

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
INDICE DE TABLAS	VIII
ABREVIACIONES	IX
RESUMEN.....	1
SUMMARY	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
I.1 Generalidades sobre el estrés salino y estrategias de tolerancia.....	6
I.2 Tráfico vesicular intracelular.....	8
I.3 Relación de la respuesta endocítica y el estrés salino en plantas	10
I.4 Pequeñas GTPasas y su papel durante el tráfico vesicular	12
I.5 Participación de RabGDI durante el tráfico vesicular	14
I.6 Tráfico vesicular y estrés abiótico	16
I.7 RabGDI de <i>Solanum chilense</i> y su participación en la tolerancia a estrés abiótico ..	18
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	21
II.1 Hipótesis.....	22
II.2 Objetivos	23
II.2.2 Objetivos específicos:	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
III.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.....	26
III.2 Ensayos de Salinidad	26
III.3 Tratamiento de salinidad en plantas de <i>Solanum chilense</i>	27
III.4 Determinación de la variación de parámetros eco-fisiológicos.....	27
III.5 Extracción de y purificación de ARN.....	27
III.6 Síntesis de ADNc.....	28
III.7 Análisis de la expresión génica.	28
III.8 Reacción de polimerasas en cadena (PCR) y clonamiento de las secuencias amplificadas.....	31
III.9 Aislamiento y purificación de ADN plasmidial.	32
III.10 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.....	32

III.11	Generación de construcciones genéticas para transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	32
III.12	Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	33
III.13	Ensayos de complementación de levadura.	34
III.14	Análisis de la tolerancia al estrés salino en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	36
III.15	Predicción de estructura mediante modelamiento por homología.	36
III.16	Simulación de acoplamiento molecular Proteína-proteína.	37
III.17	Interacción in vivo entre SchRabGDI1 y SchRabG3e mediante complementación bimolecular de la fluorescencia BiFC.	38
III.18	Determinación de la internalización de FM4-64.	39
III.19	Análisis de la distribución intracelular del sodio (Na ⁺) en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> sometidas a estrés salino.	40
III.20	Detección de especies reactivas de oxígeno (O ₂ ⁻).	41
III.21	Análisis químicos.	41
III.22	Análisis Estadísticos.	42
IV.	RESULTADOS	43
IV.1	Identificación del gen codificante para el inhibidor de la disociación de GDP <i>SchRabGDI1</i> de <i>Solanum chilense</i> .	44
IV.2	<i>RabGDI1</i> de <i>Solanum chilense</i> incrementa su perfil de expresión relativa durante el estrés salino.	48
IV.3	<i>SchRabGDI1</i> codifica una proteína del tipo RabGDI.	53
IV.4	<i>RabGDI1</i> de <i>Solanum chilense</i> interactúa in vivo con la proteína SchRabG3e.	55
IV.5	La expresión heteróloga de <i>RabGDI1</i> de <i>Solanum chilense</i> incrementa la tolerancia al estrés salino en <i>Arabidopsis</i> .	61
IV.6	La expresión heteróloga de <i>SchRabGDI1</i> induce un incremento en la internalización de FM4-64 en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> .	65
IV.7	La expresión heteróloga de <i>SchRabGDI1</i> induce un incremento en la compartimentación de sodio en raíces de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> .	67
V.	DISCUSION	69
V.1	<i>RabGDI1</i> de <i>Solanum chilense</i> codifica para una proteína funcional del tipo inhibidor de la disociación de GDP y es inducida por el estrés salino.	70
V.2	La expresión ectópica <i>SchRabGDI1</i> confiere tolerancia al estrés salino en <i>Arabidopsis</i> .	72

V.3	SchRabGDI1 participa en la regulación la vía endocítica y la distribución del sodio intracelular.....	73
V.4	La acumulación de transcritos de <i>SchRabGDI1</i> durante el estrés salino se correlaciona con la endocitosis masiva y una mayor tolerancia al estrés salino en <i>Solanum chilense</i>	74
VI.	CONCLUSIONES.....	77
VII.	LITERATURA CITADA	79
	BIBLIOGRAFÍA.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de las principales vías conocidas en la respuesta al estrés salino.....	7
Figura 2: Representación del ciclo de las RabGTPasas.....	16
Figura 3: Relaciones filogenéticas entre RabGDI1 de <i>Solanum chilense</i> y otras proteínas del tipo RabGDI.....	45
Figura 4: Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de SchRabGDI1 aislada desde <i>S. chilense</i> y de otras RabGDI homólogas en plantas.....	47
Figura 5: Perfil de expresión génica de <i>SchRabGDI1</i> en tejido vegetativo y reproductivo de <i>Solanum chilense</i>	49
Figura 6: Evaluación de parámetros fisiológicos bajo condiciones de estrés salino en plantas de <i>S. chilense</i>	50
Figura 7: Análisis de la abundancia relativa de transcritos de <i>SchRabGDI1</i> en plantas de <i>Solanum chilense</i> sometidas a estrés salino.....	52
Figura 8: Ensayo de complementación de la cepa mutante de levadura <i>sec19-1</i> con <i>SchRabGDI1</i>	54
Figura 9: Representación in silico de la plataforma de interacción entre SchRabGDI1 y SchRabG3e.....	56
Figura 10: Simulación del acoplamiento molecular dado entre SchRabGDI1, SchRabG3e y proteínas de fusión para la complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC).....	57
Figura 11: Determinación de la Complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) entre SchRabGDI1 y SchRabG3e, en células epidérmicas de hojas de tabaco.....	59
Figura 12: Controles para la determinación de la Complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) entre SchRabGDI1 y SchRabG3e en células epidérmicas de hojas de tabaco.....	60
Figura 13: Evaluación de la presencia y la abundancia relativa de los transcritos de <i>SchRabGDI1</i> en el genotipo control (WT), así como en dos líneas transgénicas independientes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	61

Figura 14: Análisis de plantas heterólogas de <i>Arabidopsis</i> que expresan <i>SchRabGDII</i> sometidas a estrés salino.....	62
Figura 15: Detecciones del anión superóxido (O_2^-) en plantas control y transgénicas que expresan constitutivamente <i>SchRabGDII</i> en condiciones de estrés salino.....	63
Figura 16: Contenido total de sodio (Na^+) en hojas y raíces de <i>A. thaliana</i>	65
Figura 17: Internalización de FM4-64 en células de la raíz de plantas control y transgénicas que expresan constitutivamente <i>SchRabGDII</i>	66
Figura 18: Localización subcelular y comparación de los contenidos de sodio entre líneas transgénicas (<i>SchRabGDII</i>) y plantas control (WT) en raíces de <i>Arabidopsis</i> mediante la sonda fluorescente Sodium Green..	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en esta tesis	30
--	----