	EDF1 - Factor de transcripción de respuesta a etileno
At5g51190	0,62	ERF105 - Factor de transcripción de la familia ERF
At5g27420	0,62	CNI1 - Proteína ubiquitina ligasa en respuesta a carbón/nitrógeno
At5g47230	0,61	ERF5 - Factor de transcripción de la familia ERF
At3g52400	0,60	SYP122 - Regulador negativo de repuesta a defensa

Continuación del Anexo 5

Tabla con los 16 genes inducidos mediante la sobreexpresión del factor CtHSR1 y reprimidos mediante tratamiento con manitol 300mM durante 3 horas.

Genes	Inducción	Descripción
At3g48360	2,01	BT2 - Componente esencial en la activación de la telomerasa, redundante con BT1 y BT3 en el desarrollo del gametofito femenino
At5g22920	1,21	RZPF34 - Proteína de dedo de zinc
At4g15210	1,17	BAM5 - Beta-amilasa inducible por azúcares
At4g35770	1,13	SEN1 - Asociado a senescencia
At3g47340	1,10	DIN6 - Asparagina sintetasa dependiente de glutamina, que se induce durante la senescencia
At3g15450	1,05	Proteína inducible por aluminio con dominio YGL y LRDR
At2g15890	0,92	MEE14 - Defensa frente a hongos
At1g68840	0,85	EDF2 - Factor de transcripción de respuesta a etileno
At3g10020	0,84	Desconocido
At5g19120	0,76	Aspartil proteasa
At4g27450	0,73	Proteína inducible por aluminio con dominio YGL y LRDR
At2g25900	0,73	CTH - Proteína de dedos de zinc
At3g15630	0,68	Desconocido
At1g72520	0,67	LOX4 - Síntesis de ácido jasmónico
At1g28330	0,65	DRM1 - Proteína asociada con la dormancia
At1g12780	0,60	UGE1 - Epimerasa UDP-glucosa

Anexo 6: Comparación entre la respuesta transcripcional mediada a través de la expresión del gen *CtHSR1* en arábidopsis, y mediante la respuesta provocada por el tratamiento con metil viológeno 10 μ M durante 3 horas.

Tabla con el único gen inducido mediante la sobreexpresión del factor CtHSR1 y mediante tratamiento con metil viológeno 10 μ M durante 3 horas.

Genes	Inducción	Descripción
At2g15960	0,71	Desconocido

Tabla con los 4 genes inducidos mediante la sobreexpresión del factor CtHSR1 y reprimidos mediante tratamiento con metil viológeno 10 μ M durante 3 horas.

Genes	Inducción	Descripción
At4g15210	1,17	BAM5 - Beta-amilasa inducible por azucares
At5g20230	0,91	SAG14 - Asociado a senescencia
At1g19380	0,77	Desconocido
At1g19020	0,72	Desconocido

Anexo 7: Comparación entre la respuesta transcripcional mediada a través de la expresión del gen *CtHSR1* en arabisidopsis, y mediante la respuesta provocada por el tratamiento por calor a 38°C durante 3 horas.

Tabla con los 22 genes inducidos mediante la sobreexpresión del factor CtHSR1 y mediante tratamiento por calor a 38°C durante 3 horas.

Genes	Inducción	Descripción
At2g40000	1,23	Ortólogo del gen de remolacha HSPRO2 que confiere resistencia a nematodos
At2g18700	1,07	TPS11 - Trehalosa fosfatasa/sintasa 11
At1g66090	1,01	TIR-NBS - Resistencia a patógenos
At5g49450	1,00	bZIP1 - Factor de transcripción que actúa como regulador positivo de la tolerancia a la salinidad y la sequía
At3g62550	0,89	Alfa Hidrolasa
At5g37770	0,88	CML24 - Proteína con dominio calmodulina que une calcio
At1g27730	0,86	ZAT10 - Confiere tolerancia a sal, y actúa como represor transcripcional
At3g10020	0,84	Desconocido
At3g49790	0,81	Proteína que une ATP
At5g62470	0,75	MYB96 - Factor de transcripción de la familia MYB
At4g27450	0,73	Proteína inducible por aluminio con dominio YGL y LRDR
At1g19020	0,72	Desconocido
At1g09070	0,70	SRC2 - Transporte a vacuola desde el ER
At2g27080	0,65	LEA - Tolerancia a la desecación
At4g27410	0,65	RD26 - Factor de transcripción de la familia NAC de respuesta a la deshidratación
At2g29670	0,64	Proteína de la familia TPR
At1g04770	0,64	Proteína de la familia TPR
At2g34600	0,63	JAZ7 - Involucrado en la degradación del ácido jasmónico
At1g61340	0,63	FBS1 - Proteína de respuesta a estrés
At3g47160	0,63	Proteína con dominio RING/U
At1g32920	0,62	Desconocido
At4g05070	0,62	Proteína de respuesta a daño celular

Continuación del Anexo 7

Tabla con los 20 genes inducidos mediante la sobreexpresión del factor CtHSR1 y reprimidos mediante tratamiento por calor a 38°C durante 3 horas.

Genes	Inducción	Descripción
At1g80840	1,74	WRKY40 - Factor de transcripción de la familia WRKY
At5g22920	1,21	RZPF34 - Proteína de dedo de zinc
At4g15210	1,17	BAM5 - Beta-amilasa inducible por azúcares
At4g35770	1,13	SEN1 - Asociado a senescencia
At3g47340	1,10	DIN6 - Asparagina sintetasa dependiente de glutamina, que se induce durante la senescencia
At1g76650	1,06	CML38 - Proteína con dominio calmodulina que une calcio
At3g15450	1,05	Proteína inducible por aluminio con dominio YGL y LRDR
At4g36500	0,90	Desconocido
At3g62550	0,89	Alfa Hidrolasa
At1g66160	0,87	CMPG1 - Proteína ubiquitina ligasa
At1g55450	0,81	Metiltransferasa
At2g25735	0,81	Desconocido
At5g45830	0,78	DOG1 - Involucrado en el control de la dormancia
At1g19380	0,77	Desconocido
At2g15960	0,71	Desconocido
At1g78460	0,70	Proteína de la familia SOUL
At3g15630	0,68	Desconocido
At1g72900	0,68	TIR - Resistencia a patógenos
At1g04770	0,64	Proteína de la familia TPR
At3g61060	0,62	Proteína del floema de respuesta a daño

Anexo 8: Comparación entre la respuesta transcripcional mediada a través de la expresión del gen *CtHSR1* en arabisidopsis, y mediante la respuesta provocada por el tratamiento con manitol 300mM, metil viológeno 10μM, y por calor a 38°C durante 3 horas.

Tabla con los 13 genes inducidos mediante la sobreexpresión del factor CtHSR1 y mediante tratamiento con manitol 300mM y calor a 38°C durante 3 horas.

Genes	Inducción	Descripción
At2g40000	1,23	Ortólogo del gen de remolacha HSPRO2 que confiere resistencia a nematodos
At2g18700	1,07	TPS11 - Trehalosa fosfatasa/sintasa 11
At5g49450	1,00	bZIP1 - Factor de transcripción que actúa como regulador positivo de la tolerancia a la salinidad y la sequía
At1g27730	0,86	ZAT10 - Confiere tolerancia a sal, y actúa como represor transcripcional
At3g10020	0,84	Desconocido
At5g62470	0,75	MYB96 - Factor de transcripción de la familia MYB
At1g19020	0,72	Desconocido
At1g09070	0,70	SRC2 - Transporte a vacuola desde el ER
At2g27080	0,65	LEA - Tolerancia a la desecación
At4g27410	0,65	RD26 - Factor de transcripción de la familia NAC de respuesta a la deshidratación
At2g29670	0,64	Proteína de la familia TPR
At2g34600	0,63	JAZ7 - Involucrado en la degradación del ácido jasmónico
At1g61340	0,63	FBS1 - Proteína de respuesta a estrés

Continuación del Anexo 8

Tabla con los 5 genes inducidos mediante la sobreexpresión del factor CtHSR1 y reprimidos mediante tratamiento con manitol 300mM y calor a 38°C durante 3 horas.

Genes	Inducción	Descripción
At3g15450	1,05	Proteína inducible por aluminio con dominio YGL y LRDR
At3g15630	0,68	Desconocido
At3g47340	1,10	DIN6 - Asparagina sintetasa dependiente de glutamina, que se induce durante la senescencia
At4g35770	1,13	SEN1 - Asociado a senescencia
At5g22920	1,21	RZPF34 - Proteína de dedo de zinc

Tabla con el único gen inducido mediante la sobreexpresión del factor CtHSR1 y reprimidos mediante tratamiento con manitol 300mM, con metil viológeno 10µM y calor a 38°C durante 3 horas.

Genes	Inducción	Descripción
At4g15210	1,17	BAM5 - Beta-amilasa inducible por azucares

Anexo 9: Comparación entre la respuesta transcripcional mediada a través de la expresión del gen *CtHSR1* en arabisidopsis, y la respuesta transcripcional mediada a través de la pérdida de función del gen *WRKY33* en arabisidopsis.

Genes	Inducción	Descripción
At3g48360	2,01	BT2 - Componente esencial en la activación de la telomerasa, redundante con BT1 y BT3 en el desarrollo del gametofito femenino
At1g80840	1,74	WRKY40 - Factor de transcripción de la familia WRKY
At4g24570	1,36	DIC2 - Transportador mitocondrial de dicarboxilato
At1g80440	1,23	Galactosa oxidasa
At2g40000	1,23	Ortólogo del gen de remolacha HSPRO2 que confiere resistencia a nematodos
At3g47340	1,10	DIN6 - Asparagina sintetasa dependiente de glutamina, que se induce durante la senescencia
At1g76650	1,06	CML38 - Proteína con dominio calmodulina que une calcio
At1g66090	1,01	TIR-NBS - Resistencia a patógenos
At3g44260	1,00	CAF1a - Deadenilación del ARN y defensa
At5g49450	1,00	bZIP1 - Factor de transcripción que actúa como regulador positivo de la tolerancia a la salinidad y la sequía
At2g15890	0,92	MEE14 - Defensa frente a hongos
At5g20230	0,91	SAG14 - Asociado a senescencia
At1g73540	0,90	NUDT21 - Hidrolasa nudix
At4g36500	0,90	Desconocido
At3g62550	0,89	Alfa Hidrolasa
At5g37770	0,88	CML24 - Proteína con dominio calmodulina que une calcio
At3g56400	0,87	WRKY70 - Factor de transcripción de la familia WRKY
At1g66160	0,87	CMPG1 - Proteína ubiquitina ligasa
At1g27730	0,86	ZAT10 - Confiere tolerancia a sal, y actúa como represor transcripcional
At3g10020	0,84	Desconocido
At4g37610	0,81	BT5 - Respuesta a estrés
At1g57990	0,81	PUP18 - Relacionada con el transporte de purina
At1g55450	0,81	Metiltransferasa

Genes	Inducción	Descripción
At2g25735	0,81	Desconocido
At3g49790	0,81	Proteína que une ATP
At1g13260	0,81	EDF4 - Factor de transcripción de respuesta a etileno
At3g46600	0,80	Factor de transcripción de la familia GRAS
At3g04640	0,78	Proteína rica en glicina
At1g28370	0,78	ERF11 - Factor de transcripción de la familia ERF
At5g45830	0,78	DOG1 - Involucrado en el control de la dormancia
At1g19380	0,77	Desconocido
At5g06320	0,76	NHL3 - Respuesta a estrés
At2g26530	0,73	AR781 - Desconocida
At2g27830	0,73	Desconocido
At2g23810	0,70	TET8 - Tetraspanina
At5g60680	0,70	Desconocido
At3g15630	0,68	Desconocido
At1g72900	0,68	TIR - Resistencia a patógenos
At1g49500	0,66	Desconocido
At2g41640	0,66	Glicosiltransferasa
At2g27080	0,65	LEA - Tolerancia a la desecación
At5g16370	0,65	AAE5 - Sintetasa/ligasa dependiente de AMP
At5g47220	0,64	ERF2 - Factor de transcripción de la familia ERF
At4g29780	0,64	Desconocido
At1g25560	0,63	EDF1 - Factor de transcripción de respuesta a etileno
At2g17450	0,63	RHA3A - Proteína de dedos de zinc
At3g47160	0,63	Proteína con dominio RING/U
At1g32920	0,62	Desconocido
At5g51190	0,62	ERF105 - Factor de transcripción de la familia ERF
At5g27420	0,62	CNI1 - Proteína ubiquitina ligasa en respuesta a carbón/nitrógeno
At1g27290	0,62	Desconocido
At3g61060	0,62	Proteína del floema de respuesta a daño
At1g76600	0,61	Desconocido
At5g47230	0,61	ERF5 - Factor de transcripción de la familia ERF
At5g56100	0,61	Proteína rica en glicina
At3g52400	0,60	SYP122 - Regulador negativo de repuesta a defensa



Valencia, 30 de enero de 2015