

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	7
RESUMEN	9
SUMMARY	11
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Estrés salino y su efecto molecular en plantas	14
I.2 Endocitosis y tráfico vesicular pre-vacuolar	18
I.3 Rol de la endocitosis y el tráfico vesicular en la modulación de la percepción hormonal.	22
I.4 Regulación de la endocitosis y del tráfico vesicular pre-vacuolar	23
I.5 Respuesta de la endocitosis y del tráfico vesicular pre-vacuolar al estrés salino.	27
Hipótesis de Trabajo	32
Objetivos	33
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
II.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.	35
II.2 Ensayos de estrés salino y ABA.	35
II.3 Aislamiento de ARN y síntesis de cADN.	36
II.4 Búsqueda y análisis de secuencias.	37
II.5 Análisis de la expresión génica.	40
II.6 Reacciones de la Polimerasa en Cadena (PCR).	41
II.7 Generación de construcciones genéticas.	42
II.8 Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	43
II.9 Localización subcelular de SchMON1 y SchCCZ1.	45
II.10 Tinción GUS de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	46
II.11 Estimación de parámetros morfométricos.	47
II.12 Estimación de la internación de FM4-64.	47
II.13 Tratamiento de Brefeldin-A en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> SchMON1.	47
II.14 Cuantificación y localización del H ₂ O ₂ y autofagosomas.	48

II.15 Detección del Na ⁺ vacuolar.	48
II.16 Microscopía y estadística.	48
III. RESULTADOS	
III.1 Análisis de secuencia de SchMON1 y SchCCZ1.	51
III.2 En <i>Solanum chilense</i> , la transcripción de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> es regulada temporal y espacialmente por estrés salino.	53
III.3 Los genes <i>SchCCZ1</i> y <i>SchMON1</i> restauran el fenotipo de la mutante <i>ccz1a/b</i> y <i>mon1-1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> , respectivamente.	54
III.4 <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> se localizan en parte de la vía endocítica y de tráfico pre-vacuolar en células radiculares de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	56
III.5 Análisis del promotor específico de raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> en condiciones de estrés salino y ABA.	58
III.6 Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> , que expresan y co-expresan <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> , toleran diferencialmente el estrés salino, afectando la expresión de genes de respuesta a estrés.	59
III.7 La expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> afecta la respuesta fenotípica de <i>Arabidopsis thaliana</i> frente a ABA.	63
III.8 La expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> modifica la tasa de endocitosis de células radiculares de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	65
III.9 La expresión y co-expresión de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> promovería cambios en el contenido y localización subcelular de H ₂ O ₂ durante estrés salino.	70
III.10 La expresión y co-expresión <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> modifica la actividad autofágica y la capacidad de acumulación de Na ⁺ durante estrés salino.	76
IV. DISCUSIÓN	
IV.1 <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> de <i>Solanum chilense</i> codifican para una proteína con características de Factor Intercambiador del Nucleótido de Guanina (GEF), y con patrones de expresión que sugieren la participación de ambos durante estrés salino.	82
IV.2 La expresión de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> restaura el tráfico de vesicular y el	85

fenotipo de mutantes de <i>Arabidopsis thaliana mon1-1</i> y <i>ccz1a/b</i> , respectivamente.	
IV.3 El promotor <i>pRaíz</i> mantiene su patrón de expresión y especificidad radicular frente a estrés salino y ácido abscísico, siendo el candidato más adecuado para dirigir la expresión de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	87
IV.4 La expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> le confiere a <i>Arabidopsis thaliana</i> tolerancia a estrés salino e incrementada insensibilidad a ácido abscísico.	89
IV.5 La endocitosis es modulada positivamente en las raíces de los genotipos transgénicos.	92
IV.6 Reducción del contenido de H ₂ O ₂ en raíces y cambios en la expresión de genes involucrados en mecanismos detoxificadores de ROS son evidenciados en los genotipos transgénicos	95
IV.7 Vacuolas de células radiculares de genotipos transgénicos tienen capacidad aumentada para compartimentar Na ⁺ producto del incremento de la fagocitosis y la expresión de <i>AtNHX1</i> .	98
V. CONCLUSIONES	101
VI. BIBLIOGRAFÍA	104
ANEXO	125

ÍNDICE DE TABLAS y FIGURAS

	Página
Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados en esta tesis.	37
Figura 1. Mecanismos generales para la reducción citoplasmática de Na ⁺ .	16
Figura 2. Vías de tráfico de vesículas desde el TGN a la vacuola.	21
Figura 3. Tráfico vesicular pre-vacuolar dependiente del intercambio entre RabF y RabG.	27
Figura 4. Tipos de endocitosis durante estrés salino.	29
Figura 5. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de SchMON1, SchCCZ1 y sus proteínas homólogas.	52
Figura 6. Evaluación de la expresión relativa de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en <i>S. chilense</i> sometida a estrés salino.	53
Figura 7. Efecto de la complementación de la mutante <i>mon1-1</i> de <i>A. thaliana</i> con el gen <i>SchMON1</i> .	54
Figura 8. Efecto de la complementación de la mutante <i>ccz1a/b</i> de <i>A. thaliana</i> con el gen <i>SchCCZ1</i> .	55
Figura 9. Localización subcelular de SchMON1 y SchCCZ1 en células radiculares de <i>A. thaliana</i> .	57
Figura 10. Caracterización de <i>Arabidopsis thaliana</i> que contiene la construcción <i>pRaíz::GUS</i> .	59
Figura 11. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> sobre la tolerancia a estrés salino de <i>A. thaliana</i> .	62
Figura 12. Perfil transcripcional de genes de respuesta a estrés en <i>A. thaliana</i> sometida a estrés salino.	63
Figura 13. Fenotipo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan y co-expresan en sus raíces a <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> frente a la aplicación de ABA exógeno.	64
Figura 14. Efecto de la expresión y co-expresión de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en la dinámica endocítica de FM4-64 en <i>A. thaliana</i> .	67
Figura 15. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de tráfico vesicular en raíces de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> en condiciones de MS (0,5X).	68

Figura 16. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de tráfico vesicular en <i>A. thaliana</i> sometida a estrés salino.	69
Figura 17. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en el contenido de H ₂ O ₂ de <i>A. thaliana</i> durante estrés salino.	71
Figura 18. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en la localización de H ₂ O ₂ de <i>A. thaliana</i> durante estrés salino.	73
Figura 19. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de detoxificación de ROS en <i>A. thaliana</i> sometida a estrés salino.	75
Figura 20. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> sobre la actividad autofágica de <i>A. thaliana</i> durante estrés salino.	77
Figura 21. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en el contenido de Na ⁺ vacuolar en plantas de <i>A. thaliana</i> durante estrés salino.	78
Figura 22. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de movimiento subcelular de Na ⁺ en <i>A. thaliana</i> sometida a estrés salino.	80
Figura S1. Evaluación de la expresión relativa de marcador de estrés <i>SchAREB1</i> en <i>S. chilense</i> sometida a estrés salino.	125
Figura S2. Localización subcelular de GFP en células radiculares de <i>A. thaliana</i> .	126
Figura S3. Patrón de expresión de UGT (At1g73160)	127
Figura S4. Evaluación de la expresión relativa de <i>pRaíz::GUS</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a estrés salino y ABA.	128
Figura S5. Evaluación de la expresión radicular relativa de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> dirigida por el promotor <i>pRaíz</i> en líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	128
Figura S6. Fenotipo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan y co-expresan en sus raíces a <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> .	129