

Índice de contenidos

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

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

11. Análisis estadísticos.....	59
RESULTADOS	61
1. Evaluación preliminar del crecimiento de la levadura en presencia de los bioestimulantes y establecimiento de las condiciones ideales de estudio	63
1.1. Estudio preliminar de los efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento de la levadura en medio YPD	63
1.2. Estudio preliminar de los efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento de la levadura en medio SD	66
2. Efectos de los bioestimulantes sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés abiótico de la levadura.....	70
3. Estudio del mecanismo de acción del bioestimulante Amino22	74
3.1. Imitación del efecto del Amino22 con peptona de caseína ácida	74
3.2. Análisis del efecto individual de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés de la levadura	76
3.3. Comparación del efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento de las cepas BY4741 y S288C.....	78
3.4. La presencia de aminoácidos reprime la expresión del regulón de Aft1.....	79
3.5. El efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento y tolerancia a estrés es independiente del factor de transcripción <i>AFT1</i>	81
3.6. El efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés se reduce con la activación constitutiva de la ruta GAAC y depende parcialmente de la ruta TORC1 ...	83
3.7. La ruta GAAC controla la expresión del regulón de hierro	86
4. Estudio del mecanismo de acción del bioestimulante Fulvato potásico	91
4.1. El Fulvato potásico provoca un aumento en el contenido intracelular de hierro y la represión de los genes del regulón de Aft1	91
4.2. El uso del Fulvato potásico como fuente de hierro depende de <i>FET3</i>	93
4.3. El incremento de la tolerancia a estrés abiótico en presencia de Fulvato potásico depende de <i>FET3</i>	94
DISCUSIÓN.....	97
CONCLUSIONES	115
BIBLIOGRAFÍA.....	121
ANEXOS	145
Anexo I.....	147
Anexo II.....	149