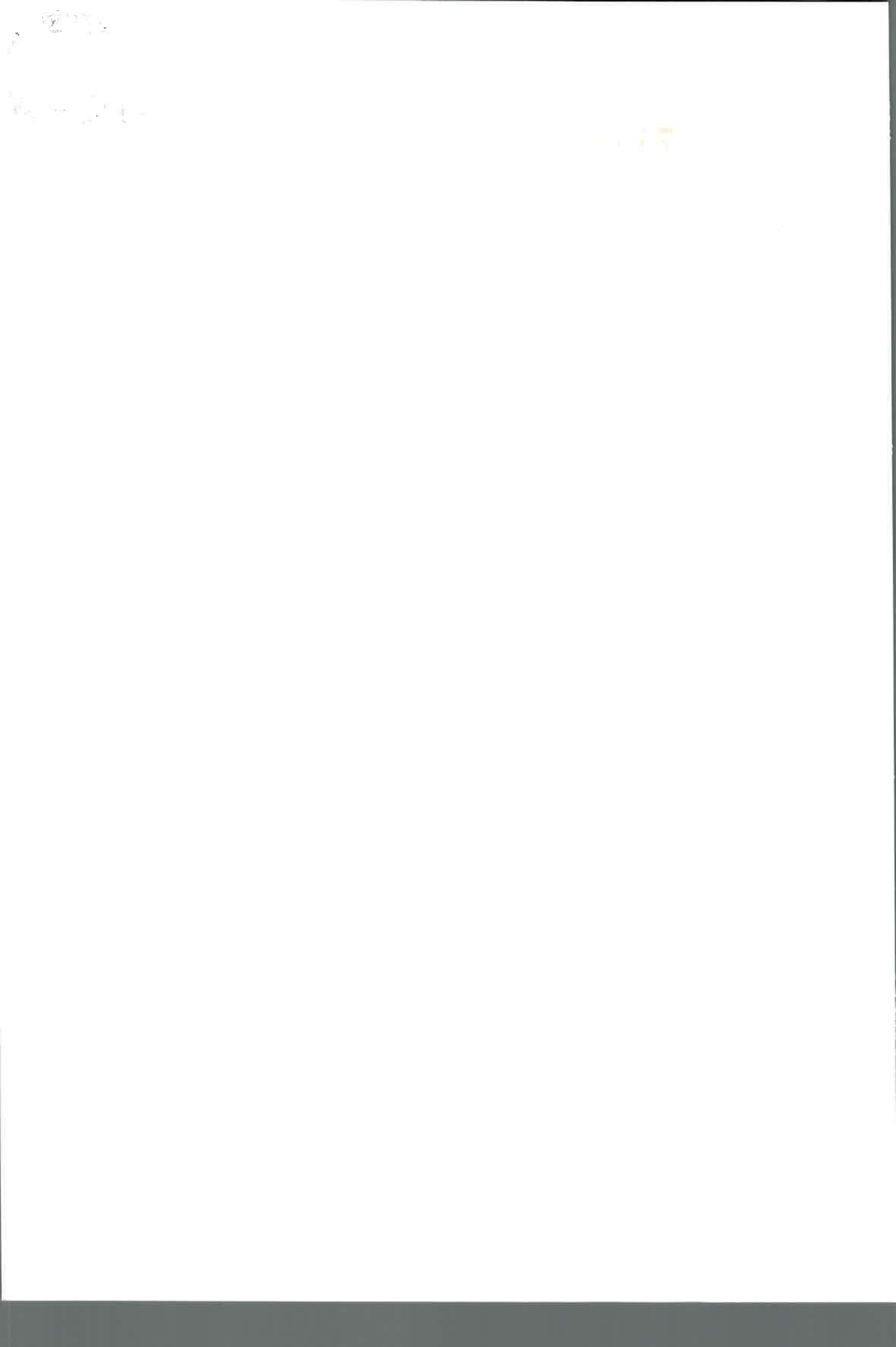


2015 74400

Publicación de libros en folio en la imprenta de la Universidad de Chile

USORACH, JAVIER IVAN

74400





Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Biología Molecular



**“Participación de lípidos señales en la
organización celular frente al estrés salino
y/u osmótico en plántulas de cebada
(*Hordeum vulgare*)”**

Tesis Doctoral
Doctorado en Ciencias Biológicas

Mic. Javier Iván Usorach

-Octubre 2015-

2.29-0

MF:
Clasif:
T. 981

Trabajo presentado por el Microbiólogo **Javier Iván Usorach** para optar al grado de **Doctor en Ciencias Biológicas** por la Universidad Nacional de Río Cuarto (Res. CONEAU 737/13. Categoría A).

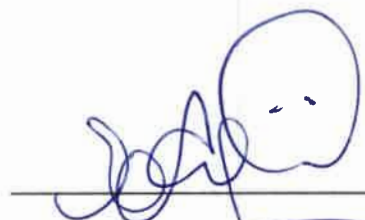
Directora de Tesis:

Dra. Graciela Esther Racagni

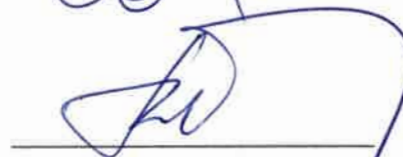


Miembros del Jurado:

Dra. Elizabeth Agostini (UNRC)



Dr. Mario Eduardo Guido (UNC)



Dra. Rita María Ulloa de la Serna (UBA)

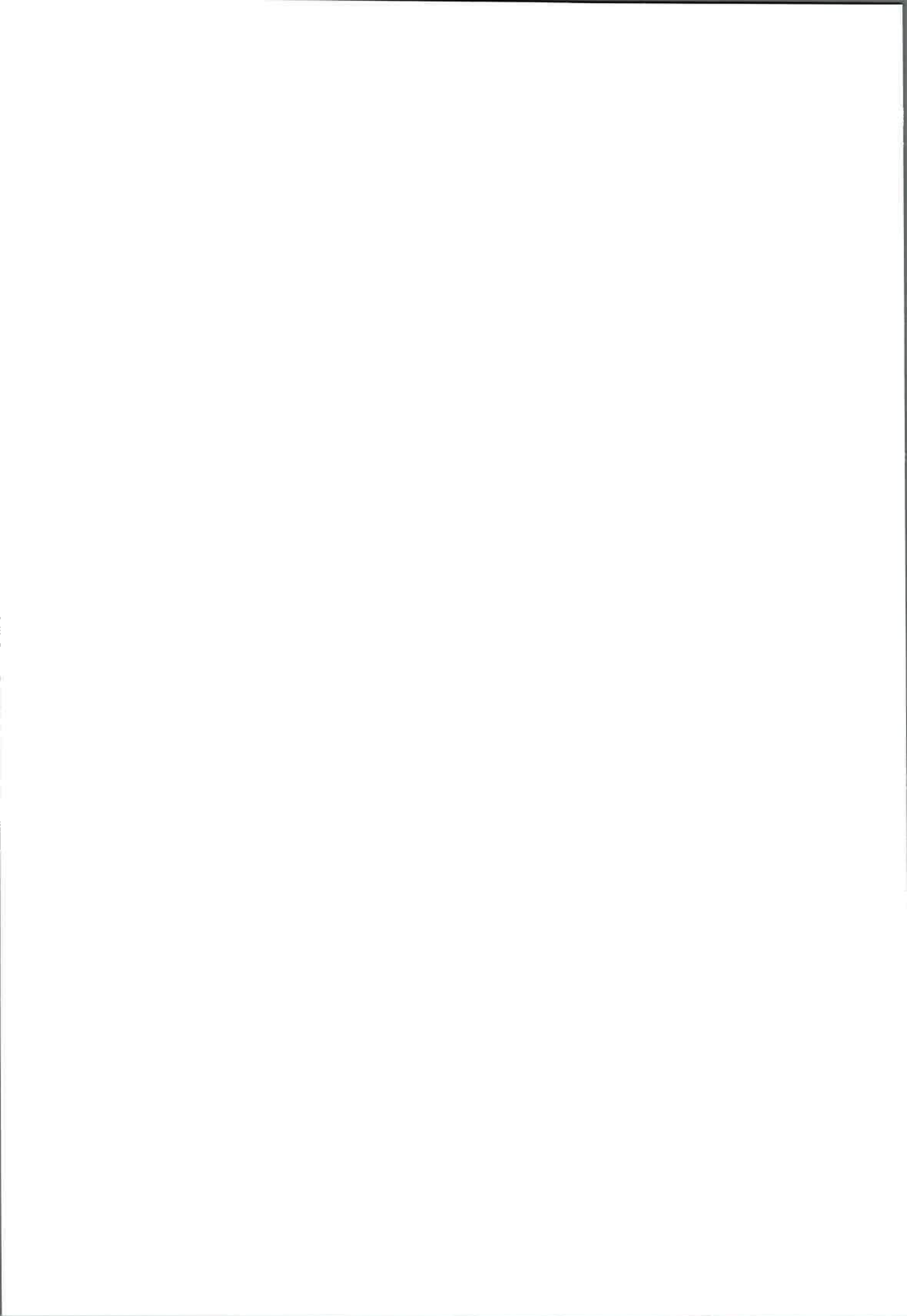


Mic. Usorach Javier

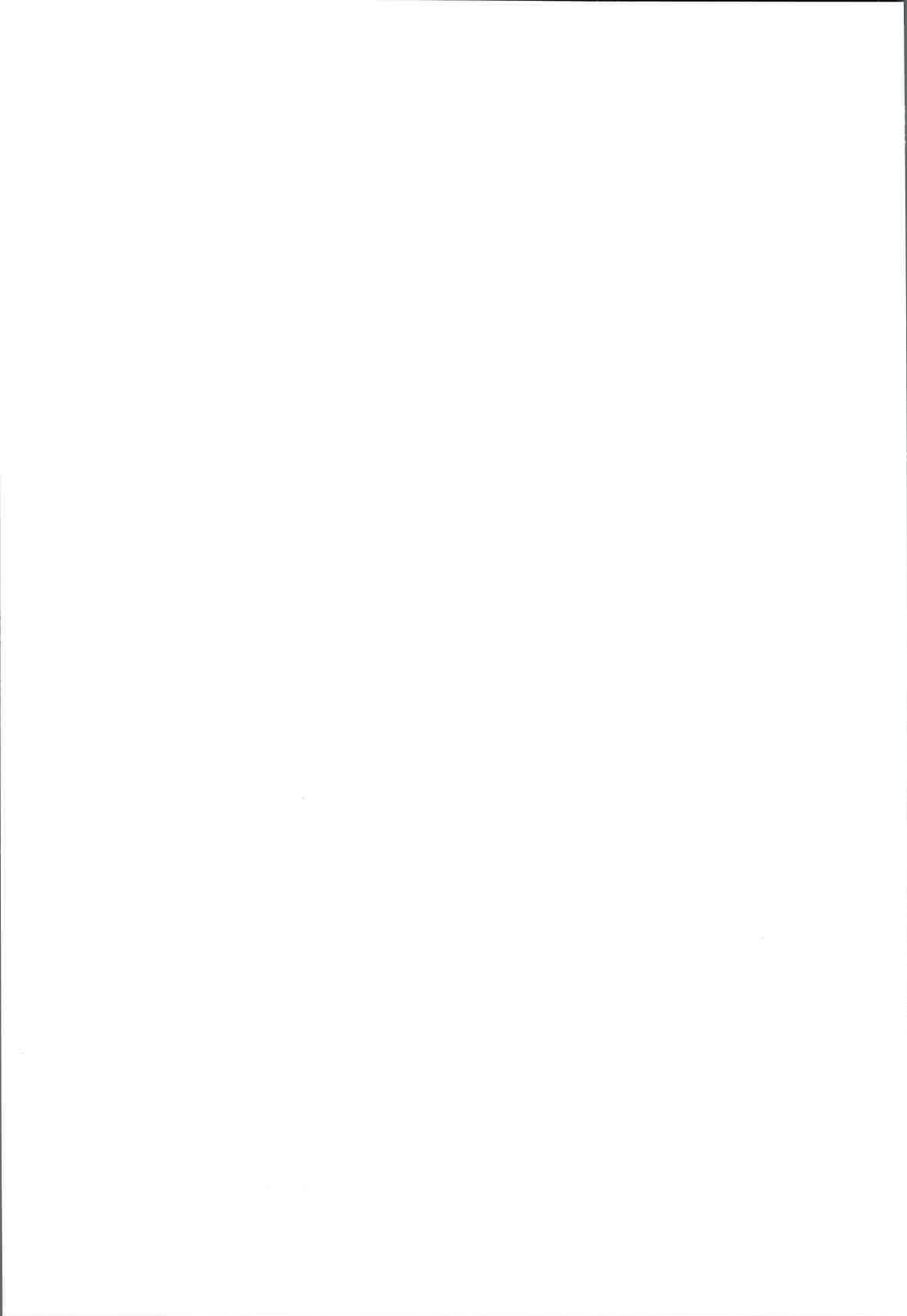


Río Cuarto, 5 de Octubre de 2015

Agradecimientos



**A mis padres:
Estebán y Raquel**



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por haberme permitido obtener mis títulos de Grado y Posgrado.

A los organismos que financiaron la realización de este trabajo de tesis, FONCyT, MINCyT y CONICET.

A la Dra. Graciela Racagni, Kely sos una gran persona, mi mamá académica, gracias por todo este tiempo compartido, desde lo científico a lo personal. Sin vos no hubiese sido esto posible! Mil graciaaas!!

A la Dra. Ana Laura Villasuso, Lauri muchísimas gracias por estar siempre y ayudarme en cada uno de mis informe, y por tantos lindos momentos y risas compartidas.

A la Dra Estela Machado. Teté, gracias por permitirme formar parte del grupo, por los numerosos consejos y todas esas charlas compartidas.

A la Dra. Rita Ulloa, Dra. Elizabeth Agostini y al Dr. Mario Guido por aceptar ser parte de la comisión especial de tesis y por sus valiosos aportes a este trabajo.

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor y al Msc. Armando Muñoz-Sanchez por la experiencia inolvidable compartida en Mérida con ustedes desde lo científico a lo personal, son muy buenas personas y espero algún día verlos nuevamente.

A la Msc. Angela Ku-Gonzales por tu amistad y tú ayuda en el microscopio electrónico durante mi paso por CICY. Gracias che...

Al Dr. Cesar Casale, Dra. Veronica Santander, Dr. Juan Rivelli, Dra. Noelia Monesterolo y Lic. Ayelen Nigra por compartir su experiencia y facilitarme mis experimentos con tubulina y microtúbulos. Mil Gracias!

A la Dra. Herminda Reinoso por su ayuda en los cortes histológicos. Muchas gracias.

A mis padres, Esteban y Raquel, por darme la oportunidad de estudiar y acompañarme durante todo este trayecto. Fueron, son y serán mi ejemplo a seguir, los amo!

A mis hermanas, cuñados y sobrinos, Melina, Silvio, Santiago, Francisco, Silvina, Fabián, Fiorella, Anahí y Jerónimo por estar siempre presente y ayudándome en todo lo que necesite. Los quiero muchoooo!!

A Paula, mi novia y colega profesional, pensar que si no hubiese realizado esta tesis no te conocería. Estoy muy agradecido que seas parte de mi vida, por el cariño que me das, me acompañaste y me acompañas en todo momento. Gracias mi amor. Te amooooo!!!

A todos los colegas que han compartido mi tesis de grado y posgrado dentro del laboratorio: Verónica, Celeste, Marina, Melina, Albana, Anabela, Amparo, Micaela,

Paula, Sergio, Matías. Gracias a cada uno por estar siempre presentes, y por compartir tantos momentos juntos.

A los compañeros y amigos del departamento de biología molecular con los cual compartimos todos estos años: Martin, Gastón, Emiliano, Cristhian, Lucas, Julio, Christopher, Walter, Fernando, Juan Pablo. A todos ustedes gracias!

A Martin Pissinis, Ana Laura Armendariz y Ornella Ontañon por su gran ayuda en los experimentos de biología molecular y por su amistad. Graciaaas!

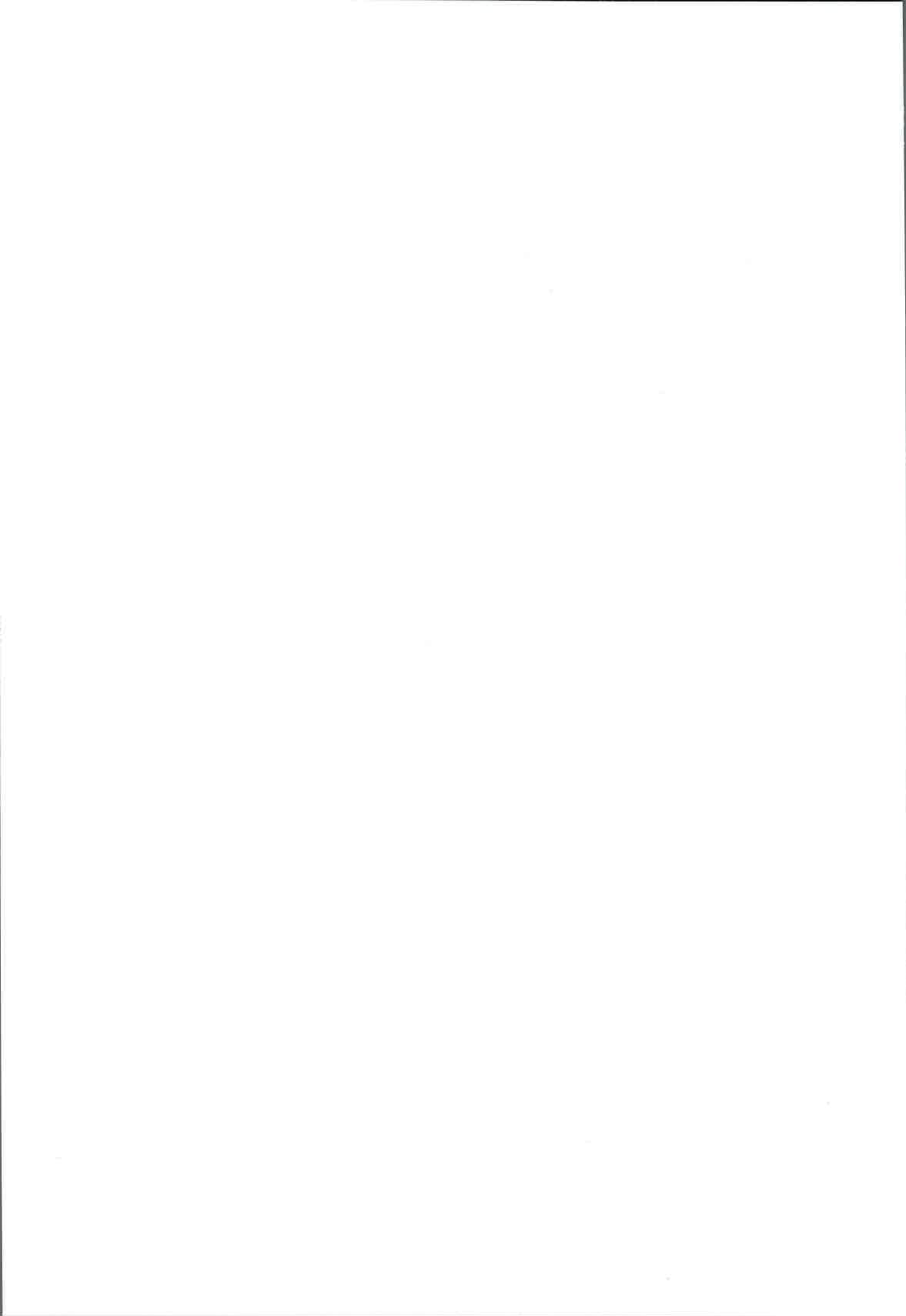
A Diego Alfonzo y Paula Fernigrini por su amistad y por su ayuda en la determinación de Na^+ y K^+ que fue parte de esta tesis. Gracias chicos!!

A mis compañeros de casa en Mérida, Msc. Fernando García González y Msc. José Abraham Trujillo Hernández. por el tiempo compartido y su amistad hasta el día de hoy. Gracias chicos.

A los amigos que conocí en Río Cuarto y que siempre estuvieron y están cuando los necesito: Gastón, Federico, Cristian, Pablo, Martin. Gracias!!

A mis amigos de siempre, Franco, Enzo, Iván, Patricio, Ariel, Alberto, Damián, Germán, Renzo, Leonardo, Boris, Maxi. Gracias.

A todas aquellas personas con las que compartí cursos, seminarios, experimentos, docencia, congresos, etc.... Gracias!



Indice

ABREVIATURAS**RESUMEN/ABSTRACT****1 INTRODUCCIÓN**

1.1 - Generalidades.....	1
1.2 - Características del grano de cebada	3
1.3 - Germinación de la semilla.....	3
1.4 - Sistema de transducción de señales.....	6
1.5 - Estrés en vegetales	10

2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....12**3 MATERIALES Y MÉTODOS**

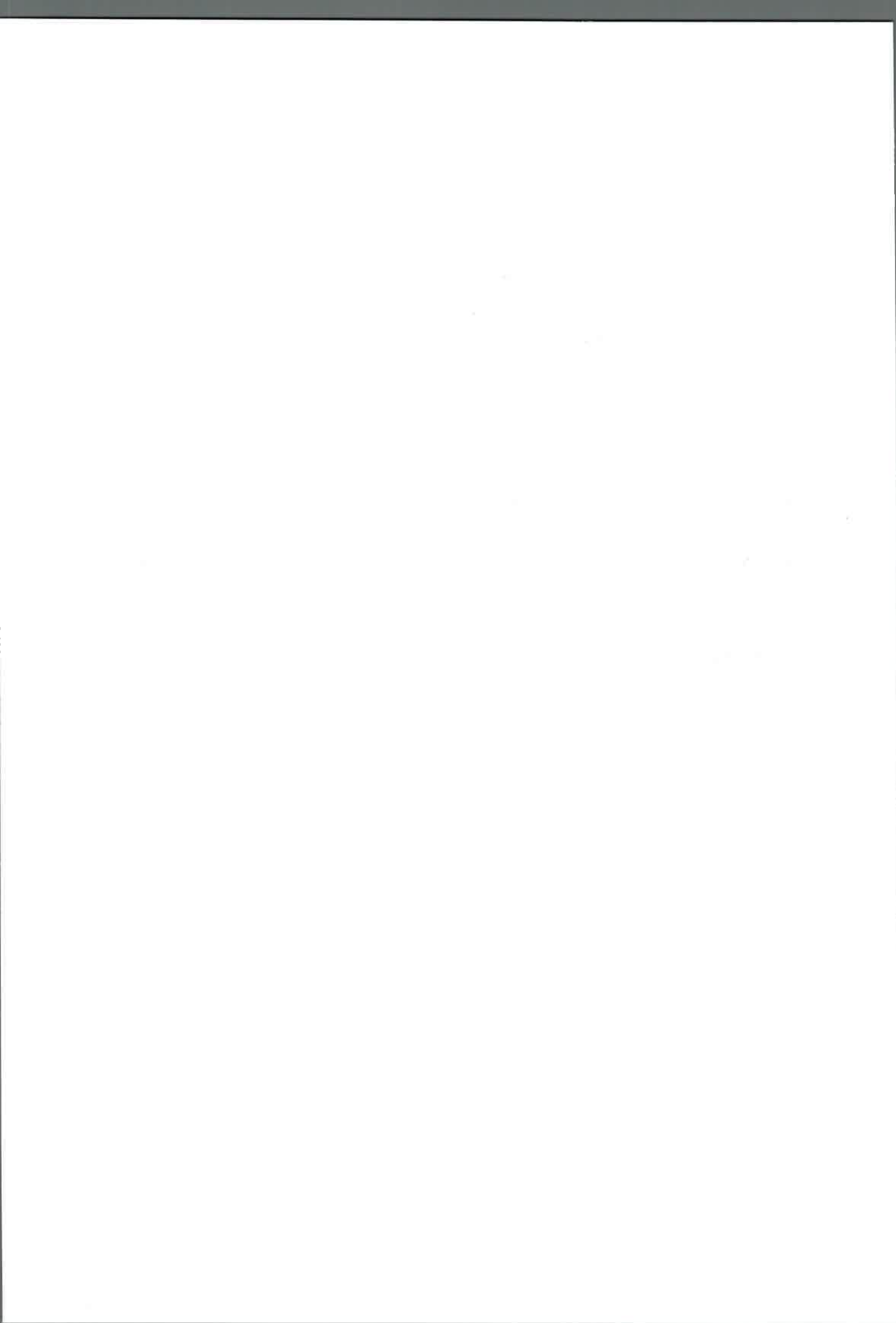
3.1 - Material Biológico.....	14
3.2 - Determinación del potencial osmótico	14
3.3 - Determinación de la concentración de Iones Na^+ y K^+	14
3.4 - Microscopía eletrónica de barrido (MEB)	15
3.5 - Cortes histológicos y tinción de coleóptilos y raíces de cebada	15
3.6 - Microscopia confocal	16
3.7 - Ruptura y homogenización de los tejidos	17
3.8 - Obtención de membranas.....	17
3.9 - Determinación de proteínas.....	17
3.10 - SDS-PAGE, Tinción de Coomassie, Ponceau y Electro-transferencia.....	18
3.11 - Western blot Anti – Fosfolipasa C (PLC).....	19
3.12 - Determinación de la actividad PLC	19
3.13 - Determinación de actividad fosfolipasa D (PLD).....	20
3.14 - Separación de Fosfolípidos	20
3.15 - Obtención de proteínas totales mediante método fenol	20
3.16 - Western blot Anti α tubulina.....	21
3.17 - Cultivo de células COS	21
3.18 - Aislamiento de tubulina a partir de cerebro de rata	22

3.19 - Ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción citosólica y de membrana ..	22
3.20 - Ensayo de unión entre PA y tubulina purificada.....	23
3.21 - Actividad fosfolipasa D a partir del ensayo de unión a PA	23
3.22 - Actividad fosfolipasa D en presencia de taxol y nocodazole.....	24
3.23 - Extracción de ARN	24
3.24 – Obtención de ADNc	24
3.25 – Expresión α tubulina y PLD α en raíces	25
3.26 - Análisis estadístico.....	26

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 - Efecto del estrés salino y osmótico en la germinación.....	27
4.2 - Determinación del potencial osmótico en coleóptilos y raíces de cebada bajo estrés salino y osmótico	29
4.3 - Determinación de la concentración de Na^+ y K^+ en coleóptilos y raíces de cebada bajo estrés salino y osmótico	31
4.4 - Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	34
4.5 - Cortes histológicos de coleóptilos y raíces de cebada bajo estrés salino y osmótico	37
4.6 - Western blot anti-PLC.....	39
4.7 - Actividad de fosfolipasa C <i>in vitro</i>	40
4.8 - Efecto del estrés salino y osmótico en la organización de microtúbulos.....	42
4.9 - Determinación de α -tubulina total en coleóptilos y raíces de cebada bajo estrés salino y osmótico	44
4.10 - Determinación de α -tubulina total en coleóptilos y raíces de cebada bajo diferentes concentraciones de estrés salino y osmótico.....	46
4.11 - Determinación de α -tubulina de membrana en coleóptilos y raíces de cebada bajo estrés salino y osmótico.....	48
4.12 - Determinación de α -tubulina total en cultivo celular COS	50
4.13 – Ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción citosólica	50
4.14 - Ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción de membrana.....	52
4.15 - Aislamiento de tubulina a partir de cerebro de rata	54
4.16 – Ensayo de unión entre PA y tubulina purificada	56

4.17 - Actividad PLD en coleóptilos y raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico	57
4.18 - Actividad PLD en coleóptilos y raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico en presencia de tubulina purificada en la reacción	59
4.19 - Actividad PLD en coleóptilos y raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico en presencia de Taxol y Nocodazole	61
4.20 - Actividad PLD proveniente del ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción de membrana de coleóptilos y raíces en respuesta al estrés salino y osmótico	63
4.21 - Extracción de ARN a partir de coleóptilos y raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico.....	64
4.22 - Expresión de α -tubulina y PLD α de raíces de cebada.....	65
5 CONCLUSIONES.....	66
6 BIBLIOGRAFÍA.....	69



Indice de Figuras

FIGURAS

Figura 1: Diagrama de los principales eventos asociados a la germinación y subsecuente crecimiento post-germinativo

Figura 2: Plántula de cebada

Figura 3: Esquema del sistema de transducción de señales

Figura 4: Porcentaje de germinación de semillas de cebada

Figura 5: Longitud de coleóptilos de cebada

Figura 6: Longitud de raíces de cebada

Figura 7: Potencial osmótico de coleóptilos de cebada

Figura 8: Potencial osmótico de raíces de cebada

Figura 9: Concentración de Na^+ en coleóptilos de cebada

Figura 10: Concentración de K^+ en coleóptilos de cebada

Figura 11: Concentración de Na^+ en raíces de cebada

Figura 12: Concentración de K^+ en raíces de cebada

Figura 13: Microscopía electrónica de barrido en coleóptilos

Figura 14: Microscopía electrónica de barrido en raíces

Figura 15: Cortes histológicos de coleóptilos de cebada

Figura 16: Área total de coleóptilos de cebada

Figura 17: Cortes histológicos de raíces de cebada

Figura 18: Área total de raíces de cebada

Figura 19: Western-blot anti-PLC

Figura 20: Actividad PLC en coleóptilos de cebada

Figura 21: Actividad PLC en raíces de cebada

Figura 22: Inmunodetección de microtúbulos en células de coleóptilos de cebada

Figura 23: Inmunodetección de microtúbulos en células de raíces de cebada

Figura 24: α -tubulina total en coleóptilos de cebada

Figura 25: α -tubulina total en raíces de cebada

Figura 26: Cuantificación α -tubulina total de coleóptilos bajo diferentes concentraciones de estrés salino y osmótico

Figura 27: Cuantificación de α -tubulina total de raíces bajo diferentes concentraciones de estrés salino y osmótico

Figura 28: α -tubulina de membrana en coleóptilos de cebada

Figura 29: α -tubulina de membrana en raíces de cebada

Figura 30: α -tubulina en cultivo celular COS

Figura 31: Ensayo de unión entre PA y tubulina en coleóptilos

Figura 32: Ensayo de unión entre PA y tubulina en raíces

Figura 33: Ensayo de unión entre PA y tubulina de membrana en coleóptilos

Figura 34: Ensayo de unión entre PA y tubulina de membrana en raíces

Figura 35: Modelo hipotético que muestra la interacción entre PA y tubulina a partir de la fracción citosólica y de membrana de coleóptilos y raíces de cebada

Figura 36: Alineamiento de secuencias de aminoácidos pertenecientes a α -tubulina a partir de varios organismos

Figura 37: Extracción de tubulina de cerebro de rata

Figura 38: Ensayo de unión de tubulina al ácido fosfatídico

Figura 39: Ensayo de unión de tubulina con MAPs asociadas al ácido fosfatídico

Figura 40: Actividad PLD en membranas de coleóptilos y raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico

Figura 41: Actividad PLD en membranas de coleóptilos de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico en presencia de tubulina purificada

Figura 42: Actividad PLD en membrana de raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico en presencia de tubulina purificada

Figura 43: Actividad PLD de membrana de coleóptilos en respuesta al estrés salino y osmótico tratadas con taxol y nocodazole

Figura 44: Actividad PLD de membrana de raíces en respuesta al estrés salino y osmótico tratadas con taxol y nocodazole

Figura 45: Actividad PLD proveniente del ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción de membrana de coleóptilos y raíces en respuesta al estrés salino y osmótico

Figura 46: Extracción de ARN de coleóptilos y raíces de cebada

Figura 47: Expresión de α -tubulina y PLD α de raíces de cebada

Abreviaturas

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
AC	Adenilato ciclasa
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosina trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
Ca ²⁺	Ión Calcio
Csp	Cantidad suficiente para
DAG	Diacilglicerol
DAG-k	Diacilglicerol quinasa
DGPP	Diacilglicerol pirofosfato
DNEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DTE	Ditioeritrol
DTT	Ditiotreitrol
EDTA	Ácido etilendiamino-tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-tetraacético
EtBr	Bromuro de etidio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GA	Giberelina
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HEPES	(N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[etano ácido sulfónico])
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IP ₂	Inositol bisfosfato
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisfosfato
IP ₄	Inositol tetrafosfato
IP ₆	Ácido fitico
K ⁺	Ión Potasio
LPA	Ácido lisofosfatídico
MEB	Microscopio electrónico de barrido
Mg ²⁺	Ión Magnesio

Na ⁺	Ión Sodio
NBD-PC	1-acyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4- l)amino]dodecanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine
PA	Ácido fosfatídico
PA-k	Fosfatidato quinasa
PAP	Fosfatidato fosfatasa
PBut	Fosfatidilbutanol
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
Pi	Fósforo inorgánico
PI-k	Fosfatidilinositol quinasa
PIP	Fosfatidilinositol 4-fosfato
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP-k	Fosfatidilinositol monofosfato quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TBS	Tris Buffer Salino
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina
TLC	Cromatografía en capa fina
Tris	2-amino-2-hidroximetil propano-1,3 diol

Resumen

Resumen

Las plántulas en desarrollo, a semejanza de las plantas maduras y las semillas en proceso de germinación, están sujetas a condiciones ambientales desfavorables. El estrés salino es uno de los factores abióticos más importantes que limitan el desarrollo normal y activan una variedad de vías de señalización en los distintos órganos de la planta. Así en respuesta al estrés por salinidad y sequía, las plantas modifican su morfología mediante cambios en el citoesqueleto microtubular y este proceso guarda relación con la vía de transducción de señales mediada por fosfolípidos dependiente de la enzima fosfolipasa D (PLD), la cual cataliza la hidrólisis en la unión fosfato diéster terminal de fosfolípidos estructurales de membrana como la fosfatidilcolina formando ácido fosfatídico (PA) y el grupo polar libre. Al respecto, se observaron cambios morfológicos en raíces y coleóptilos de plántulas de semillas de cebada germinadas 4 días en condiciones estériles y en oscuridad con distintas concentraciones de NaCl y manitol mediante cortes histológicos y microscopía electrónica de barrido (MEB). Se determinó que ambos tipos de estrés causaron una reducción en el crecimiento de las plántulas, donde el estrés salino tuvo un efecto mayor. La morfología externa mediante microscopía electrónica mostró daños en la superficie en respuesta al estrés salino mientras que durante el estrés osmótico no se observaron cambios. Los cortes histológicos no mostraron diferencias en la organización de los tejidos, sin embargo fue observado un aumento del volumen celular durante el estrés salino en ambos tejidos. Mediante microscopía confocal se observaron diferencias en la distribución del citoesqueleto microtubular en presencia de estrés salino en ambos tejidos, mientras que en respuesta al estrés osmótico no hubo diferencias. El contenido de α -tubulina total guardó relación con la modificación en el perfil microtubular, en donde en respuesta al estrés salino disminuyó el contenido de alfa tubulina. Se evaluó también la interacción entre PLD y el citoesqueleto microtubular, en donde PLD interacciona con tubulina. La actividad PLD incrementó en respuesta al estrés salino y osmótico en ambos tejidos, aunque el incremento fue mayor durante el estrés salino. La presencia de tubulina exógena afectó su actividad, mostrando una disminución bajo todas las condiciones analizadas. Compuestos que afectan al citoesqueleto microtubular modulan la actividad PLD, en donde drogas que desestabilizan los microtúbulos como el paclitaxel incrementan la actividad, mientras que drogas que fijan los microtúbulos disminuyen su actividad. Este hecho se relaciona con la capacidad que tiene esta enzima citosólica de

traslocarse a la membrana en respuesta a una señal. En resumen, la raíz como primer órgano que percibe el estímulo desencadena la respuesta a nivel bioquímico, modulando el metabolismo lipídico y en consecuencia desencadena cambios en el citoesqueleto microtubular y esto permite que la planta responda de forma adecuada frente a estas condiciones adversas.

Abstract

Abstract

Developing seedlings, like mature plants and seed germination process are subject to unfavorable environmental conditions. Salt stress is one of the most important abiotic factors limiting normal development and activate a variety of signaling pathways in different organs of the plant. In this way, in response to drought and salt stress, plants modify their morphology through changes in their cytoskeletal microtubule and this process is in relation to the signal transduction pathway mediated by phospholipid dependent on the enzyme phospholipase D (PLD). This enzyme catalyzes in the hydrolysis in the terminal phosphate diester bond of structural membrane phospholipids like phosphatidylcholine forming phosphatidic acid (PA) and the polar group free. In this regard, morphological changes were observed in roots and coleoptiles seeds of barley germinated four days under sterile conditions and in the dark with various concentrations of NaCl and mannitol by histological and electron microscopy (SEM). Both types of stress caused a reduction in the growth of seedlings, where the salt stress had a greater effect. The external morphology by electron microscopy showed surface damage from both tissues in response to salt stress while during osmotic stress changes were not observed. Histological sections showed no differences in the organization of tissues. However, an increase in cell volume was observed for salt stress in both tissues. Changes to the microtubular cytoskeleton by confocal microscopy where differences in the distribution of microtubular cytoskeleton in the presence of salt stress in both tissues were evaluated while in response to osmotic stress, no differences were observed. The content of total alpha-tubulin kept relation to the amendments in the microtubular profile, wherein in response to salt stress decreased the content of alpha tubulin. The interaction between PLD and the microtubule cytoskeleton, where PLD interacts with tubulin, was evaluated. PLD activity was evaluated in the presence of stress, which increased in response to salt and osmotic stress in both tissues, where the increase was higher during salt stress. The presence of exogenous tubulin affected its activity, showing a decrease under all analyzed conditions. Besides, compounds that affect the microtubular cytoskeleton, modulate the PLD activity where drugs that destabilize microtubules, such as paclitaxel, produce an increase on the PLD activity. Securing microtubule drugs decrease their PLD activity. This relates to the ability of this cytosolic enzyme of translocating to the membrane in response to a signal. To summarize, the root as the first organ that senses the response stimulus triggers a series

of biochemical events that modulate lipid metabolism. Consequently the stimulus triggers changes in the microtubule cytoskeleton and allows the plant to respond appropriately.

Introducción

1.1 - Generalidades

Los cereales constituyen la mayor fuente de carbohidratos y proteínas para la dieta humana. La cebada, es una planta monocotiledónea anual perteneciente a la familia de las poáceas (gramíneas), está representada por dos importantes especies cultivadas: *Hordeum distichon* L., que se emplea para la obtención de cerveza, y *Hordeum hexastichon* L., que se utiliza básicamente como forraje para la alimentación animal; ambas especies se agrupan bajo el nombre único de *Hordeum vulgare* L. sp. *vulgare*. La misma se cultiva hoy a gran escala, representando entre el 7 y 8% de la producción mundial de cereales, después del maíz, el arroz y el trigo. La última campaña agrícola en Argentina fue una de las más importantes de los últimos años que aseguran una producción mayor a 14.000.000 de toneladas y un área cultivable de 670.000 hectáreas tanto para el mercado forrajero como para la industria cervecera.

Sin embargo, una problemática mundial en la producción de cereales es debida a la alta salinidad de los suelos y al estrés hiperosmótico al que están sujetos los cultivos (Epstein y col., 1980; Boyer, 1982). El cambio de cualquier factor ambiental, que actúe sobre el vegetal afectando la respuesta bioquímica y fisiológica pudiendo provocar daños o lesiones ocasionalmente, genera una situación de estrés en la planta. La disponibilidad de agua es un factor crucial que modula el crecimiento de las plantas. El estrés osmótico es uno de los estreses abióticos más importantes para la productividad de los cultivos, el cual está relacionado con la deshidratación vegetal bajo niveles de alta salinidad, sequía y condiciones de bajas temperaturas. En general, las situaciones de estrés provocan respuestas complejas y constituyen un problema fundamental para la agricultura, dado que influyen sobre la supervivencia y la productividad de los cultivos. La salinidad del suelo puede ser definida simplemente como la presencia de una excesiva concentración de sales solubles en el suelo, que limitan el crecimiento de las plantas (Maas y Nieman, 1978). Se estima que un tercio de la superficie terrestre está afectada, en mayor o menor grado, por un exceso de sales (Pitman y Lauchli, 2002; Tanji, 2002), hecho que acontece en nuestro país y en los últimos años se han incrementado las áreas salinizadas en el sur de las provincias de Córdoba y San Luis (Cisneros y col., 1997).

Estas condiciones hiperosmolares conllevan a la pérdida de la turgencia de los cultivos, lo cual requiere una respuesta por parte de las plantas para sobrevivir (Bargmann y col., 2009).

El ajuste osmótico proporciona un medio de mantenimiento del contenido de agua en la célula, importante para la actividad celular. De esta forma cuando se presentan situaciones de estrés por salinidad en el suelo, causando una reducción en el potencial osmótico, se produce la acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma y en la vacuola. Los solutos compatibles son metabolitos hidrofílicos y contribuyen al mantenimiento de la turgencia, entre los que se destacan azúcares (sacarosa, fructosa, rafinosa), aminoácidos (prolina y betaína), glicerol, manitol y otros metabolitos de bajo peso molecular (Rodríguez-Perez, 2006). En resultados previos del grupo se observó que raíces y coleóptilos de semillas germinadas bajo estrés salino y osmótico incrementan el contenido de prolina (Usorach, 2010). Esta medición nos permitió determinar que las concentraciones de los efectores utilizados (NaCl y manitol) eran adecuadas para generar plántulas estresadas.

Si se produce una entrada importante de Na^+ en el citosol, la relación K^+/Na^+ fisiológica debe ser restablecida para evitar el efecto tóxico del Na^+ . Esto se consigue en algunas especies con un sistema de transporte localizado en la membrana vacuolar (tonoplasto), que permite acumular Na^+ en la vacuola de manera activa, en contra del gradiente electroquímico del Na^+ . Este sistema consiste en un antiportador Na^+/H^+ (denominado NHX) que acopla la entrada de Na^+ a la salida de H^+ . La presencia de una actividad antiportadora Na^+/H^+ se detectó primero en tonoplasto de especies tolerantes a salinidad como remolacha y cebada, donde se inducía por la presencia de NaCl en el medio (Barkla y Pantoja, 1996). No obstante, la evidencia molecular disponible indica que estas proteínas son ubíquas en las plantas. En el genoma de *Arabidopsis thaliana*, completamente secuenciado, se reconocen hasta 6 isoformas diferentes de genes NHX (Mäser y col., 2001). La compartimentalización del Na^+ en la vacuola, al tiempo que libera al citosol del exceso de Na^+ , contribuye a disminuir el potencial osmótico y ajustar el potencial hídrico celular para permitir la absorción de agua durante el estrés salino (Glenn y col., 1999). Además, la proteína NHX1 de *Arabidopsis* tiene la capacidad de transportar tanto Na^+ como K^+ , pudiendo contribuir al balance osmótico celular y tisular en cualquier condición de crecimiento de la planta (Venema y col., 2002).

1.2 - Características del grano de cebada

El grano está rodeado externamente por una cubierta, el pericarpio, que constituye el salvado. Este se caracteriza por ser rico en proteínas, además de contener una considerable proporción de lípidos, y nada de almidón. El endosperma y el embrión se encuentran dentro de esta capa protectora, y representan aproximadamente el 83% del peso de la semilla respectivamente. El endosperma constituye el tejido nutritivo de los cereales y además es el lugar de reserva de los carbohidratos en forma de almidón, aunque también posee pequeñas cantidades de vitaminas, enzimas y ácidos grasos. Durante el desarrollo del grano, la parte más externa del endosperma se diferencia en una capa de tejido morfológica y fisiológicamente diferente, la aleurona. En el caso de la cebada este tejido consta de varias capas de células, sin embargo, en otras especies suele poseer sólo una. Aunque la aleurona y el endosperma amiláceo tienen un origen común, sólo el tejido de aleurona permanece vivo luego que las reservas de almidón se han almacenado y el grano ha madurado y se ha deshidratado.

Las células de aleurona controlan, en gran parte, la movilización de reservas de la semilla. Está compuesta por células bien diferenciadas cuyo citoplasma se caracteriza por presentar numerosas vacuolas almacenadoras de proteínas y minerales, así también como iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} formando complejos con ácido fítico (IP_6), además de oleosomas, reservas de lípidos neutros unidos al retículo endoplásmico, los cuales constituyen la fuente de carbono que será utilizada previa a la hidrólisis del almidón.

1.3 - Germinación de la semilla

El proceso de germinación comprende una serie de eventos que comienzan con la toma de agua de la semilla seca (imbibición) y se completa cuando una parte del embrión, usualmente la radícula, emerge a través de las cubiertas que lo rodean (Bewley, 1997).

La toma de agua por la semilla madura es trifásica:

Fase I: El primer paso en la germinación es la absorción de agua o hidratación por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria.

Fase II: Representa el verdadero proceso de germinación. El consumo de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse. En esta fase se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el correcto desarrollo de la plántula.

Fase III: Corresponde a la fase de crecimiento. Es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como también la actividad respiratoria (Figura 1)

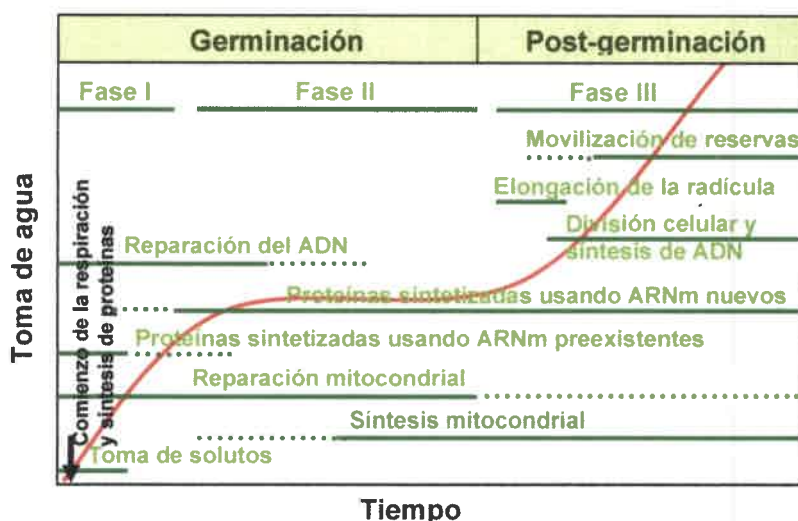


Figura 1: Diagrama de los principales eventos asociados a la germinación y subsecuente crecimiento post-germinativo. El tiempo para los eventos puede transcurrir en horas o semanas, dependiendo de la especie de planta y condiciones de germinación. (Adaptación de la Figura 1. Bewley, 1997).

Si bien para que la semilla germine es necesario que se cumplan estas tres fases, la duración de cada una de ellas va a depender de ciertas propiedades de las semillas, como lo es su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno, además de las condiciones del medio ambiente, como el nivel de humedad, las características y composición del suelo, la temperatura, etc. En las dos primeras fases de la germinación los procesos son reversibles. A partir de la fase de crecimiento se entra en una situación fisiológica irreversible. La semilla que haya superado la fase de germinación tendrá que pasar a la fase de crecimiento y originar una plántula, o por el contrario morir.

Las capas superficiales del grano recogen la humedad, que penetra en el interior a través del micropilo. El grano se hincha, el embrión se hace turgente y aumenta de tamaño. El primer signo de la germinación es el nacimiento de la coleorriza desde la

base del grano. Entonces emerge la raíz principal, seguidas de cerca por las raicillas secundarias (Figura 2). El coleóptilo es una estructura característica del embrión de la familia de las gramíneas, el cual es, en realidad, una primera hoja modificada de tal modo que forma una caperuza cerrada sobre las hojas siguientes y el meristema apical.

Durante la germinación de la semilla, el coleóptilo se aproxima a la superficie del suelo gracias a la elongación del mesocotilo. Su carácter consistente y extremo aguzado, en forma de una vaina puntiaguda endurecida en su extremo superior, lo convierten en una estructura especializada para lograr la emergencia. Inmediatamente a continuación de que el coleóptilo aparece sobre el suelo, da paso a la hoja cotiledonar y a la primera hoja verdadera en rápida sucesión.

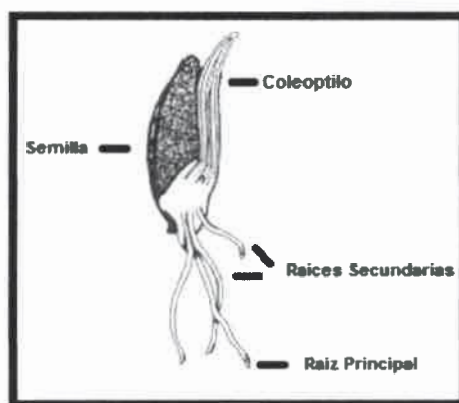


Figura 2: Plántula de cebada. Imagen semilla de cebada germinada en la cual se evidencia la semilla, el coleóptilo, la raíz principal y las raíces secundaria.

La germinación de las semillas está regulada por hormonas, las giberelinas (GAs) regulan el crecimiento celular en el tejido vegetativo, así como también afectan la floración y el desarrollo del fruto. Además, juegan un papel fundamental en el proceso de germinación; dado que regulan la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas, especialmente α -amilasa en la capa de aleurona, lo que contribuye a la movilización de reservas desde el endospermo hacia el embrión.

Durante el desarrollo del grano se produce la acumulación de ácido abscísico (ABA) en el embrión y en el endospermo, el cuál cumple un papel central en el control de la maduración y en la prevención de la germinación precoz del grano morfológicamente maduro, aún no cosechado. La producción de α -amilasas, inducida por GA en la semilla de cebada (*Hordeum vulgare*), es inhibida por ABA, que tiene efecto también sobre la síntesis de proteínas en general. De este modo la actividad α -

amilasa puede ser inhibida por ABA tanto a nivel transcripcional como a través de la actividad enzimática (Fincher, 1989).

El ABA es un compuesto que existe naturalmente en las plantas. Es un sesquiterpenoide (15 carbonos) derivado del ácido mevalónico, siendo el clivaje de carotenoides su principal ruta de biosíntesis en cloroplastos y otros plástidos. El transporte de ABA se realiza fácilmente tanto en el xilema como en el floema, y también en las células del parénquima fuera de los haces vasculares. Su movimiento dentro de las plantas se asemeja al de las GAs.

El ABA regula muchos aspectos agronómicamente importantes del desarrollo de la planta, incluyendo la síntesis de proteínas y lípidos de almacenamiento de semillas, la promoción de la tolerancia a la desecación de semillas y dormancia, el desarrollo de las semillas, la promoción de cierre de los estomas, la morfogénesis embrionaria, senescencia de las hojas y también la defensa contra patógenos.

1.4 - Sistema de transducción de señales

Las plantas como el resto de los organismos vivos enfrentan día a día nuevos desafíos. En particular los vegetales por su condición de sésiles deben responder de forma rápida para sobrevivir y perpetuarse.

Se conoce como transducción de una señal a la manera que tienen las células de elaborar una respuesta a ese estímulo. Así, al recibir una señal responden a ella y la vía por la cual se genera, debe ser extremadamente precisa dado que es crucial para determinar la respuesta final. Como este proceso puede ser a corto o largo plazo, generalmente las vías son finamente reguladas. Un ejemplo es la germinación, proceso irreversible que si ocurre en un escenario inadecuado puede ser poco productivo e incluso fatal.

Estas vías se ponen en funcionamiento cuando un receptor proteico disperso por la superficie celular detecta una señal y transmite la misma al interior, a través de pequeñas moléculas denominadas "segundos mensajeros". De esta forma la señal extracelular activa diferentes rutas metabólicas que transducen la señal externa en interna que se propaga por toda la célula.

Los receptores se pueden agrupar principalmente en dos subfamilias: una de ellas integrada por canales iónicos activados por ligandos y la otra constituida por

aquellos receptores con requerimientos energéticos ya sea asociados a tirosina quinasa o proteínas unidoras de nucleótidos de guanina, llamados proteína G (Crockcroft y col., 1995).

Hasta el momento, uno de los sistemas de transducción de señales más estudiados en plantas es la vía del inositol fosfato o del fosfatidilinositol, en donde se activa una fosfodiesterasa, fosfolipasa C dependiente de fosfoinosítidos (PI-PLC), lo cual resulta en la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂) originando dos segundos mensajeros: inositol 1,4,5 trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). En este sistema los fosfoinosítidos continuamente son sintetizados y degradados por quinasas y fosfatasas específicas, respectivamente. Al momento dos clases de PLC han sido identificadas en plantas, las que hidrolizan PIP₂ denominadas PI-PLC y las que hidrolizan fosfatidilcolina denominadas PC-PLC (Dowd y Gilroy, 2010).

El sistema de transducción se pone en marcha una vez que el ligando se une a su molécula receptora, ésta sufre cambios conformacionales que le permiten interactuar con proteínas de membrana denominadas proteínas G, las cuales están formadas por las subunidades α , β y γ . Al respecto en plantas se han identificado solo una subunidad α (GPA1), una subunidad $\beta\gamma$ (AGB1) y tres subunidades γ (AGG1, AGG2 y AGG3) (Zhao y col., 2004).

Como consecuencia la proteína G se activa: intercambia GDP por GTP y la subunidad α , se separa del dímero $\beta\gamma$. En este estado la subunidad α es capaz de activar a moléculas efectoras tales como la adenilciclase (AC), PLC y PLD.

La presencia de una señal externa produce un recambio en los fosfolípidos de membrana. Uno de estos fosfolípidos, fosfatidilinositol (PI), es un componente de la membrana celular eucariota y existen varios derivados fosforilados que reciben el nombre de polifosfoinosítidos, los cuales están presentes en levaduras, en células vegetales y animales. El PI puede ser fosforilado en la posición 4 del anillo del inositol para originar fosfatidilinositol monofosfato (PIP) por la fosfatidilinositol quinasa (PI-k) y, posteriormente a fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂) por la fosfatidilinositol monofosfato quinasa (PIP-k), fosforilándose en la posición 5 del anillo del inositol. Aunque el PI representa solamente un pequeño porcentaje de los fosfolípidos celulares totales, tiene un papel crucial en los caminos de señalización como precursor de diversas moléculas capaces de actuar como segundos mensajeros.

Como se mencionó anteriormente, la hidrólisis del PIP_2 por acción de una PLC, genera IP_3 y DAG, los cuales pueden disparar una cascada de eventos en forma conjunta o separada. El PIP_2 , además de cumplir su papel como precursor de segundos mensajeros, participa en la regulación de varias funciones celulares como la dinámica del citoesqueleto, tráfico vesicular, transporte iónico, unión de proteínas a membrana y actividad enzimática (Stevenson y col., 2000).

El IP_3 es un producto soluble y difunde al citoplasma celular donde encuentra receptores localizados en vesículas intracelulares, los cuales son reservorio de calcio, otra molécula capaz de actuar como segundo mensajero. El aumento de calcio produce cambios en la actividad de un amplio rango de enzimas tales como proteínas quinasas y enzimas reguladas por calmodulina o puede activar procesos como la secreción.

En plantas, la principal organela que actúa como reservorio de Ca^{2+} movilizable es la vacuola (Stevenson y col., 2000), mientras que en animales es el retículo endoplásmico. Otra diferencia entre ambos organismos, es la forma de metabolizar IP_3 . Una vez que la célula respondió a la señal, la vía del inositol fosfato debe desactivarse. Para ello, el IP_3 se puede metabolizar a través de dos caminos: fosforilarse por una inositol 3-quinasa para producir IP_4 (inositol tetrafosfato) o desfosforilarse por una inositol 5-fosfatasa para producir IP_2 (inositol bisfosfato).

En contraste, el DAG no es soluble en agua, por lo que realiza su función en la membrana plasmática, donde probablemente tiene una gran movilidad. Es ahí donde activa a la proteína quinasa C (PKC) (Berridge, 1993, Divecha e Irvine, 1995). Este hecho parece no acontecer en plantas dado que hasta el presente no se ha encontrado PKC mediante análisis genómicos y proteómicos. En cambio el DAG generado es rápidamente fosforilado a ácido fosfatídico (PA). El DAG puede provenir de otros fosfolípidos, como la fosfatidilcolina (PC) o fosfatidiletanolamina (PE), por activación de la vía fosfolipasa D/fosfatidato fosfatasa (PLD/PAP), o bien por actividad de una PLC específica de PC (PC-PLC). A pesar de que el DAG es ampliamente reconocido como segundo mensajero en células animales, no parece serlo en plantas ni en hongos. En contraste, el PA cumple esta función (Munnik, 2001).

Por otro lado, el DAG se metaboliza rápidamente por acción de una lipasa en glicerol o bien se convierte en PA a través de la diacilglicerol quinasa (DAG-k). Esta enzima es de particular importancia ya que no sólo controla los niveles de DAG en la membrana, sino que también inicia los procesos de resíntesis de PIP_2 , ya que el

producto de DAG-k, PA, puede ser sustrato de una CDP-DAG citidiltransferasa para generar el precursor de PI, y éste, a través de reacciones secuenciales es nuevamente fosforilado a PIP₂.

La producción de PA no sólo representa un mecanismo de atenuación de DAG y forma de resíntesis de polifosfoinosítidos, sino que también es capaz de intervenir en importantes vías de transducción de señales.

En general se asume que un aumento de PA refleja la producción de DAG por actividad de una PLC (Heim y Wagner, 1990; Munnik y col., 1994). Sin embargo, esta vía de transducción de señales puede no ser la única involucrada en la respuesta debido a que la activación de una fosfolipasa D (PLD) cataliza la hidrólisis de fosfolípidos estructurales en la unión fosfato diéster terminal, permitiendo la formación de PA y de un grupo polar libre como colina en el caso de PC (Figura 3).

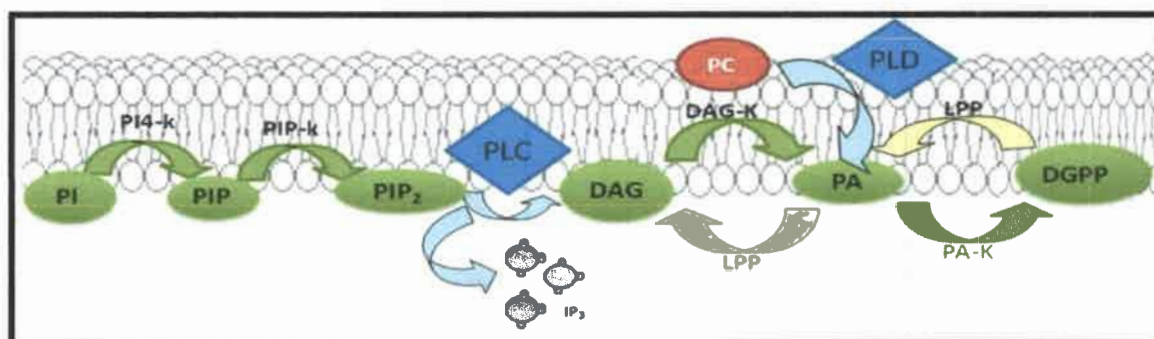


Figura 3: Esquema del sistema de transducción de señales. **Abreviaturas:** PI: fosfatidilinositol, PI-k: fosfatidilinositol quinasa, PIP: fosfatidilinositol monofosfato, PIP-k: fosfatidilinositol monofosfato quinasa, PIP₂: fosfatidilinositol bisfosfato, PLC: fosfolipasa C, IP₃: inositol trisfosfato, DAG: diacilglicerol, DAG-k: diacilglicerol quinasa, PA: ácido fosfatídico, PA-k: fosfatidato quinasa, DGPP: diacilglicerol pirofosfato, PC: fosfatidilcolina, PLD: fosfolipasa D, LPP: lípidos fosfato fosfatasa.

Hasta el momento 12 isoformas de PLD designadas como α (3), β (2), γ (3), δ , ϵ y ζ (2) (en base a la homología de secuencia de la proteína y propiedades bioquímicas), han sido caracterizadas en *Arabidopsis thaliana* mientras que solo dos se encuentran en células animales designadas como PLD1 y PLD2 (Qin y Wang, 2002; Wang, 2005).

En general los mecanismos de activación de PLD pueden ser dependiente de PLC lo cual implica aumento de Ca^{2+} intracelular, o independiente de PLC a través de proteínas G o receptores de tirosina quinasa (Ward y col., 1995; Exton, 1997, Zhao y Wang, 2004).

PA está presente en una muy baja cantidad en las membranas biológicas, constituye menos del 1% del total de fosfolípidos, unas veinte veces menos que PC, el

fosfolípido más abundante de las membranas eucariotas (Welti y col., 2002). Los niveles de PA en plantas cambian rápidamente bajo varias condiciones, que incluyen estreses bióticos (ataque por bacterias y hongos patógenos, inducción de la nodulación) (McDermott y col., 2004) y abióticos (congelamiento, frizado, deshidratación, drogas, estrés salino, escasez de nutrientes, heridas y al ataque de especies reactivas del oxígeno) (Jenkins y col., 2005).

La rápida síntesis de PA y el metabolismo del diacilglicerol pirofosfato (DGPP) indican que ambos componentes podrían cumplir un papel importante en la señalización. Munnik y col., (2000), demostraron que el incremento de los niveles de PA es correlativo con el incremento de los niveles de DGPP, bajo condiciones de estimulación celular. La conversión de PA a DGPP por acción de la actividad fosfatidato quinasa (PA-k) se ve como un mecanismo de atenuación para reducir los niveles de PA, aunque el DGPP por sí mismo, podría funcionar como una molécula señal (Munnik y col., 1996).

No se conoce con certeza cuál es la importancia del DGPP, pero básicamente puede tener alguna función en cualquier proceso en el que esté involucrado PA, ya sea atenuando su señal o cumpliendo por sí mismo alguna función en la señal celular ya que es un lípido minoritario que aumenta drásticamente cuando las células son activadas (Munnik y col., 1998a; Pical y col., 1999). También se especula que podría ser un fosfolípido precursor equivalente al CDP-DAG donde el pirofosfato sea hidrolizado para resintetizar el PI metabolizado durante la señal (Munnik y col., 1998b).

Los fosfolípidos de membrana y la dinámica del citoesqueleto están íntimamente conectados entre sí en la célula eucariota. Lee y col., (2003) demostró por primera vez que PLD está implicada en la regulación del citoesqueleto de actina en cultivo celular de soja, ya que la adición exógena de PA induce polimerización de actina. Además de la regulación en la polimerización/despolimerización de actina PLD puede funcionar como un conector entre el citoesqueleto de actina y compartimentos específicos de la membrana plasmática. Además PLD β o δ puede interactuar tanto con actina como microtúbulos (Gardiner y col., 2001; Ho y col., 2009) y proporcionar así una unión entre el citoesqueleto de actina, el microtubular y la membrana plasmática o endomembranas. Dhonukshe y col., (2003) demostraron en cultivo celular de tabaco que la actividad PLD se correlaciona con la organización de los microtúbulos, Gardiner y

col., (2003) en *Arabidopsis thaliana* y Peters y col., (2007) en el alga *Silvetia compressa*.

¿Cómo se relaciona el citoesqueleto microtubular con la actividad PLD? Al momento se sabe que tanto su producto PA como la enzima son importantes reguladores en el arreglo de microtúbulos corticales y su interacción con la membrana plasmática (Pleskot y col., 2013). Mediante un análisis proteómico se ha observado que tubulina es una proteína blanco de PA (Testerink y col., 2004), pero que la unión no sería directamente, sino a través de una proteína de unión a microtúbulos (MAP) denominada atMAP64-1, ya que el aumento de PA por acción PLD α recluta a atMAP64-1 a la membrana e induce estabilización de los microtúbulos, y esto le confiere la supervivencia frente a estrés salino (Pleskot y col., 2013).

1.5 - Estrés en vegetales

En la naturaleza, las plantas están expuestas a una amplia variedad de condiciones, tales como temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes, al ataque de herbívoros y a las enfermedades que fluctúan de un lugar a otro, temporada a temporada y día a día. Debido a que las plantas son organismos sésiles, la única manera de prosperar o incluso sobrevivir es la de adaptarse a este entorno cambiante de forma rápida y eficiente (Bargmann y col., 2006).

En los últimos años, el papel de los fosfolípidos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en la respuesta de las mismas al estrés biótico y abiótico, se centró principalmente sobre los mecanismos de señalización involucrados (Laxalt y Munnik, 2002; Meijer y Munnik, 2003).

Durante el estrés osmótico la actividad PLC se ve incrementada. Diversos estudios han demostrado que la sal y el estrés hiperosmótico incrementan los niveles de PIP₂ así como también los de IP₃ en pocos minutos (Pical y col., 1999; DeWald y col., 2001). Por otro lado, el DAG formado, es rápidamente fosforilado a PA por acción de una DAG-k, sugiriendo que el DAG indirectamente cumpliría un papel importante en los procesos de señalización desencadenados durante el estrés en las plantas. Se ha observado un incremento en los niveles de PA en respuesta al estrés osmótico en plantas (Frank y col., 2000; Munnik y col., 2000; Katagiri y col., 2001; Thiery y col., 2004). Los niveles de PA aumentan durante el estrés hiperosmótico en el alga verde

Chlamydomonas y en cultivos celulares de tomate, tabaco y alfalfa; tanto PLD como PLC/DAG-k mostraron ser responsables de estos cambios (Darwish y col., 2009).

En general, la actividad PLD está asociada con la respuesta al estrés en plantas, más específicamente, se piensa que juega un rol en la respuesta a patógenos (Young y col., 1996; Chapman, 1998), herbívoros (Lee y col., 1997), estrés osmótico (Frank y col., 2000) y por hormonas como etileno y ABA (Fan y col., 1997; Ritchie y Gilroy, 1998).

En los últimos años se ha demostrado que PA, producto de PLD, ocupa un papel importante en la señalización de ABA durante la germinación de las semillas (Katagiri y col., 2005; Jiang y col., 2013), y su producto fosforilado, DGPP, ha sido confirmado como segundo mensajero en las vías de transducción de señal de ABA (Zalejski y col., 2005). El PA producido por PLD α se une e inhibe a la proteína fosfatasa ABI1 y la señal de ABA induce el cierre estomático (Zhang y col., 2004).

Quizás el hecho más importante de ABA en plantas es su extraordinario rango de efectos fisiológicos, el mismo juega múltiples papeles en embriogénesis, protección de la desecación y síntesis de reserva. Luego de la germinación y durante el crecimiento de la planta adulta, esta hormona puede inducir protección a estrés ambiental, particularmente cuando la planta es dañada mediante acción de drogas o condiciones ambientales adversas.

Además, tratamientos de sequía y salinidad en suspensiones celulares de *Chlamydomonas*, incrementan los niveles de PA y DGPP vía PLD, sugiriendo que estos fosfolípidos también se encuentran involucrados en la señalización durante el estrés osmótico (Munnik y col., 1998b).

En plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a estrés salino se observó que los microtúbulos corticales se despolimerizan rápidamente y se repolimerizan nuevamente formando otra red microtubular, y se cree que esta nueva formación es esencial para la adaptación de la planta al estrés (Wang y col., 2011). Dhonukshe y col., (2003) demostraron que tanto el estrés salino como el osmótico inducen la reorganización del citoesqueleto microtubular y que la actividad PLD está involucrada en esta reorganización, sin embargo el mecanismo de su participación es un tema no totalmente dilucidado.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis: En respuesta a procesos de estrés las plantas modifican su estructura interna y en ello involucran actividades enzimáticas relacionadas al metabolismo de fosfolípidos.

Objetivo general: Estudiar las vías de señalización mediada por lípidos señales y su relación con la organización del citoesqueleto en respuesta a estrés salino y/u osmótico, en coleótilos y raíces de cebada (*Hordeum vulgare*).

Objetivos específicos: En función de lo cambios observados en nuestro laboratorio respecto a los fosfolípidos señales involucrados en la respuesta al estrés, fundamentalmente en el sistema radicular y específicamente el ácido fosfatídico (PA) es que planteamos como objetivos específicos:

1.- Estudiar la participación de actividades enzimáticas involucradas en la transducción de la señal, en plántulas controles y en aquellas sometidas a estrés salino y/u osmótico.

Para ello:

Determinar si la respuesta al estrés involucra la modificación en las actividades de fosfolipasa C (PI-PLC y/o PC-PLC) y de fosfolipasa D (PLD) en plántulas de cebada crecidas en presencia de NaCl y manitol, analizadas por diferentes metodologías: inmunoprecipitación, electroforesis e *immunoblotting* y evaluación de productos liberados.

2.- Determinar la participación del citoesqueleto frente a condiciones de estrés con NaCl y manitol en coleótilos y raíces de cebada.

Para ello:

a) Estudiar la composición de las isoformas de tubulina. Especialmente las descritas en vegetales y que interaccionan con PLD, entre ellas: alfa y beta tubulina, tubulina acetilada, etc. de plántulas controles y crecidas bajo condiciones de estrés.

b) Estudiar la organización del citoesqueleto. Especialmente analizar la participación de PLD en la reorganización de microtúbulos del citoesqueleto.

c) Analizar la participación de PA proveniente de PLD y/o PC-PLC en la reorganización del citoesqueleto de coleóptilos y raíces de cebada, controles y estresados.

Materiales y Métodos

3.1 - Material Biológico

Se utilizaron semillas de cebada (*Hordeum vulgare*, cv. INTA). Las semillas se esterilizaron superficialmente con una solución de NaOCl al 2% (v/v) durante 45 min, se enjuagaron con agua estéril y se neutralizaron con 0.05 N HCl durante 10 min. Luego se hicieron germinar en placas de petri sobre papel de filtro estéril humedecido con agua estéril, en condiciones de oscuridad y a 25°C durante 4 días. Al cabo de este tiempo los coleóptilos y raíces fueron separados de la plántula, congelados con N₂ líquido y conservadas a -80 °C hasta su utilización.

- **Condiciones de estrés:** Las semillas se hicieron germinar en placas de Petri sobre papel de filtro humedecido con soluciones estériles de NaCl (50, 100, 150 y 200 mM), manitol y sorbitol (100, 200, 300 y 400 mM) en condiciones de oscuridad y a 25°C durante 4 días.

3.2 - Determinación del potencial osmótico

Los tejidos de las plántulas controles y sometidos a las condiciones de estrés (coleóptilos y raíces), previamente pesados (1 g) fueron colocados en tubos de ultracentrífuga. Se realizaron tres ciclos de congelado y descongelado en N₂ líquido. Luego se centrifugó a 40.000 xg por 1 h. Se tomaron 15 µl del sobrenadante (fracción citosólica) y se midió la concentración de solutos en nmol/kg en un osmómetro (Vapor Pressure Osmometer 5500 Escor) y se calculó el potencial osmótico de acuerdo a la ecuación de Vant Hoff's ($\Psi_o = -RTC$), donde C: concentración de soluto en mol·l⁻¹, R: constante de gases, T: temperatura en °K.

3.3 - Determinación de la concentración de Iones Na⁺ y K⁺

Los tejidos de las plántulas controles y sometidos a las condiciones de estrés (coleóptilos y raíces), previamente pesados (1 g) fueron colocados en tubos de ultracentrífuga y se realizaron tres ciclos de congelado y descongelado en N₂ líquido. Luego las muestras fueron centrifugadas a 40.000 xg por 1 h. Se tomaron 15 µl del sobrenadante (fracción citosólica) y se midió la concentración de iones Na⁺ y K⁺ en mmol/l mediante el fotómetro de llama Metrolab 615.



3.4 - Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para la observación se utilizaron plántulas crecidas durante 4 días a 25°C en oscuridad bajo condiciones controles con el agregado de agua estéril, 100 mM NaCl para el estrés salino y 200 mM de manitol para el estrés osmótico. Luego de este tiempo las plántulas fueron sometidas a una fijación química del tejido (Ruzin, 1999) mediante el uso de formaldehído (Solución FAA) en refrigeración al menos 24 h para la preservación de los núcleos, cromatina, citoplasma y la estructura en general de la muestra. La solución FAA consiste en:

- Formaldehído 10%
- Etanol 50%
- Acido Acético Glacial 5%
- Agua destilada 35%

Una vez transcurrido el tiempo establecido se elimina la solución FAA y se lava la muestra con cuidado tres o cuatro veces con agua destilada. Luego se procede a la deshidratación del tejido en un gradiente de etanol absoluto durante una hora y en refrigeración en concentraciones crecientes.

Etanol

- 30%
- 50%
- 70%
- 96%
- 100%
- 100%
- 100%

Después de este paso de deshidratación las muestras son secadas a punto crítico con CO₂ líquido (critical point dryer Sandri - 795, Tousimis) metalizadas con oro (Denton vacuum Desk II) y observadas al MEB (JEOL JSM 6360LV).

3.5 - Cortes histológicos y tinción de coleótilos y raíces de cebada

Se utilizaron plántulas crecidas durante 4 días a 25°C en oscuridad bajo condiciones controles con el agregado de agua estéril, 100 mM NaCl para el estrés salino y 200 mM de manitol para el estrés osmótico. Luego de este tiempo las plántulas

fueron sometidas a una fijación química del tejido (Ruzin, 1999) mediante el uso de formaldehído (Solución FAA) en refrigeración al menos 24 h para la preservación de los núcleos, cromatina, citoplasma y la estructura en general de la muestra. La solución FAA consiste en:

- Formaldehído 10 %
- Etanol 50 %
- Acido acético glacial 5 %
- Agua destilada 35 %

Una vez transcurrido el tiempo establecido se eliminó la solución FAA y se lavó la muestra con cuidado tres o cuatro veces con agua destilada. Luego se procedió a la deshidratación del tejido de acuerdo a los siguientes pasos: **1-** Alcohol 70% 3h, **2-** Alcohol 80% 3 h, **3-** Alcohol 90% 3 h, **4-** Alcohol 96% 3 h, **5-** Alcohol 100% 12 h, **6-** Alcohol 100% 6 h, **7-** Alcohol-Xilol (3:1) 3 h, **8-** Alcohol-Xilol (1:1) 3 h, **9-** Alcohol-Xilol (1:3) 3 h, y **10-** Xilol puro 1 noche. Ambos tejidos se separaron de la plántula y se procedió a la inclusión de los mismos en Histowax (parafina de alta pureza con agregado de cera y polímeros). Se llevó a cabo en estufa a 58°C en el siguiente orden: **A-** Histowax-Xilol (1:3) 2 h, **B-** Histowax-Xilol (1:1) 2 h, **C-** Histowax-Xilol (3:1) 2 h, **D-** Histowax puro 2 días. Cada uno de los tejidos incluidos fue colocado en tacos de madera para su corte transversal con un micrótopo rotativo de 10 a 13 µm de espesor. Para la adhesión de los cortes al portaobjeto se colocó una gota de agua destilada y sobre ella se depositaron aproximadamente 6 cortes histológicos y se colocó sobre una plancha calefactora a 46°C para lograr la correcta adhesión. Una vez pegados los cortes en los portaobjetos se los mantuvo en estufa a 26 °C durante 7 días.

Posteriormente las secciones se colorearon con la triple coloración de Hematoxilina-safranina y Fast green (Johansen, 1940), se desparafinaron por pasajes sucesivos en orden creciente de alcohol etílico/xilol y montadas usando Depex. Las imágenes analizadas de los cortes histológicos fueron tomadas con cámara Canon G10 en el microscopio Axiolab (Zeiss®). Tanto los cortes histológicos como la intensidad de las bandas de las inmunodetección fueron analizadas mediante el programa Image J.

3.6 - Microscopia confocal

Las plántulas crecidas en condiciones controles, de estrés salino (NaCl 100 mM) y osmótico (manitol 200 mM) durante cuatro días en oscuridad y a 25°C fueron

procesadas de acuerdo a Sugimoto y col., (2000). Para la visualización de los microtúbulos se utilizó el anticuerpo producido en ratón anti-alfa tubulina (Clon B-5-1-2 Mouse IgG₁-Kappa, Invitrogen) dilución 1:1000, transcurrido el tiempo de incubación establecido se colocó el anticuerpo secundario anti-ratón unido a FITC (F5262, Sigma) dilución 1:2000. Las muestras fueron observadas en el microscopio confocal NIKON ECLIPSE Ti.

3.7 - Ruptura y homogenización de los tejidos

Los tejidos de las plántulas (coleóptilos y raíces), previamente pesados, se trituraron en morteros de porcelana con el agregado de tres ciclos de nitrógeno líquido (para favorecer la ruptura de los mismos) e inhibidores de proteasas: (1 µg/ml leupeptina, 1 mM PMSF y 1 µg/ml aprotinina). La mezcla se homogenizó usando un homogeneizador de vidrio con embolo de teflón, en relación 1/10 p/v, con una solución de homogenización (50 mM HEPES, pH 7,4; 0,25 M sacarosa; 5 mM KCl y 1mM EDTA). De este extracto total se tomaron alícuotas para determinación de actividad enzimática y se congeló en N₂ líquido y se guardó a -80°C hasta su utilización.

3.8 - Obtención de membranas

Para la obtención de las membranas, el homogenato se centrifugó a 1000 xg 15 min. El sobrenadante obtenido se guardó y el precipitado se lavó una vez con la solución de homogenización. El nuevo precipitado (células rotas y restos celulares) se descartó y el sobrenadante se juntó con el anterior y se centrifugó a 105.000 xg durante 60 min, a 4°C. El sobrenadante (fracción citosólica) se congeló en N₂ líquido y se guardó a -80°C hasta su utilización, el precipitado (fracción membranal) se resuspendió en un volumen mínimo de 50 mM HEPES, pH 7,4. La fracción de membrana obtenida se utilizó como fuente enzimática.

3.9 - Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976), con el empleo de albúmina bovina de concentración 1mg/ml como testigo. Se realizó una dilución 1/5 de la suspensión de membranas, se tomó una alícuota de esta dilución, se llevó a 100 µl con agua bidestilada y se le agregó 1ml de reactivo de Bradford. La

reacción se incubó 5 min a temperatura ambiente y luego se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

3.10 - SDS-PAGE, Tinción de Coomassie, Ponceau y Electro-transferencia

Las electroforesis se realizaron en condiciones desnaturalizantes en geles de poli(acrilamida) con el agregado de dodecilsulfato de sodio (SDS) según lo descrito por Laemmli (1970).

Los geles se prepararon de acuerdo al siguiente protocolo:

Componentes	Gel Separador 10 %	Gel Concentrador 4%
Solución acrilamida/bisacrilamida 30:1	3,3 ml	1,3 ml
H ₂ O destilada	4,1 ml	6,1 ml
Tris Buffer pH 8,8	2,5 ml	-
Tris Buffer pH 6,8	-	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
Persulfato de amonio (APS) 10%	50 µl	50 µl
N,N,N,N'-tetrametiletildiamina (TEMED)	5 µl	10 µl

El buffer de corrida consistió en 25 mM Tris-Base, 192 mM Glicina y 0,1 % SDS. Las muestras se prepararon mezclando cantidades iguales de muestra y buffer muestra en un eppendorf y se desnaturalizaron calentándolas a baño María 5 min a 100°C, luego fueron colocadas en hielo 10 min. Centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se sembraron 80 µg de proteínas por calle. La electroforesis se realizó a 200 voltios constantes de acuerdo a Parrota (2010) durante 1 hora aproximadamente hasta que el frente de corrida alcanzó el borde inferior del gel.

Se realizaron dos geles simultáneos y uno de ellos se reveló con tinción de Coomassie para verificar la carga de las calles. El otro gel se utilizó para realizar la electro transferencia.

- **Tinción de Coomassie:** El gel se incubó durante 30 min con el reactivo Coomassie (0,25 gr de Azul de Coomassie Blue R-250, 90,8 ml de metanol, 9,2 ml de ácido acético glacial y agua bidestilada c.s.p. 100 ml) y luego se lavó varias veces con una solución decolorante formada por metanol/agua/ácido acético (6:4:1, v/v).

- **Electro transferencia:** Se utilizaron membranas de nitrocelulosa Amersham y papel de filtro Whatman N° 3. El buffer de transferencia consistió en el buffer de corrida con metanol al 20% pH 8,3. Tanto la membrana como los papeles de filtro y las esponjas se equilibraron con el buffer antes de su uso. La transferencia se realizó a 350 mA (constantes) durante 45 min de acuerdo a Parrota (2010).

- **Tinción de Ponceau:** Para corroborar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, las mismas se incubaron con rojo ponceau S (0.1 % p/v Ponceau S en 5% v/v de ácido acético) durante 5 min. Luego fueron decoloradas con ácido acético al 1% hasta la correcta visualización de las bandas.

Después de la tinción con Ponceau la membrana se bloqueó 1 h a temperatura ambiente con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20.

3.11 - Western blot Anti – Fosfolipasa C (PLC)

Las membranas previamente bloqueadas fueron incubadas con suero inmune anti- PLC (contra dominio catalítico PLC cafeto) obtenido en conejo (dilución 1:1000 en TBS-Tritón) durante 3 h en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron lavados: uno con TBS-Tritón por 15 min y dos por 5 min. Luego se incubó con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo unido a peroxidasa (dilución 1:2000 en TBS-Tritón) durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados con TBS: uno por 15 min y cuatro por 5 min. La reacción con el anticuerpo se detectó mediante el ECL Kit de Amersham.

3.12 - Determinación de la actividad PLC

La determinación de la actividad fosfolipasa C (PLC) mediante la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato se evaluó según Martínez-Estévez y col., (2003) en una mezcla de reacción (50 μ l) que contiene 35 mM NaH_2PO_4 (pH 6.8), 70 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.8 mM CaCl_2 , 200 μ M ^3H -PIP₂/PIP₂ (\approx 333 Bq), 0.08% desoxicolato de sodio y el extracto proteico 20 μ g. La mezcla se incubó a 30°C durante 10 min y la reacción se detuvo con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Finalmente se centrifugó a 13500 xg durante 10 min, el sobrenadante se depositó en viales con 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la liberación de ^3H -IP₃ en un contador de centelleo Beckman LS 6500.

3.13 - Determinación de actividad fosfolipasa D (PLD)

La actividad PLD se midió según Ritchie y Gilroy (1998) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción se formó con 20 mM Mes-NaOH (pH 6.5), 50 mM CaCl₂, 0.25mM, SDS, sustrato fluorescente (1-acyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine, NBD-PC, 10-50 µg), 1% (v/v) 1-butanol, 60 µg de proteínas de la fracción membranal y 10 µg de la fracción citosólica de coleótilos y raíces controles y sometidos a estrés salino y osmótico, en un volumen total de 40 µl. La reacción se inició con la adición del sustrato marcado NBD-PC y se incubó a 30°C por 30 min con agitación (100 rpm). La reacción se detuvo con el agregado de 150 µl cloroformo:methanol (1:2, v/v). Luego se agregó cloroformo (40 µl) y 2M KCl (40 µl), la mezcla se agitó y centrifugó a 10.000 xg por 2 min. Las dos fases fueron separadas, añadiendo 100 µl de cloroformo a la fase acuosa, homogeneizada y centrifugada a 10.000 xg por 2 min, luego la fase clorofórmica se colocó en un tubo limpio. La misma fue removida con N₂ gaseoso, luego resuspendida en 20 µl de cloroformo:metanol (95:5, v/v) y sembrada en placas de TLC (silica gel G, Fisher Scientific).

3.14 - Separación de fosfolípidos

Las muestras fueron sembradas en placas de TLC y resueltas con una mezcla compuesta por 2,2,4-trimetilpentano:ácido acético:H₂O:acetato de etilo (2:3:10:13, v/v). Los lípidos marcados se visualizaron con ImageStation 4000 MM PRO-Carestream Molecular Imaging y cuantificados con ImageJ.

3.15 - Obtención de proteínas totales mediante método fenol

El protocolo se realizó de acuerdo a Parrota (2010) y consiste en el rápido congelamiento en N₂ líquido y macerado en mortero de porcelana hasta la obtención de un polvo fino, a partir de un gramo de tejido en condiciones controles y de estrés. Luego el polvo se transfiere a un tubo eppendorf suplementado con 10 % TCA en 50 mM de DTT (Ditiotreitol) en acetona. Las muestras fueron homogeneizadas y centrifugadas 3 min a 16.000 xg a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 80 % acetona y 50 mM DTT. Luego las muestras fueron nuevamente homogeneizadas y centrifugadas 3 min a 16.000 xg a 4 °C. Se volvió a descartar el sobrenadante y el

precipitado se dejó secar en campana a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo fue añadido fenol pH 8 (Sigma) y SDS-Dense Buffer (2 % SDS- 0.1M Tris-HCl pH 8 - 5% β -mercaptoetanol – 30 % Sacarosa) en relación 1:1. Las muestras se homogeneizaron e incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después de una centrifugación 16.000 \times g por 3 min a 4°C, la fase fenólica superior se transfirió a un nuevo tubo con el agregado de 0.1M de acetato de amonio en 80 % de metanol, se homogeneizaron e incubaron 2 horas a -20°C. Después de una centrifugación a 16.000 \times g durante 5 min a 4°C el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con metanol 100 %. Después de una centrifugación 16.000 \times g por 5 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 80 % de acetona con 50 mM de DTT. Después de una centrifugación 16.000 \times g por 5 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el precipitado final se disolvió en buffer de hidratación (8 M urea – 2M tiourea – 2% Tritón X-100, 40 mM Tris).

3.16 - Western blot Anti α tubulina

Las membranas de nitrocelulosa obtenidas de la transferencia fueron previamente bloqueadas y se incubaron 1 hora en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-alfa tubulina (Clon B-5-1-2 Mouse IgG₁-Kappa, Invitrogen) dilución 1:500 en TBS-Tween 20 (0.1%), transcurrido el tiempo de incubación establecido se retiró el anticuerpo y se lavó 3 veces por 5 min con TBS pH 7,4. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario anti-ratón unido a peroxidasa dilución 1:500 en TBS-Tween 20 (0.1%). durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación establecido se retiró el anticuerpo y se realizó un ciclo de lavado con TBS pH 7,4 durante 10 min. Las muestras se revelaron utilizando el método del 4-Cloro-1-Naftol.

3.17 - Cultivo de células COS

Las líneas celulares COS se cultivaron en los medios DMEM/F12 (1:1) y DMEM respectivamente, suplementadas con un 10% de suero fetal bovino, 10 UI/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomycin y anfotericina B. Las células se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera conteniendo aire/CO₂ (19:1) hasta una confluencia del 90 %. Luego se realizó el recambio del medio DMEM suplementado con 100 mM de NaCl

para estrés salino y 200 mM de manitol para el osmótico y se mantuvo durante cuatro días en las mismas condiciones de cultivo. Transcurrido este tiempo se descartó el medio de cultivo y las células se lavaron con solución fisiológica tres veces. Luego se indujo la lisis celular con el agregado de 1 ml agua estéril. Posteriormente se transfirió a un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón y se homogenizó. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se utilizó para la determinación de α tubulina mediante Western Blot.

3.18 - Aislamiento de tubulina a partir de cerebro de rata

La tubulina fue obtenida a partir de cerebros de rata adulta, por el método descrito por Casale y col., (2001). Los cerebros fueron lavados con buffer MEM (100 mM Mes, pH 6,7, 1 mM MgCl₂, y 1 mM EGTA). Se colocaron en homogeneizador (1 g de tejido/0,8 ml de buffer MEM) y se homogeneizó (15 veces) a 4 °C. El homogenato se centrifugó a 100.000 \times g durante 40 min a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionó 40 % de glicerol y se lo incubó 20 min a 37 °C. Luego de esta incubación la muestra conteniendo formación de microtúbulos, se centrifugó a 70.000 \times g durante 30 min y se resuspendió el precipitado en buffer MEM a 4 °C (conteniendo tubulina y las MAPS), a partir de esta preparación se purificó la tubulina por pasaje en columna de intercambio iónico conteniendo fosfocelulosa.

3.19 - Ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción citosólica y de membrana

Sobre membranas de nitrocelulosa (0.2 μ m Sigma) se sembró 10 μ g de ácido fosfatídico (PA) y cloroformo (solvente de la solución de PA). Luego las membranas fueron bloqueadas durante 1 h en una solución al 5% de leche descremada en TBS-Tween 20 (0.1%) en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo las membranas fueron lavadas brevemente en TBS pH 7,4 para quitar el exceso de la solución de bloqueo. Las mismas fueron incubadas por 24 h a 4 °C con 100 μ g de la fracción de membrana 105.000 \times g y citosólica de coleóptilos y raíces controles y sometidos a estrés salino y osmótico. Transcurrido este tiempo las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 min en TBS y luego incubadas durante 1 h con el anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-alfa tubulina (Clon B-5-1-2 Mouse IgG₁-Kappa,

Invitrogen) dilución 1:500 en TBS-Tween 20 (0.1%), luego se retiró el anticuerpo y se lavó 3 veces por 5 min con TBS pH 7,4. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario anti-ratón unido a peroxidasa dilución 1:500 en TBS-Tween 20 (0.1%) durante 1 h. a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el anticuerpo y se realizó un ciclo de lavado con TBS pH 7,4 durante 10 min. Las muestras se revelaron durante un minuto utilizando el método colorimétrico con el uso del 4-Cloro-1-Naftol.

3.20 - Ensayo de unión entre PA y tubulina purificada

Sobre membranas de nitrocelulosa (0.2 μm Sigma) se sembraron 10 μg de ácido fosfatídico (PA) y cloroformo (solvente de la solución de PA). Luego las membranas fueron bloqueadas durante 1 h en una solución al 5% de leche descremada en TBS-Tween 20 (0.1%) en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo las membranas fueron lavadas brevemente en TBS pH 7,4 para quitar el exceso de la solución de bloqueo. Las mismas fueron incubadas por 24 h a 4 °C con el agregado de 6 μg de tubulina aislada de cerebro de rata. Transcurrido este tiempo las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 min en TBS y luego incubadas durante 1 h. con el anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-alfa tubulina (Clon B-5-1-2 Mouse IgG₁-Kappa, Invitrogen) dilución 1:500 en TBS-Tween 20 (0.1%), transcurrido el tiempo de incubación establecido se retiró el anticuerpo y se lavó 3 veces por 5 min con TBS pH 7,4. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario anti-ratón unido a peroxidasa dilución 1:500 en TBS-Tween 20 (0.1%) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el anticuerpo y se realizó un ciclo de lavado con TBS pH 7,4 durante 10 min. Las muestras se revelaron durante un minuto utilizando el método colorimétrico con el uso del 4-Cloro-1-Naftol.

3.21 - Actividad fosfolipasa D a partir del ensayo de unión a PA

Las membranas de nitrocelulosa fueron procesadas de acuerdo al punto 3.9, transcurrido el tiempo de incubación con la fracción membranal de coleóptilos y raíces controles y sometidas a estrés, fueron lavadas 3 veces durante 10 min en TBS-Tween 20 (0.1%). La extracción de las proteínas unidas al ácido fosfatídico se realizó de acuerdo a Kim y col., (2013). A las membranas se le añadió 100 μl una solución 9 M de urea durante 1 h en agitación. Se retiró la membrana (las mismas fueron expuestas a vapores de yodo para corroborar la extracción del lípido) y al sobrenadante se le añadió 400 μl

de metanol, se homogeneizó y se centrifugó a 9000 xg durante 2 min. Luego se agregó 200 μl de cloroformo y 300 μl de agua y se centrifugó a 9000 xg durante 2 min. Se extrajo la fase superior, se colocaron 300 μl de metanol y se centrifugó a 16000 xg durante 10 min. Luego las muestras se secaron en N_2 gaseoso. Se resuspendieron en 13 μl de Hepes 50 mM y se procedió con la medición de la actividad de acuerdo al punto 3.5.

3.22 - Actividad fosfolipasa D en presencia de taxol y nocodazole

Coleóptilos y raíces (300 mg y 500 mg) controles y estresadas germinadas en condiciones de oscuridad a 25°C durante 4 días fueron separados de las plántulas, colocados en viales durante 1 h. (en agua para los controles y en solución 100 mM de NaCl para el estrés salino y 200 mM de manitol para el estrés osmótico) con una concentración final de 10 μM de paclitaxel (taxol) y 20 μM de nocodazole. Transcurrido el tiempo de incubación se descartó la solución y se procedió a la obtención de membranas de acuerdo al punto 3.2.

3.23 - Extracción de ARN

El ARN total fue obtenido a partir de 100 mg de coleóptilos y raíces (controles, estrés salino y osmótico) mediante el Kit de extracción *rna isolation from plant* (NucleoSpin RNA Plant) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se sembraron 2 μl de ARN en gel de agarosa al 1% con el agregado de 10 $\mu g/ml$ de bromuro de etidio (EtBr) y se visualizaron en un transiluminador UV.

3.24 - Obtención de ADNc

2 μg del ARN obtenido en la extracción fue sometido a un tratamiento con DNAsa (DNAsa kit Quiagen).

La mezcla de reacción fue la siguiente:

Buffer DNAsa 1X	1 μl
H ₂ O DNAsa/RNAsa libre csp.	10 μl
DNAsa	2 μl
ARN	2 μg

Las condiciones fueron 37°C durante 30 min. Luego se adicionó 1 ul de RQ-DNAsa stop y se incubó 10 min a 65°C para inactivar la DNAsa.

El RNA tratado con DNAsa fue usado para la obtención DNAc.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

H ₂ O csp.	50 µl
Buffer AMV (10x)	5 µl
dNTP (10mM)	2,5 µl
Cebadores	2,5 µl
Mg ²⁺ (50mM)	1 µl
AMV	0.5 µl
RNA	10 µl

Las condiciones fueron las siguientes:

28°C 20 min
45°C 45 min
70°C 10 min

3.25 – Expresión α tubulina y PLD α en raíces

Para determinar la expresión de los genes α -tubulina y PLD α se realizó la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa, empleando cebadores específicos. Estos cebadores denominados PLD α conducen a la amplificación de un producto de PCR de 335 pb: (5'-GGTTCGAGTCCTTCCACATC-3') e (5'GTCCTGGTACAGCGTCACCT-3') y Tub A de 524 pb: (5'-AGTGTCTGTCCACCCACTC-3') e (5'-CCAGGTGGCTGGTAGTTGAT- 3').

La mezcla de PCR fue la siguiente:

H ₂ O csp.	50 µl
Buffer Taq (10x)	5 µl
dNTP (10mM)	2,5 µl
Cebadores	2,5 µl
Mg ²⁺ (50mM)	2,5 µl
Taq	1 µl
ADNc molde	5 µl

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

Un ciclo de desnaturalización a 94°C: 2 min

35 ciclos de

94°C: 30 s

55°C: 1 min

68°C: 2 min

Un ciclo final de elongación a 68°C: 7 min

3.26 - Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos se analizaron estadísticamente. Las diferencias significativas se obtuvieron por análisis de la varianza (ANOVA) y el test a posteriori de Duncan con un índice de confianza del 95% utilizando el programa “Info Stat”.

Resultados y Discusión

4.1 - Efecto del estrés salino y osmótico en la germinación

Con el objetivo de determinar el efecto del estrés salino y osmótico sobre la germinación de la semilla de cebada se utilizó NaCl, manitol y sorbitol usando diferentes concentraciones de los mismos (50-200 mM para el primero y 100-400 mM para el segundo y tercero). Los resultados indican que el estrés salino (NaCl) y osmótico (manitol y sorbitol) inhiben la germinación de las semillas de manera dependiente de la dosis (Figura 4). Concentraciones de 200 mM de NaCl y 400 mM de manitol y sorbitol resultaron ser inhibitorias para el desarrollo de la misma (resultados no mostrados). Sin embargo a bajas concentraciones de NaCl, manitol y sorbitol (50 mM de NaCl y 100 mM de manitol y sorbitol) ya se observó una reducción en la germinación luego de 96 h de imbibición.

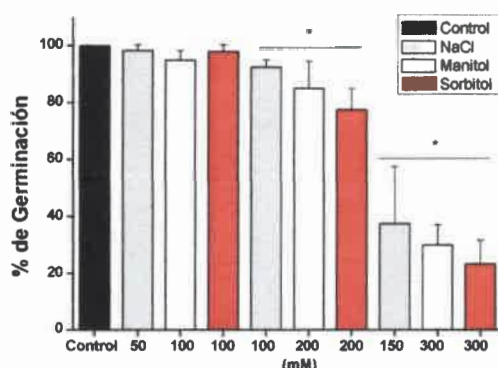


Figura 4: Porcentaje de germinación de semillas de cebada. Las semillas fueron germinadas en condiciones controles, de estrés salino (50, 100 y 150 mM NaCl) y osmótico (100, 200 y 300 mM manitol y sorbitol) en oscuridad a 25°C durante 4 días. Los resultados son expresados como porcentaje de germinación con respecto al control y corresponden a la media \pm S.E., $n=40$, $p<0.05$.

Resultados similares fueron observados en otras variedades de cebada y trigo (Othman y col., 2006; Saboora y col., 2006). El mecanismo de inhibición de la germinación en presencia de NaCl puede ser debido a una insuficiente absorción de agua o tal vez a un efecto tóxico en el embrión (Azza y col., 2007). Nuestros resultados bajo estrés salino y osmótico (manitol) no fueron estadísticamente significativos, por lo que la inhibición pudo deberse tanto a un efecto osmótico como iónico.

La figura 5 muestra la longitud de coleóptilos de semillas germinadas bajo ambos tipos de estrés. El estrés osmótico y salino inhibe el crecimiento del tejido a bajas concentraciones de los efectores. A concentración de 50 mM el estrés salino

disminuyó la longitud en un 20% con respecto al control, el osmótico por manitol un 66% y por sorbitol a la misma concentración un 20%. A concentraciones de 100 mM el estrés salino inhibió un 29%, el osmótico un 62 y 67% para manitol y sorbitol respectivamente, no siendo significativa la diferencia entre ellos. A la máxima concentración utilizada el estrés salino (150 mM) inhibió un 78%, el osmótico un 88% para manitol y un 84% para sorbitol.

En cuanto a la longitud de la raíz (Figura 6) también se observó una disminución de manera dependiente de la dosis, y a concentraciones de 100 mM para el estrés salino y 200 mM para el osmótico la longitud disminuyó aproximadamente un 30% con respecto al control y cabe destacar que a esta concentración no hay diferencias significativas en el uso del agente osmótico.

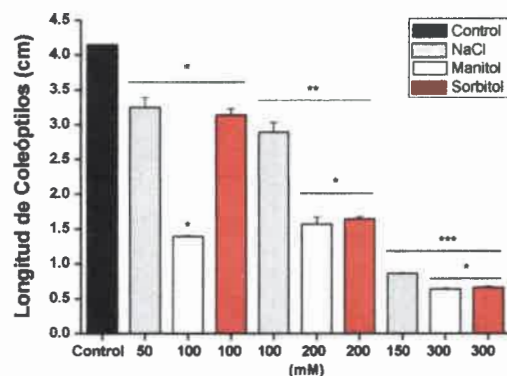


Figura 5: Longitud de coleóptilos de cebada. Las semillas fueron germinadas en condiciones controles, de estrés salino (50, 100 y 150 mM NaCl) y osmótico (100, 200 y 300 mM manitol y sorbitol) en oscuridad a 25°C durante 4 días. Los resultados son expresados como longitud en centímetros y corresponden a la media \pm S.E., $n=30$, $p<0.05$.

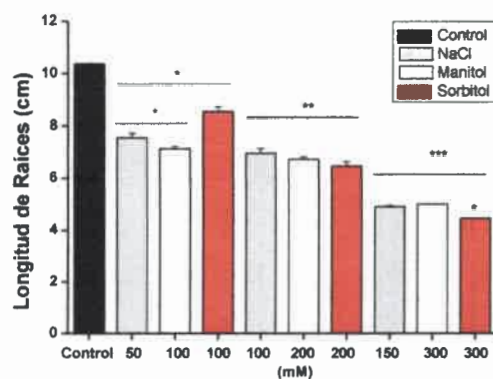


Figura 6: Longitud de raíces de cebada. Las semillas fueron germinadas en condiciones controles, de estrés salino (50, 100 y 150 mM NaCl) y osmótico (100, 200 y 300 mM manitol y sorbitol) en oscuridad a 25°C durante 4 días. Los resultados son expresados como longitud en centímetros y corresponden a la media \pm S.E., $n=30$, $p<0.05$.

Si bien el crecimiento de la parte aérea y de la raíz en las plantas están coordinados, el tamaño relativo de cada uno varía en respuesta a las condiciones ambientales (Hsiao y Xu, 2000). Esto se observó en coleóptilos donde el estrés osmótico (manitol) redujo un 50% la longitud a todas las concentraciones ensayadas con respecto al estrés salino, mientras que en raíces no se observó este efecto. Breckle (2002) observaron que la disminución de la longitud de cada tejido en respuesta a las condiciones de estrés salino y osmótico es una respuesta adaptativa por parte de las plantas frente al estrés.

En base a estos resultados podemos inferir que tanto el estrés salino como el osmótico inhiben de manera dosis dependiente la germinación de las semillas y longitud de cada tejido de la plántula. Al no haber diferencias significativas en el uso del agente osmótico (manitol y sorbitol) a las concentraciones elegidas para los siguientes ensayos (200 mM) se procedió a utilizar como efector al manitol, el cual es utilizado con mayor frecuencia que el sorbitol como agente osmótico.

4.2 - Determinación del potencial osmótico en coleóptilos y raíces de cebada bajo estrés salino y osmótico

Se conoce que el estrés salino y/u osmótico afecta el potencial osmótico debido a la acumulación de solutos en el citosol y la vacuola. Esta respuesta tiene como finalidad realizar un ajuste osmótico para que la célula pueda adaptarse al estrés. Para conocer si este mecanismo se pone en marcha en coleóptilos y raíces sometidos a estrés se decidió medir este parámetro fisiológico. La figura 7A muestra que el potencial osmótico de los coleóptilos tratados con NaCl o manitol disminuyó, de -0,6 (coleóptilos controles) a -1,3 y -1,6 MPa, respectivamente. Un efecto más pronunciado bajo estrés osmótico se observó debido al aumento en la concentración de solutos (Figura 7 B) (células controles 0.32 mol/kg., tratadas con Na⁺ o manitol 0.44 mol/kg y 0.65 mol/kg, respectivamente).

En la figura 8 A se observa que el estrés salino y osmótico en raíces provoca también una disminución en el potencial osmótico semejante a lo observado en el otro tejido. A diferencia de los coleóptilos, bajo estrés salino la disminución del potencial fue mayor que el estrés osmótico debido a la acumulación de solutos (Figura 8 B)

(células controles 0.32 mol/kg., tratadas con Na⁺ o manitol 0.56 mol/kg y 0.45 mol/kg, respectivamente).

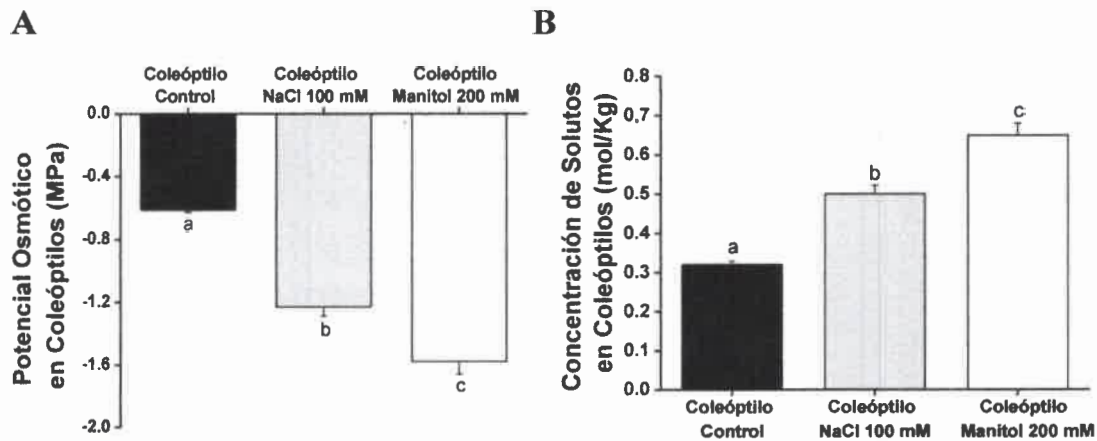


Figura 7: Potencial osmótico de coleóptilos de cebada. El tejido (1 g) se homogenizó con N₂ líquido, luego se centrifugó a 40.000 xg durante una hora. La concentración de solutos se midió en el sobrenadante con un osmómetro (Vapor Pressure Osmometer 5500 Escor) y el potencial osmótico se calculó de acuerdo a la ecuación de Vant Hoffs ($\Psi_o = -RTC$). Los resultados se expresan en MPa (Mega Pascales) y corresponden a la media \pm S.E., n=3, $p < 0.05$. A) Potencial Osmótico. B) Concentración de solutos.

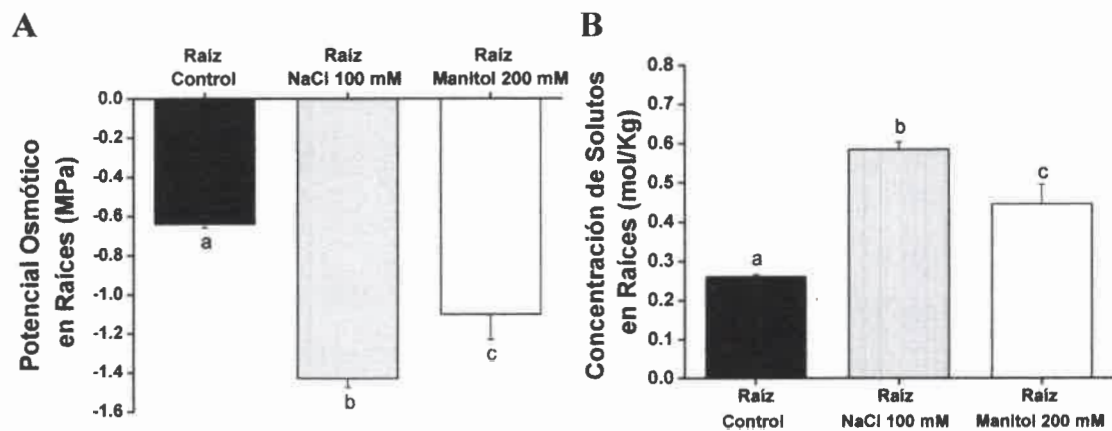


Figura 8: Potencial osmótico de raíces de cebada. El tejido (1 g) se homogenizó con N₂ líquido, luego se centrifugó a 40.000 xg durante una hora. La concentración de solutos se midió en el sobrenadante con un osmómetro (Vapor Pressure Osmometer 5500 Escor) y el potencial osmótico se calculó de acuerdo a la ecuación de Vant Hoffs ($\Psi_o = -RTC$). Los resultados se expresan en MPa (Mega Pascales) y corresponden a la media \pm S.E., n=3, $p < 0.05$. A) Potencial Osmótico. B) Concentración de solutos.

Durante estrés salino y osmótico, la concentración y tipo de metabolitos que se acumula difiere en hojas respecto de raíces de cebada. A diferencia de lo observado para otras plantas (Ghoulam y col., 2002) no es predominante la acumulación de prolina sino

el incremento de otros aminoácidos como alanina, asparragina, glicina, isoleucina, serina y azúcares como rafinosa (Wu y col., 2013). La función aparente de estos metabolitos osmocompatibles es contribuir a la disminución del potencial osmótico hecho que se refleja en un incremento en la incorporación de agua por parte de la célula para contrarrestar el efecto del estrés. Este aumento de la concentración de solutos se correlacionó con el incremento en los niveles de prolina observados en ambos tejidos (Usorach 2010, Tesis de Grado). Sin embargo, no se puede descartar un incremento en otros metabolitos osmocompatibles como los mencionados anteriormente, ya que Maggio y col., (2002) mencionaron que el incremento de prolina por sí solo no es suficiente para realizar el ajuste osmótico.

4.3 - Determinación de la concentración de Na⁺ y K⁺ en coleóptilos y raíces de cebada bajo estrés salino y osmótico

Para el correcto metabolismo celular las células deben mantener un equilibrio entre el contenido intracelular de Na⁺/K⁺, el cual es un componente clave de la tolerancia de las plantas al estrés salino (Chen y col., 2007).

Se conoce que las plantas sometidas a estrés salino incrementan la concentración de Na⁺ intracelular, debido a la excesiva concentración de Na⁺ extracelular. Este ingreso de iones Na⁺ provoca un desbalance iónico que afecta la fisiología celular induciendo cambios a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico (Claeys y Inzé, 2013). Al respecto en la figura 9, se observa que coleóptilos de plántulas germinadas en estrés salino incrementan 6 veces su contenido intracelular de Na⁺ respecto al control. Por otro lado, en estrés osmótico no se observaron diferencias significativas.

Respecto del contenido de K⁺, en la figura 10 se observa que en coleóptilos el contenido de K⁺ expresado en $\mu\text{mol/g}$ fue 3 veces menor que para Na⁺. Mientras que en respuesta al estrés salino no hubo diferencias con respecto al control, en estrés osmótico el contenido de K⁺ incrementó 2 veces.

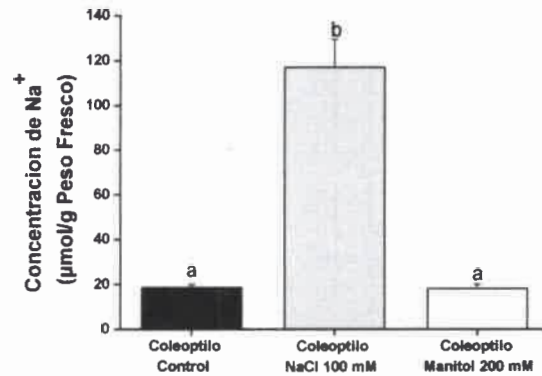


Figura 9: Concentración de Na⁺ en coleóptilos de cebada. El tejido (1 g) se homogenizó con N₂ líquido, luego se centrifugó a 40.000 *xg* durante una hora. La concentración de iones Na⁺ se midió en el sobrenadante con el fotómetro de llama Metrolab 615. Los resultados son expresados como µmol Na⁺/g de tejido y corresponden a la media ± S.E., n=3, *p*<0.05.

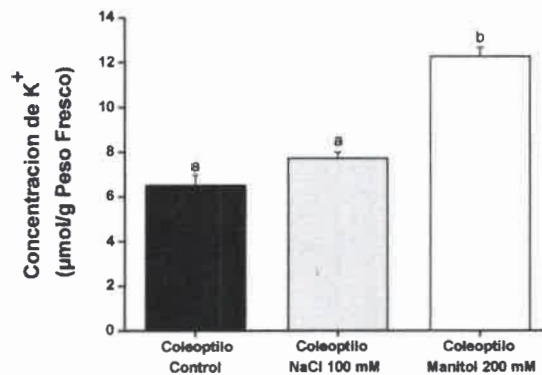


Figura 10: Concentración de K⁺ en coleóptilos de cebada. El tejido (1 g) se homogenizó con N₂ líquido, luego se centrifugó a 40.000 *xg* durante una hora. La concentración de iones K⁺ se midió en el sobrenadante con un fotómetro de llama Metrolab 615. Los resultados son expresados como µmol K⁺/g de tejido y corresponden a la media ± S.E., n=3, *p*<0.05.

En respuesta al estrés salino el contenido de Na⁺ en raíces incrementó 6 veces al igual que en coleóptilos (Figura 11), y el contenido en µmol/g fue el doble del observado. En cuanto al contenido de K⁺ (Figura 12) no hubo diferencias significativas respecto al control, posiblemente la homeostasis de este ión en raíces no estaría siendo afectada luego de 96 h de estrés salino y osmótico.

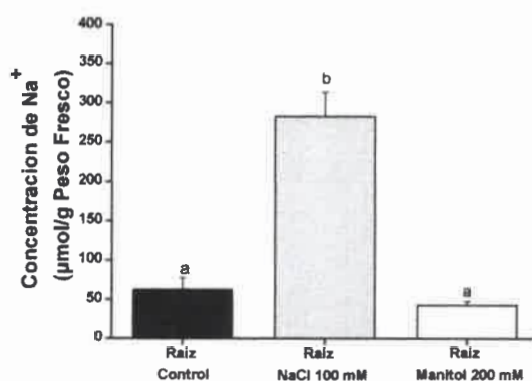


Figura 11: Concentración de Na⁺ en raíces de cebada. El tejido (1 g) se homogenizó con N₂ líquido, luego se centrifugó a 40.000 *xg* durante una hora. La concentración de iones Na⁺ se midió en el sobrenadante con el fotómetro de llama Metrolab 615. Los resultados son expresados como µmol Na⁺/g de tejido y corresponden a la media ± S.E., n=3, p<0.05.

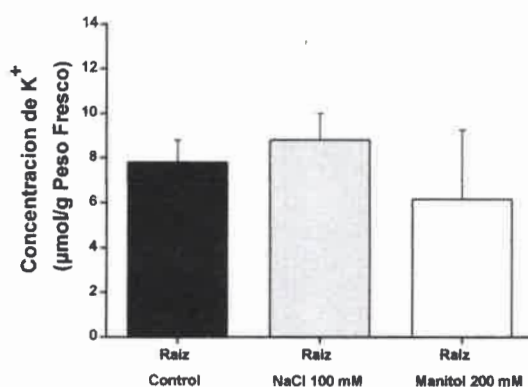


Figura 12: Concentración de K⁺ en raíces de cebada. El tejido (1 g) se homogenizó con N₂ líquido, luego se centrifugó a 40.000 *xg* durante una hora. La concentración de iones K⁺ se midió en el sobrenadante con el fotómetro de llama Metrolab 615. Los resultados son expresados como µmol K⁺/g de tejido y corresponden a la media ± SE, n=3, p<0.05.

Hay dos posibles alternativas que explican el funcionamiento celular con alto contenido de Na⁺ intracelular, una es el eflujo de los iones a través de un antiporter Na⁺/H⁺ de membrana plasmática y la otra es la compartimentalización del ión en vacuola por un antiporter Na⁺/H⁺ (Apse y col., 1999; Ariga y col., 2013). Al respecto, si bien se observó un gran incremento en el contenido intracelular de Na⁺ y en el volumen celular (Ver figura 16 y 18) este hecho no afectó la viabilidad, por lo tanto se supone que el catión podría haber sido compartimentalizado en vacuolas.

Respecto del contenido de K⁺, se observó que en coleóptilos de plántulas germinadas bajo estrés salino y osmótico, el contenido de K⁺ expresado en µmol/g fue menor que el mostrado para Na⁺. Mientras que en respuesta al estrés salino no hubo

diferencias con respecto al control, en estrés osmótico el contenido de K^+ incrementó 2 veces; hecho que se reflejó en la disminución del potencial osmótico (ver Figura 7). De forma semejante Dreyer y Uozumi (2011) sugirieron que el nivel de K^+ intracelular es un factor limitante para el desarrollo de los cultivos. Se demostró que el K^+ ingresa a la vacuola a través del antiporter y contribuye con la turgencia celular (Barragan y col., 2012). Ambos resultados permiten inferir que no solamente la acumulación de osmoprotectores sería responsable de la disminución en el potencial osmótico, sino que los niveles de K^+ estarían contribuyendo en este parámetro.

4.4 - Microscopia electrónica de barrido (MEB)

De acuerdo a los resultados fisiológicos observados como la reducción de la germinación y el crecimiento de las plántulas bajo condiciones de estrés salino y osmótico, es posible que ambos tipos de estrés provoquen un cambio morfológico en cada tejido analizado. Si bien macroscópicamente se pueden observar estos cambios como la reducción de la longitud de la raíz y de los coleóptilos, cantidad de pelos radicales etc., se decidió analizar dicho cambios mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

En la figura 13 se observan coleóptilos de cebada controles, provenientes de semillas germinadas en estrés salino y osmótico, las fotografías fueron tomadas en dos secciones diferentes del tejido, una en las células del ápice, las cuales como se mencionó en introducción son las encargadas de resistir el avance a través de la tierra durante la germinación, y la otra en la sección media del tejido en el cual las células se encuentran en elongación y son las protectoras de la hoja cotiledonar y las primeras hojas en formación que se encuentran dentro de este tejido protector. Las células del ápice del coleóptilos presentan paredes celulares engrosadas las cuales le confieren mayor resistencia mecánica (Figura 13 A1). Las células en elongación (Figura 13 A2) se ubican de manera paralela al eje de crecimiento y se puede observar claramente la delimitación entre célula y célula, sin embargo en la imagen no se observa el límite vertical entre las células del mismo eje de elongación ya que las mismas poseen una longitud superior a 100 μm . En ambas imágenes se puede observar que el tejido se encuentra en condiciones óptimas de hidratación. En la figura 13 B1 las células del

ápice de coleótilos de semillas germinadas con 100 mM NaCl muestran mayor engrosamiento en las paredes que forman este grupo celular. En las células en elongación (Figura 13 B2) se observa que las mismas han perdido turgencia, y un engrosamiento en la unión de una célula con la contigua en el mismo eje de elongación (Flecha blanca). En las células del ápice de semillas germinadas con 200 mM de manitol (Figura 13 C1) el engrosamiento de la pared celular es menos evidente. En las células en elongación (Figura 13 C2) no se observan diferencias con respecto a las células controles.

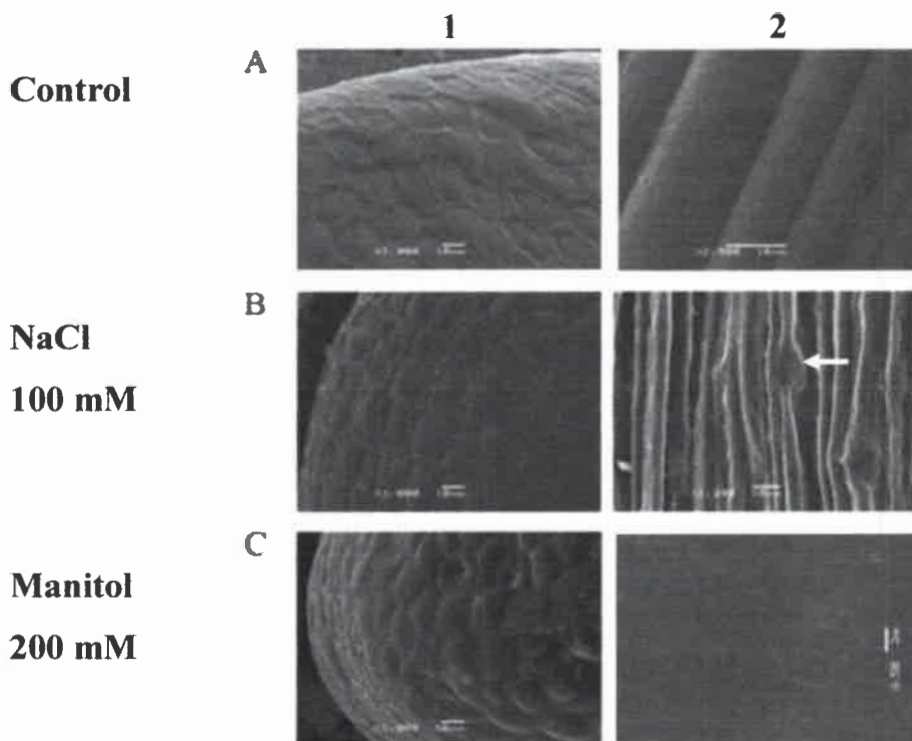


Figura 13: Microscopía electrónica de barrido en coleótilos. Coleótilos de plántulas de cebada germinadas en condiciones controles, de estrés salino (100 mM de NaCl) y osmótico (200 mM de manitol) en oscuridad a 25°C durante 4 días fueron analizados. A) Coleótilos Control; B) Coleótilos NaCl 100 mM; C) Coleótilos manitol 200 mM. Barra escala A1-A2- B1-B2-C1 = 10 μ m, C2 = 2 μ m.

En raíces controles (Figura 14) se observa la caliptra, zona de crecimiento, elongación y diferenciación. La caliptra (Figura 14 A1) provee de protección mecánica a las células meristemáticas cuando la raíz crece a través del suelo. Estas células son destruidas por el crecimiento de la raíz y la fricción con el suelo, pero son rápidamente reemplazadas por células nuevas generadas por división celular en la cara externa del meristema de la raíz. En la zona de diferenciación (Figura 14 A4) se observan la

presencia de pelos radicales (Flecha blanca) que son los encargados de la absorción de agua por la plántula.

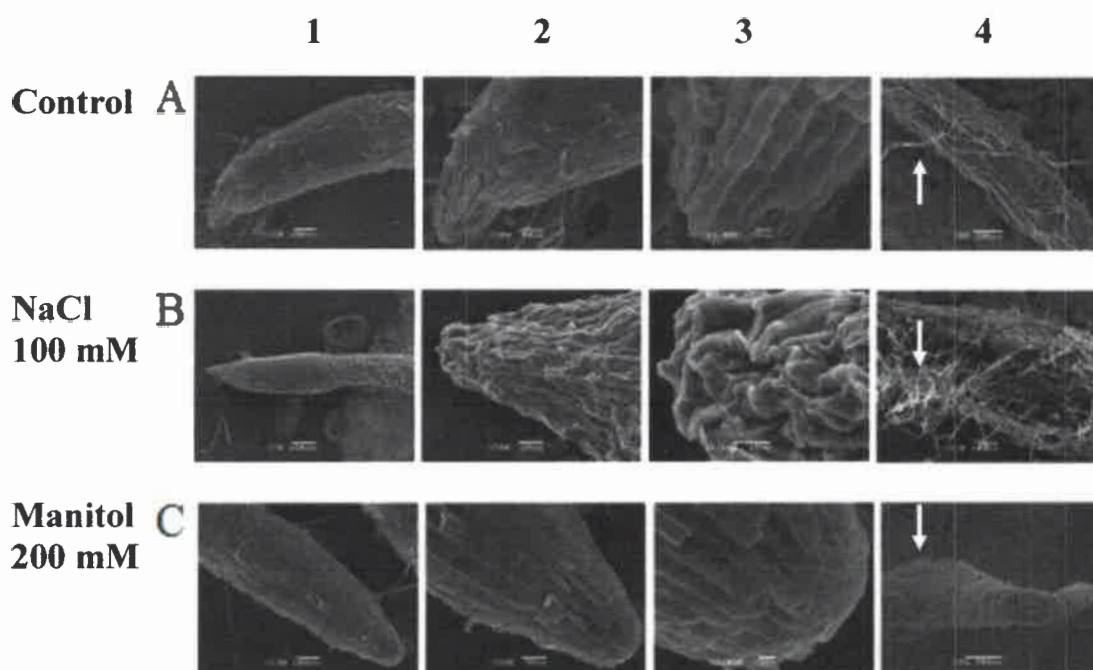


Figura 14: Microscopía electrónica de barrido en raíces. Raíces de plántulas de cebada germinadas en condiciones controles, de estrés salino y osmótico en oscuridad a 25°C durante 4 días fueron analizadas. A) Raíz Control. B) Raíz NaCl 100 mM. C) Raíz manitol 200 mM. Barra de escala A1-C1= 100 μ m, B1 = 200 μ m, A2-C2 = 10 μ m, B2 = 20 μ m, A3-B3-C3= 10 μ m, A4 = 200 μ m, B4 = 100 μ m, C4 = 500 μ m.

En raíces de semillas germinadas en estrés salino se observó que las células de la caliptra se encuentran altamente deshidratadas (Figura 14 B2 y B3) con respecto a las células controles. En la zona de diferenciación (Figura 14 B4) fue evidente el aumento del número de pelos radicales. En presencia de manitol (Figura 14 C) la zona de crecimiento y elongación no difiere con respecto a la raíz control. Sin embargo en la zona de diferenciación hubo un incremento considerable del número de pelos radicales (Figura 14 C4 flecha). Este resultado concuerda con los hallados por Wang y col., (2008) que demostraron en *Arabidopsis thaliana* que el estrés osmótico incrementa dicho número. El aumento del número de pelos radicales promueve una mayor absorción de agua por parte de las raíces.

Las imágenes al microscopio electrónico de barrido mostraron un cambio morfológico en las células de cada tejido de la plántula germinada en condiciones de estrés salino y osmótico. Cabe destacar que hasta el momento no se encuentra

bibliografía con respecto al efecto del estrés osmótico y salino sobre la morfología de raíces y coleóptilos observadas al microscopio electrónico de barrido.

4.5 - Cortes histológicos de coleóptilos y raíces de cebada bajo estrés salino y osmótico

La comparación del efecto del estrés sobre la morfología de los coleóptilos reveló por microscopía electrónica de barrido (MEB) que las células de este tejido son más afectadas por el estrés salino que por el estrés osmótico. Al respecto, se observó que las células epidérmicas se encontraban altamente deshidratadas. En vista de este resultado se decidió estudiar otros aspectos morfológicos relacionados con los tipos de células que conforman este tejido. La figura 15 muestra cortes histológicos de los coleóptilos controles y estresados. Si bien no se observaron diferencias en la organización celular, a un aumento de 10X se hace evidente el incremento en el área del tejido debido a un aumento en el volumen celular. Un efecto opuesto se observó en respuesta al estrés osmótico. La cuantificación del área del tejido arrojó un incremento del 30% en respuesta al Na^+ y una disminución del 42% en respuesta al manitol (Figura 16).

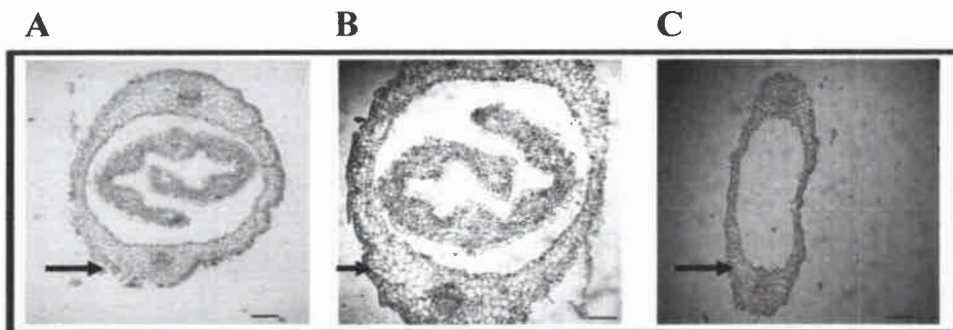


Figura 15: Cortes histológicos de coleóptilos de cebada. La fijación, cortes y tinción de los coleóptilos fue realizado de acuerdo a Johansen (1940) y Ruzin (1999) como se describió en Materiales y Métodos. Las imágenes fueron tomadas con cámara Canon G10 en el microscopio Axiolab (Zeiss®) con un aumento de 10X y convertidas a escala de grises mediante el programa imagej. Las flechas indican el coleóptilo, en el interior se observa la primera hoja verdadera que no se consideró en el análisis. Escala 20 μm .

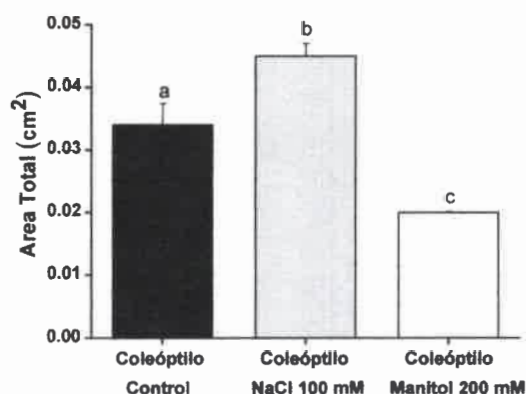


Figura 16: Area total de coleóptilos de cebada. Las imágenes tomadas con el microscopio óptico Axiolab (Zeiss®) se analizaron con el programa imagej. Los resultados corresponden al área del tejido expresada en cm². Las barras representan la media \pm S.E., n=5, p<0.05.

El análisis de las raíces por microscopía electrónica de barrido (MEB) mostró al igual que en coleóptilos que las células son más afectadas por el estrés salino que por el osmótico. En los cortes histológicos del tejido no se observaron diferencias en la cantidad de las células epidérmicas, de la corteza o las vasculares analizando las imágenes a mayor aumento. En tanto que a 10X (Figura 17) se hace evidente que el estrés salino y osmótico causó un incremento en el volumen del tejido debido al cambio en el volumen celular.

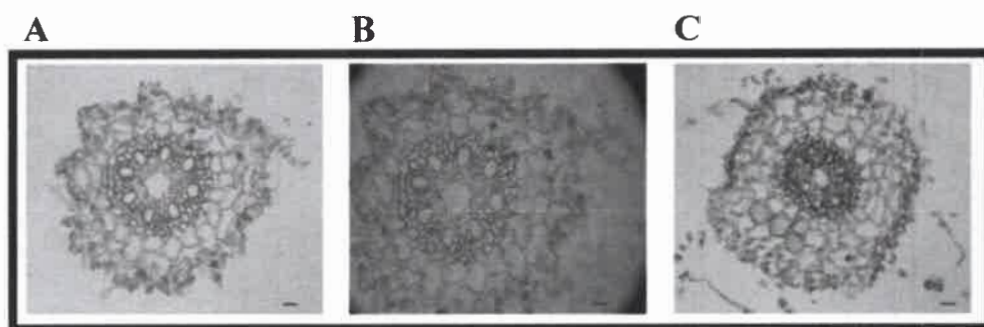


Figura 17: Cortes histológicos de raíces de cebada. La fijación, cortes y tinción de las raíces fue realizado de acuerdo a Johansen (1940) y Ruzin (1999) como se describe en Materiales y Métodos. Las imágenes fueron tomadas con cámara Canon G10 en el microscopio Axiolab (Zeiss®) con un aumento de 10X y convertidas a escala de grises mediante el programa imagej.

En la figura 18 la cuantificación del área radicular determinó un incremento del 20% en respuesta al Na⁺. Hecho probablemente debido a la compartimentalización de Na⁺ en la vacuola y/o al aumento en la concentración de solutos compatibles.

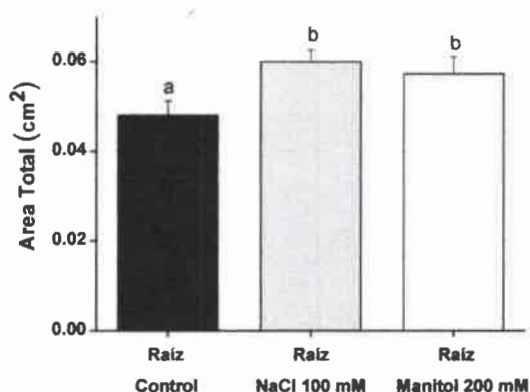


Figura 18: Área total de raíces de cebada. Las imágenes tomadas con el microscopio óptico Axiolab (Zeiss®) se analizaron con el programa imagej. Los resultados corresponden al área del tejido expresada en cm². Las barras representan la media \pm S.E., n=5, p<0.05.

4.6 - Western blot anti-PLC

En base a lo descrito en introducción en cuanto a la importancia de la enzima fosfolipasa C en la transducción de la señal en plantas, y su respuesta frente al estrés biótico y abiótico, se propuso determinar su presencia tanto en coleótilos como en raíces de semillas germinadas bajo condiciones controles, de estrés salino y osmótico.

La inmunodetección de PLC en la fracción membranal (105.000 xg) de coleótilos y raíces utilizando suero inmune de conejo contra el dominio catalítico de PLC δ obtenida de cultivo celular de café (*Coffea arabica* L.) muestra tres bandas. La PLC unida a membrana tiene un peso molecular entre 60 y 70 KDa por lo cual es probable que la banda de 66 KDa (Figura 19) en coleótilos y raíces corresponda a esta PLC, y esta no se vio afectada con respecto a los tratamientos en coleótilos. En raíces, tanto el estrés salino como el osmótico disminuyó la inmunodetección de la enzima siendo el efecto osmótico más pronunciado que el salino. Además, se observan dos bandas de un peso alrededor de 45 KDa las cuales aparecen de manera uniforme en ambos tejidos, tanto en controles como en los tratamientos.

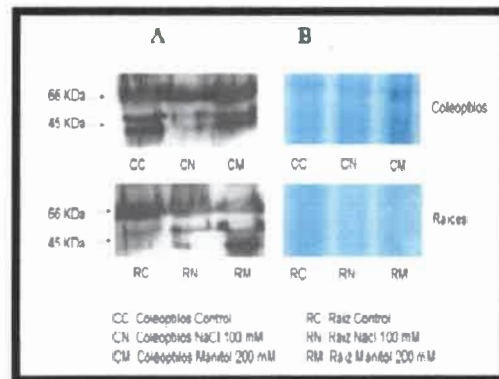


Figura 19: Western-blot anti-PLC. Las fracciones de membranas (60 µg de proteína) de coleóptilos (C) y raíces (R) fueron sometidas a un SDS-PAGE al 12%. Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa e incubadas con suero inmune anti-PLC (contra dominio catalítico PLC de café) obtenido en conejo (dilución 1:1000 en TBS-Tritón) durante 3 h en agitación a temperatura ambiente, Luego se incubó con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo unido a peroxidasa (dilución 1:2000 en TBS-Tritón) durante 1 h a temperatura ambiente y revelado por autorradiografía. A) Western Blot. B) Tinción Coomassie control de carga.

Liu y col., (2006) reportó una banda de 40 KDa que corresponde a PLC después del tratamiento de desnaturalización por calor, por lo que la banda de 45 KDa puede deberse a la desnaturalización de las muestras por el calentamiento o a una reacción inespecífica de algún anticuerpo proveniente del suero inmune.

4.7 - Actividad de fosfolipasa C *in vitro*

En función del resultado obtenido en cuanto a la detección de esta enzima y a su participación en la generación de segundos mensajeros (DAG/PA) durante el estrés salino y osmótico se planteó determinar su actividad en coleóptilos y raíces de semillas germinadas en condiciones controles, de estrés salino y osmótico.

En la figura 20 se observa que dicha actividad incrementa un 20% en la fracción membranal (105.000 xg) de coleóptilos en condiciones de estrés salino y no durante el estrés osmótico. En la fracción citosólica se observa una disminución para ambos tipos de estrés aunque no se observan diferencias significativas.

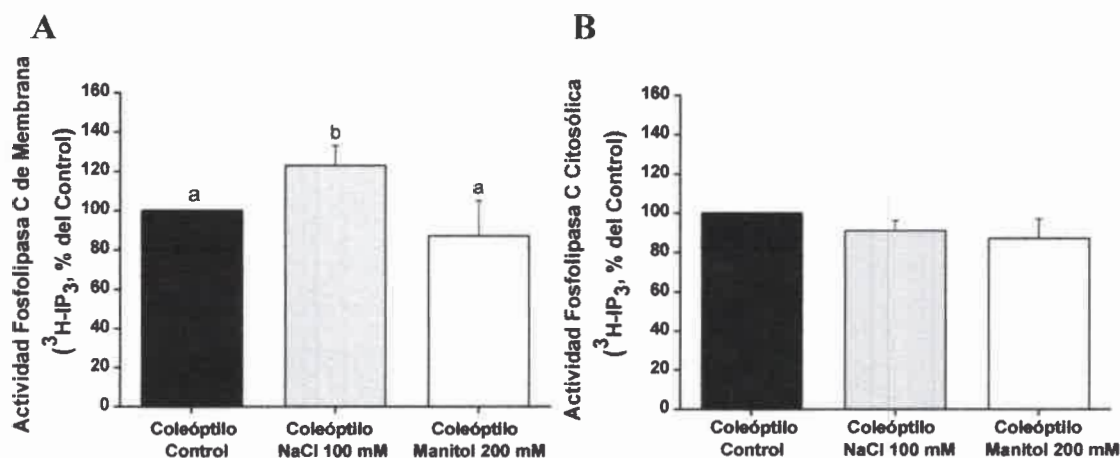


Figura 20: Actividad PLC en coleóptilos de cebada. La actividad se determinó en 20 μg de proteínas del extracto citosólico y membranal (105.000 xg) de coleóptilos de cebada en condiciones controles, de estrés salino y osmótico germinadas en oscuridad a 25°C 4 días, por liberación de [^3H]-IP $_3$ durante 10 min. a 30°C. Los resultados son expresados como porcentaje del control (100%) y corresponden a la media \pm S.E., $n=4$, $p<0.05$. A) Fracción de membrana. B) Fracción citosólica.

En raíces (Figura 21) el estrés salino en la fracción membranal (105.000 xg) incrementó significativamente la actividad PLC un 50% con respecto al control y no se observaron diferencias durante el estrés osmótico. En la fracción citosólica se observó un incremento del 20% en respuesta al NaCl y no hubo diferencias significativas con respecto al control durante el estrés osmótico.

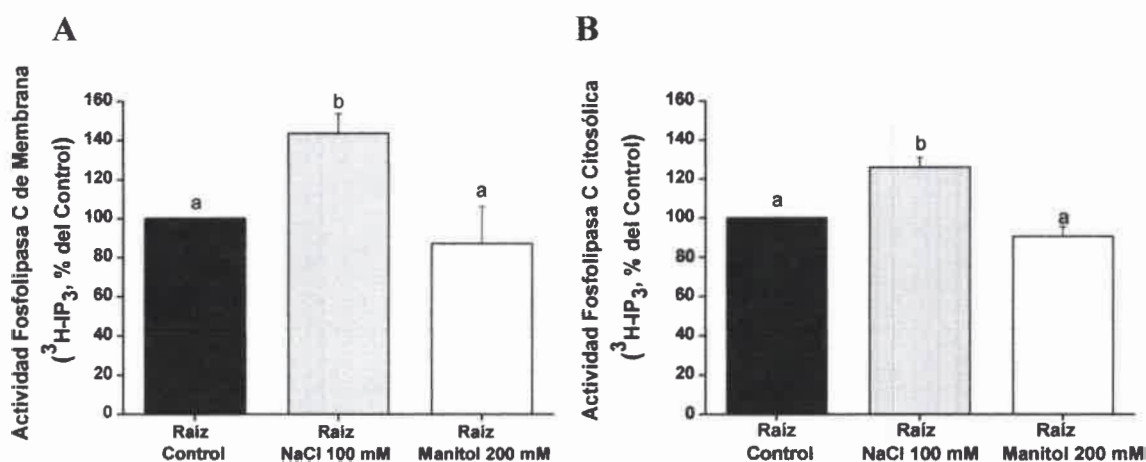


Figura 21: Actividad PLC en raíces de cebada. La actividad se determinó en 20 μg de proteínas de la fracción citosólica y membranal (105.000 xg) de raíces de cebada en condiciones controles, de estrés salino y osmótico germinadas en oscuridad a 25°C 4 días, por liberación de [^3H]-IP $_3$ durante 10 min. a 30°C. Los resultados son expresados como porcentaje del control (100%) y corresponden a la media \pm S.E., $n=4$, $p<0.05$. A) Fracción de membrana. B) Fracción citosólica.

En base a estos resultados podemos inferir que la actividad enzimática PLC se encuentra incrementada bajo estrés salino y que la magnitud del incremento es diferente para cada tejido analizado.

Estos resultados concuerdan con los hallados por Takahashi y col., (2001) en cultivo celular de *Arabidopsis thaliana*, en el cual se demostró que el incremento en PLC es debido al estrés y no a un aumento en los niveles de PIP₂. Además, nuestro grupo de trabajo determinó que la actividad DAG-k incrementa bajo estrés salino, mientras que los niveles de PIP₂ no cambian, por lo que podemos sugerir que bajo estrés salino en nuestro sistema de estudio el incremento en los niveles de PA por acción de la DAG-k es formado por el DAG proveniente de la hidrólisis de PIP₂ vía PLC, ya que la actividad PA fosfatasa se encuentra disminuida (Resultados no publicados). Por otro lado se ha demostrado que PLC media la acumulación de prolina en respuesta al estrés salino (Parre y col., 2007). En resultados previos del grupo se observó un incremento en la acumulación de prolina por lo que estos resultados indican una correlación positiva en cuanto a la acumulación de prolina y la actividad PLC en raíces en presencia de estrés salino (Usorach, 2010).

Bajo estrés osmótico la actividad PLC tanto en membranas de raíces como de coleóptilos no se modificó con respecto al control. Estos resultados se contradicen con los demostrados por Takahashi y col., (2001) en donde la actividad de la enzima se encuentra incrementada en presencia de estrés osmótico, sin embargo dicha actividad incrementa a los pocos minutos de inducido el estrés y luego disminuye.

4.8 - Efecto del estrés salino y osmótico en la organización de microtúbulos

En base al papel de los microtúbulos en la organización de la citoarquitectura en células animales y vegetales, su respuesta a situaciones de estrés y su estrecha relación con la actividad de la enzima fosfolipasa D, se planteó observar si su distribución se ve afectada a las 96 h de imbibición en coleóptilos y raíces de semillas germinadas durante la exposición a estrés salino y osmótico.

En la figura 22 A se analizó la distribución de los microtúbulos en un plano central de la célula del ápice de coleóptilos, en donde se puede observar que los haces de microtúbulos irradian desde el núcleo hacia la membrana, el cual es un estado

característico de las células que se encuentran en la fase G del ciclo celular. Se puede apreciar en la imagen que el entramado microtubular es bastante homogéneo en el citoplasma celular. En la región situada debajo de la membrana plasmática dicho entramado se observa con mayor intensidad (Flecha blanca). En la figura 22 B el entramado microtubular del citoplasma de células de coleóptilos germinadas bajo estrés salino se observa menos homogéneo. En la zona de membrana se visualiza que dicho estrés incrementó la intensidad comparado con las células de coleóptilos controles. Bajo estrés osmótico (Figura 22 C) el entramado microtubular no mostró diferencias respecto al control.

En la figura 23 A se observa la distribución de microtúbulos en el plano central de células del ápice radical de raíces controles, en la cual los microtúbulos adoptan la disposición de las células en interfase, ubicándose muy cerca de la membrana plasmática, con orientación predominante en ángulos rectos a la dirección de elongación celular. En presencia de NaCl (Figura 23 B) dependiendo del plano focal se hace evidente que el entramado microtubular se encuentra interrumpido debido al aumento de compartimentos intracelulares posiblemente generados por exposición al NaCl (Flecha blanca), o a una distribución diferente por parte de este entramado debido a que estos no se encuentran en las células controles. Las raíces tratadas con manitol (Figura 23 C) no mostraron diferencias con respecto al control en cuanto a la distribución de los microtúbulos.

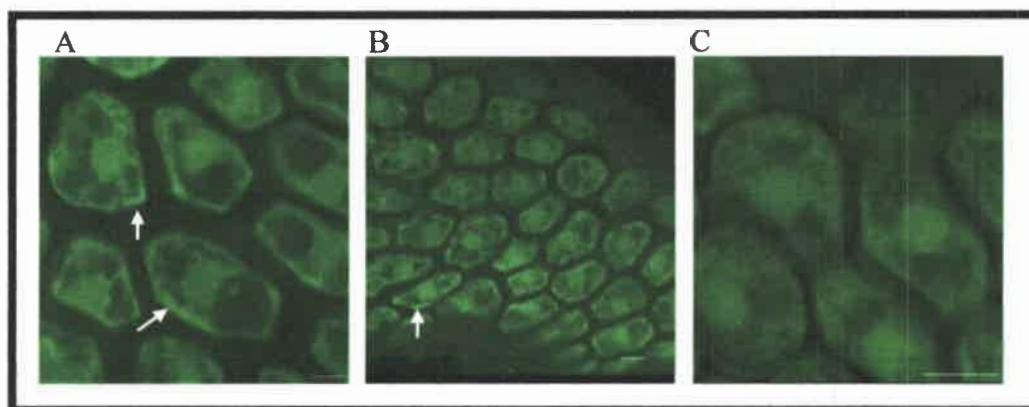


Figura 22: Inmunodetección de microtúbulos en células de coleóptilos de cebada. El tejido fue procesado de acuerdo a Sugimoto y col., (2000) y observado al microscopio confocal NIKON ECLIPSE Ti. De izquierda a derecha A) Coleóptilo Control B) Coleóptilo NaCl 100 mM C) Coleóptilo manitol 200 mM. Barra de escala = 20 μ m.

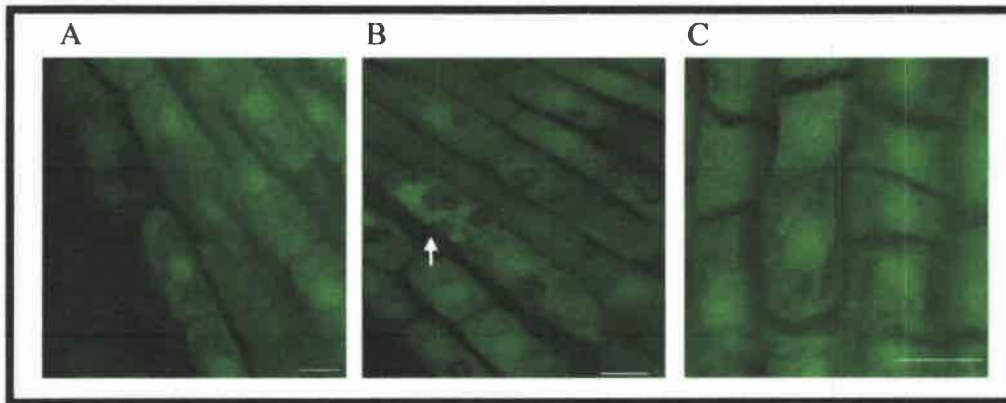


Figura 23: Inmunodetección de microtúbulos en células de raíces de cebada. El tejido fue procesado de acuerdo a Sugimoto y col., (2000) y observado al microscopio confocal NIKON ECLIPSE Ti. De izquierda a derecha A) Raíz Control B) Raíz NaCl 100 mM C) Raíz manitol 200 mM. Barra de escala = 20 μ m.

Wang y col. (2011) demostraron que el estrés salino induce una rápida despolimerización de microtúbulos seguido de una nueva formación microtubular, y se piensa que la misma es necesaria para la supervivencia de las células a estas condiciones adversas. Las imágenes de coleóptilos y raíces expuestas a condiciones de estrés salino mostraron un entramado microtubular diferente a las células controles, posiblemente debido a esta nueva formación de la red microtubular.

4.9 - Determinación de α -tubulina total en coleóptilos y raíces de cebada bajo estrés salino y osmótico

Los resultados obtenidos hasta el momento demostraron que ambos tejidos sometidos a estrés salino presentan cambios morfológicos y en la concentración de iones Na^+ . También se observaron alteraciones en la organización del citoesqueleto microtubular mediante microscopía confocal. Para indagar sobre el mecanismo que utiliza la célula durante la respuesta al Na^+ se decidió evaluar el contenido celular de α -tubulina como una proteína clave en la formación de microtúbulos, responsables de la forma, crecimiento y el transporte celular (Brandizzi y col., 2013).

El análisis del contenido de α -tubulina total mostró un incremento del 50% cuando las células fueron expuestas al Na^+ y una disminución del 50% en presencia de manitol (Figura 24). Sin embargo al momento no hemos encontrado bibliografía relacionada con el cambio de la concentración de α -tubulina en respuesta a estrés salino

y osmótico, ni la manera en que dicho cambio puede afectar el citoesqueleto microtubular. En nuestro caso el cambio del contenido de α -tubulina no puede ser asociado a un aumento en el número de células, debido a que el estrés salino provocó una disminución en la longitud del tejido, y en el análisis de los cortes histológicos no se observó un aumento en el número de células.

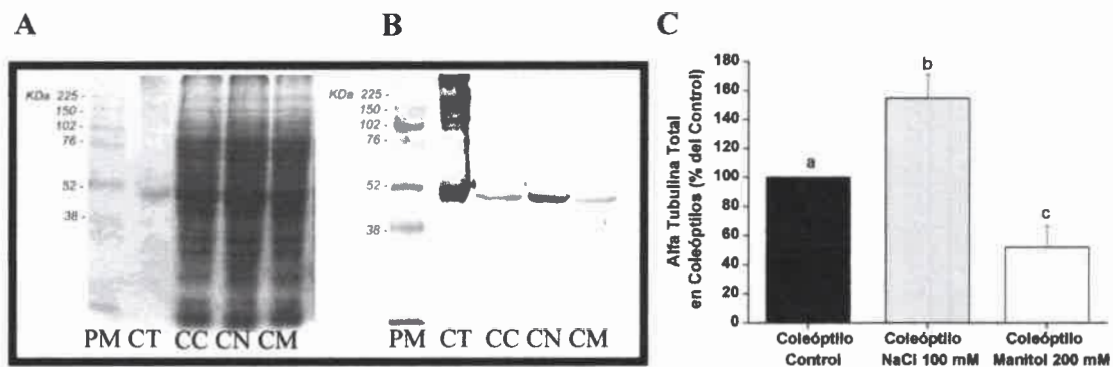


Figura 24: α -tubulina total en coleóptilos de cebada. Una fracción proteica total (80 μ g) se separó por SDS-PAGE al 10%, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se incubó con un anticuerpo anti- α -tubulina. Las bandas se detectaron por el método colorimétrico y se cuantificaron con imagej. A) Tinción Coomassie que representa el control de carga del gel. B) Inmuno-detección de la proteína α -tubulina. C) Cuantificación de la intensidad de la banda expresadas como porcentaje del control. Los resultados corresponden a la media \pm S.E., $n=5$, $p<0.05$.

A diferencia de lo observado en coleóptilos, en raíces el nivel de α -tubulina total disminuyó un 50% bajo estrés salino y un 80% para el osmótico (Figura 25 C). Esta disminución se podría explicar mediante dos mecanismos, principalmente debido a que los tejidos responden de forma diferente o quizás por un cambio en la actividad de proteasas. Al respecto, Dubey y Rani (1990) demostraron que la actividad de aminopeptidasa y carboxipeptidasa se encontraron aumentadas en raíces sometidas a estrés.

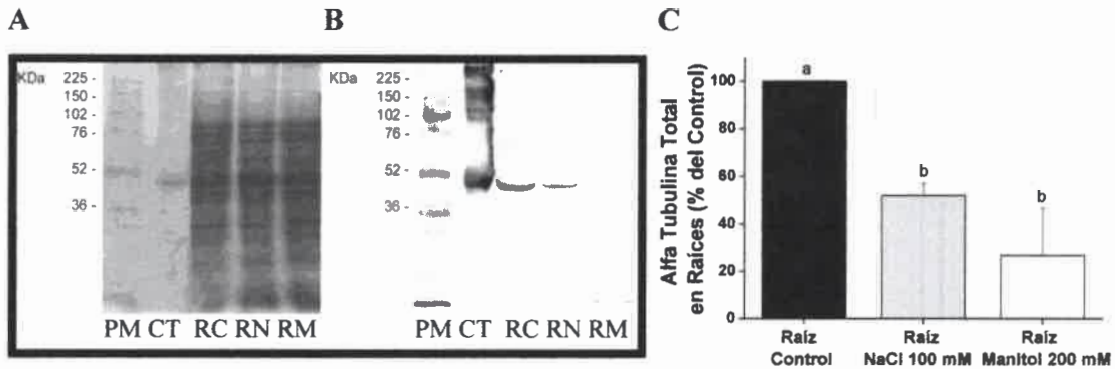


Figura 25: α -tubulina total en raíces de cebada. La fracción proteica total (80 μ g) se separó por SDS-PAGE al 10%, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpo anti- α -tubulina. Las bandas se detectaron por el método colorimétrico y se cuantificaron con imagej. A) Tinción Coomassie que representa el control de carga del gel. B) Inmuno-detección de la proteína α -tubulina. C) Cuantificación de la intensidad de la banda expresadas como porcentaje del control. Los resultados corresponden a la media \pm S.E., $n=5$, $p<0.05$.

4.10 - Determinación de α -tubulina total en coleóptilos y raíces de cebada bajo diferentes concentraciones de estrés salino y osmótico

Con el objetivo de dilucidar si los cambios observados fueron dependientes de la concentración del ión Na^+ se decidió realizar una curva dosis respuesta. Al respecto, en la figura 26 A se observa que el contenido de α -tubulina total en coleóptilos incrementa con la concentración de sodio. En respuesta al manitol (Figura 26 B) se observó que el contenido de α -tubulina total disminuyó a todas las concentraciones ensayadas alcanzando un máximo a 50 mM con una disminución del 30%. Este resultado sumado al anterior demuestra que tanto el estrés salino como el osmótico modifican el contenido de α -tubulina y probablemente dicho cambio estaría influenciando en el contenido y organización de los microtúbulos en las células. Además podemos sugerir un efecto del catión Na^+ y no del anión Cl^- durante el estrés salino ya que el uso de KCl no modificó el contenido de α -tubulina (Figura 26 C).

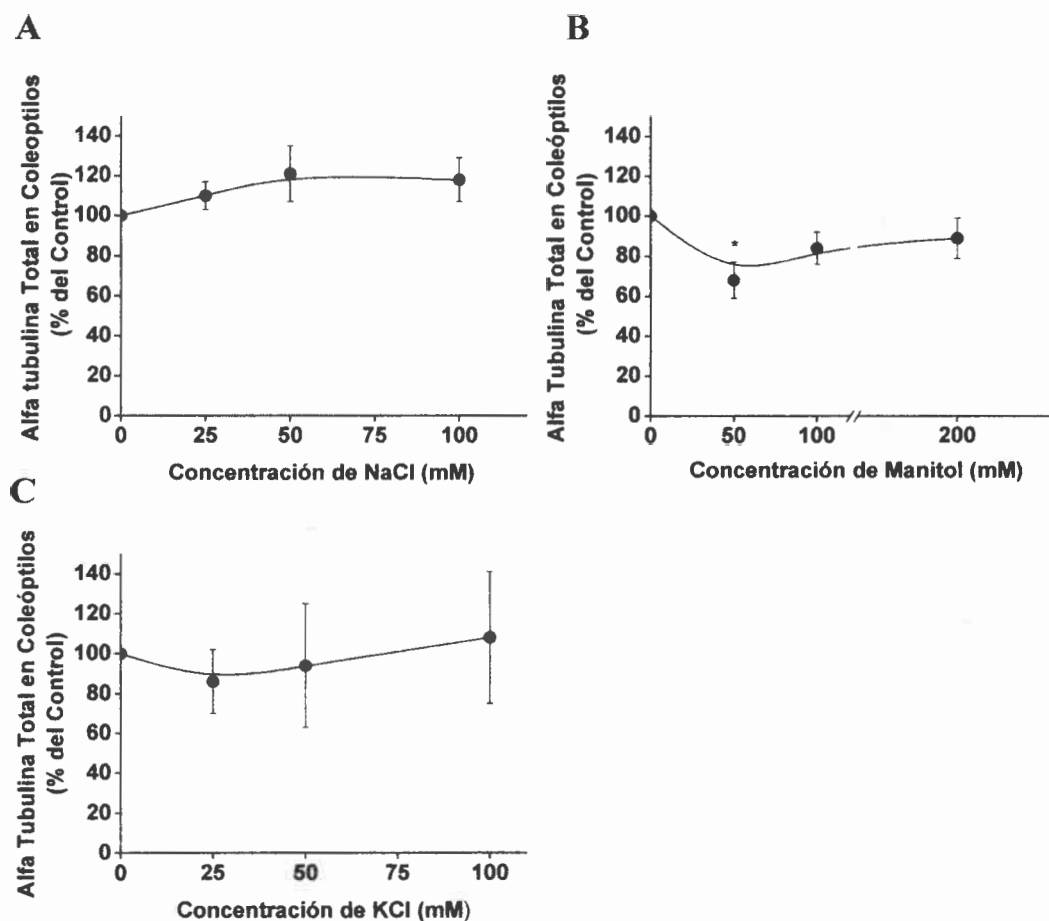


Figura 26: Cuantificación α -tubulina total de coleóptilos bajo diferentes concentraciones de estrés salino y osmótico. Las bandas provenientes del western blot fueron cuantificadas y graficadas. Los resultados son expresados como porcentaje del control bajo diferentes concentraciones de NaCl, manitol y KCl. Los resultados corresponden a la media \pm S.E., $n=5$, $p<0.05$. A) NaCl B) Manitol C) KCl.

Al respecto en raíces, a bajas concentraciones del catión se observó una disminución en el contenido de α -tubulina que se mantuvo a todas las concentraciones ensayadas (Figura 27 A). En presencia de manitol no se observaron diferencias significativas con el incremento en la concentración de manitol (Figura 27 B), al igual que en presencia de KCl sugiriendo así un efecto por parte del Na^+ (Figura 27 C).

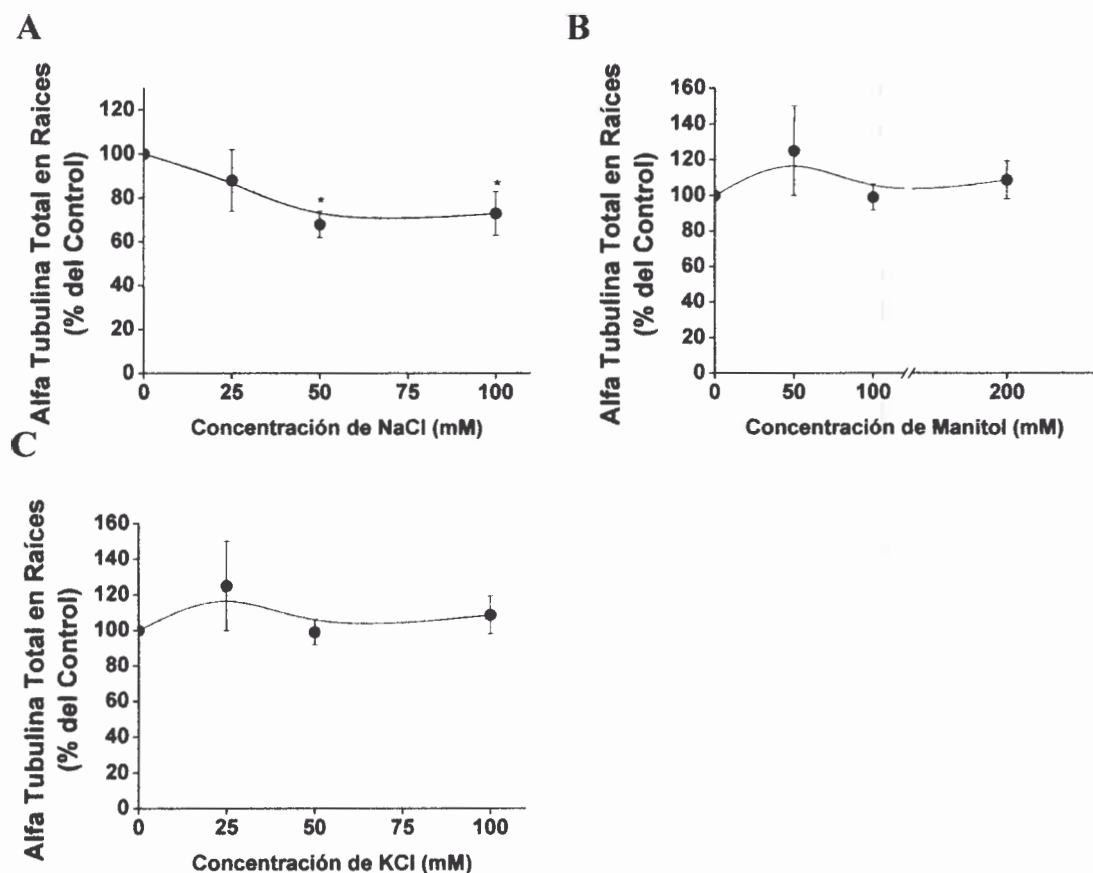


Figura 27: Cuantificación de α -tubulina total de raíces bajo diferentes concentraciones de estrés salino y osmótico. Las bandas provenientes del western blot fueron cuantificadas y graficadas. Los resultados son expresados como porcentaje del control bajo diferentes concentraciones de NaCl, manitol y KCl. Los resultados corresponden a la media \pm S.E., $n=3$, $p<0.05$. A) NaCl B) Manitol C) KCl.

4.11 - Determinación de α -tubulina de membrana en coleóptilos y raíces de cebada bajo estrés salino y osmótico

En base a la estrecha relación de los microtúbulos corticales y la membrana plasmática se evaluó el contenido de α -tubulina en la fracción de membrana de 105.000 xg. Si bien se determinó la presencia de α -tubulina en dicha fracción, no se observaron diferencias significativas con respecto al control (Figura 28 B).

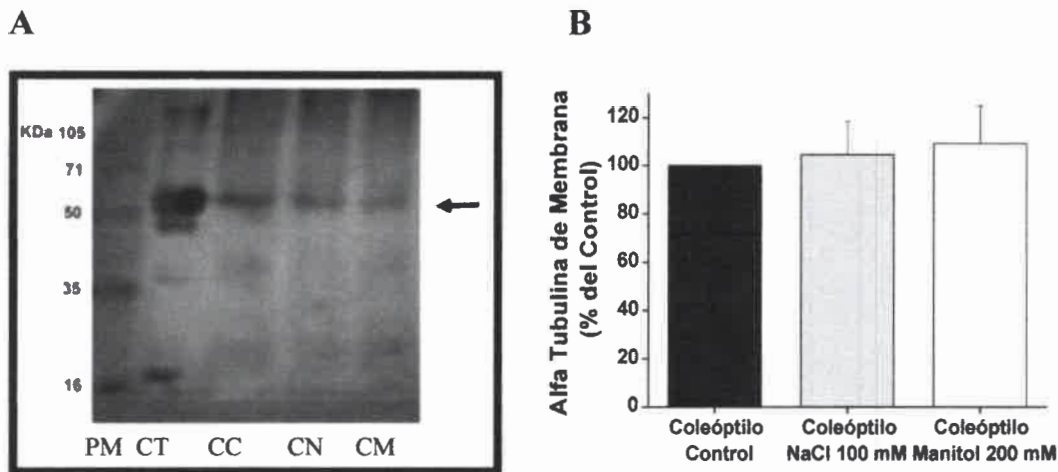


Figura 28: α -tubulina de membrana en coleóptilos de cebada. Una fracción de membrana (105.000 xg, 80 μ g de proteína) se separó por SDS-PAGE al 10%, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpo anti- α -tubulina. Las bandas se detectaron por el método del 4-Cloro-1-Naftol y se cuantificaron con imagej. A) Inmuno-detección de la proteína α -tubulina. La flecha indica la banda de 50 kDa que se corresponde con el peso molecular de α -tubulina. B) Cuantificación de la intensidad de las bandas expresadas como porcentaje del control. Los resultados corresponden a la media \pm S.E., n=3, $p < 0.05$.

El contenido en raíces de α -tubulina de membrana en respuesta al estrés osmótico (Figura 29 B), mostró un aumento del 50% con respecto al control, mientras que bajo estrés salino no se observaron diferencias.

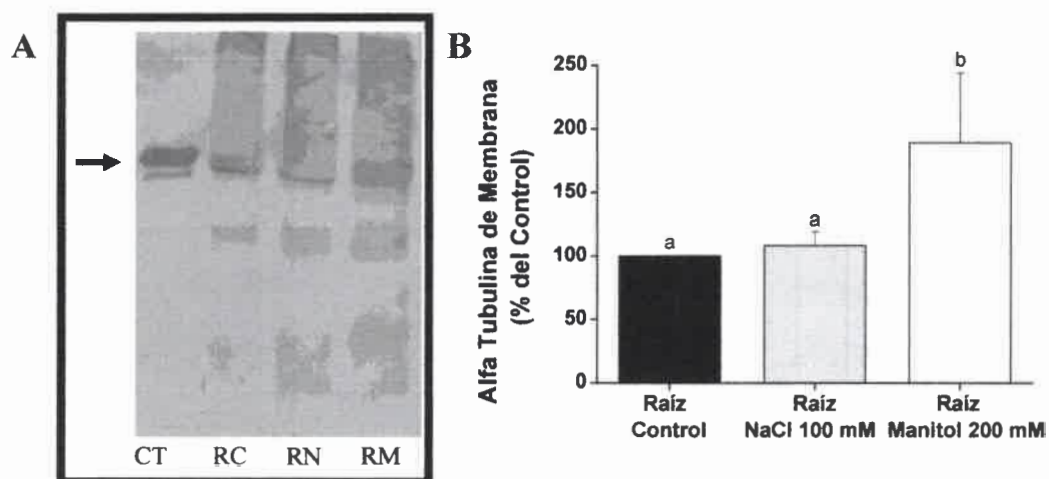


Figura 29: α -tubulina de membrana en raíces de cebada. La fracción de membrana de 105.000 xg (80 μ g de proteínas) se separó por SDS-PAGE al 10%, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpo anti- α -tubulina. Las bandas se detectaron por el método del 4-Cloro-1-Naftol y se cuantificaron con imagej. A) Inmuno-detección de la proteína α -tubulina. La flecha indica la banda de 50 kDa que corresponde al peso molecular de α -tubulina. B) Cuantificación de la intensidad de las bandas expresadas como porcentaje del control. Los resultados corresponden a la media \pm S.E., n=3, $p < 0.05$.

4.12 - Determinación de α -tubulina total en cultivo celular COS

Debido a que no se conocen antecedentes en la variación de α -tubulina en plantas ni en células animales bajo condiciones de estrés salino y osmótico, nos preguntamos si este efecto podía ocurrir también en células animales. Para responder a esta pregunta se decidió evaluar el efecto del estrés sobre células animales provenientes de un cultivo celular. Para tal fin, las células COS (células de riñón de mono) se hicieron crecer en su medio normal y luego se estimularon con NaCl 100 mM y manitol 200 mM durante 96 h. La figura 30 no muestra variaciones en el contenido de α -tubulina total en las células tratadas tanto con NaCl como manitol. En vista de los resultados obtenidos se podría considerar a las variaciones de α -tubulina en respuesta al estrés como una característica propia de los vegetales.

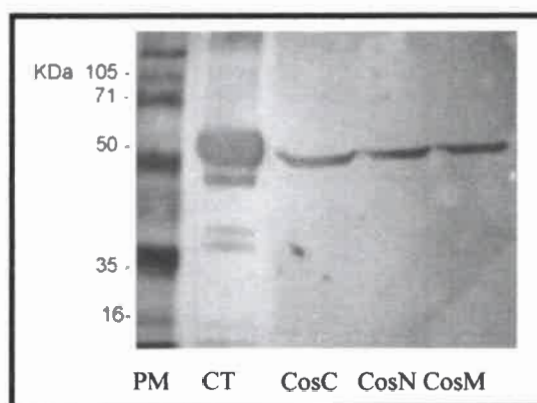


Figura 30: α -tubulina en cultivo celular COS. El homogenato total (80 μ g de proteínas) se separó por SDS-PAGE al 10%, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpo anti- α -tubulina. Las bandas se detectaron por el método colorimétrico. PM: Marcador de peso molecular, CT: Control tubulina, CosC: célula COS control, CosN: célula COS NaCl 100 mM, CosM: célula COS manitol 200 mM.

4.13 – Ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción citosólica

Observamos que el contenido de α -tubulina cambia en coleóptilos y raíces sometidas a estrés y probablemente esta sea una respuesta por parte de las plantas, ya que en células animales no ocurre. Como se mencionó en introducción, Testerink y col., (2004) mediante un análisis proteómico observaron en *Arabidopsis* que tubulina es una proteína blanco de PA. Por lo que se decidió evaluar si en cebada tubulina se une al PA. En la figura 31, se observa el ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción

citósica de coleóptilos controles y estresados con NaCl y manitol. Se observó la presencia de tubulina unida al PA mediante reacción por el método del 4-Cloro-1-Naftol en todas las condiciones ensayadas (Figura 31 D, E y F), mientras que en la membrana con cloroformo (Cl) (Figura 31 C) no hubo reacción cuando fue incubado con la fracción citósica. Como control negativo de los anticuerpos también se revelaron las membranas con PA y Cl que no se incubaron con la fracción citósica (Figura 31 A, B).

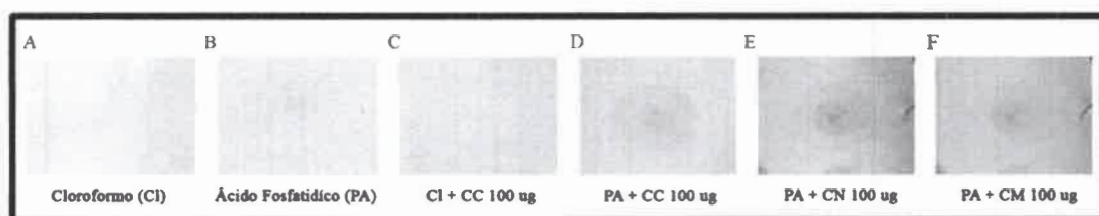


Figura 31: Ensayo de unión entre PA y tubulina en coleóptilos. 10 μg de ácido fosfatídico (PA) o cloroformo (Cl) fueron sembrados en membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con 5% de leche descremada en TBS-Tween 20 (0.1%) e incubadas 24 h. en agitación a 4 $^{\circ}\text{C}$ con 100 μg de proteínas de la fracción citósica de 105.000 xg. Posteriormente las membranas fueron lavadas y reveladas contra α -tubulina. La reacción se reveló por el método colorimétrico durante 1 min. Referencia CC: Coleóptilos Control, CN: Coleóptilos NaCl 100 mM, CM: Coleóptilos manitol 200 mM.

En la fracción citósica de raíces (Figura 32) se observó la presencia de tubulina unida al PA en condiciones controles y estresados (Figura 32 D, E y F), aunque el nivel fue menor en estrés salino (Figura 32 E). En el control negativo de los anticuerpos no se observó reacción (Figura 32 A, B), al igual que la membrana unida a Cl en presencia de la fracción citósica (Figura 32 C).

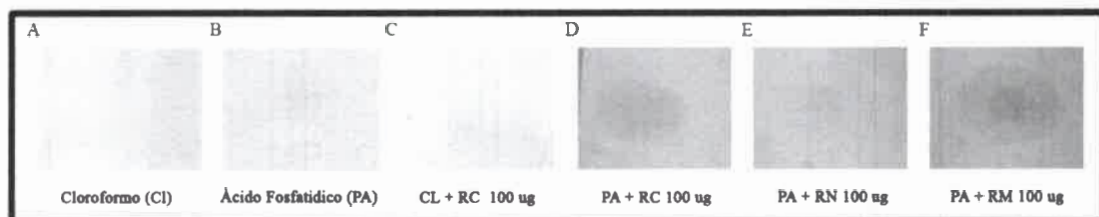


Figura 32: Ensayo de unión entre PA y tubulina en raíces. 10 μg de PA o Cl fueron sembrados en membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con 5% de leche descremada en TBS-Tween 20 (0.1%) e incubadas 24 h. en agitación a 4 $^{\circ}\text{C}$ con 100 μg de proteínas de la fracción citósica de 105.000 xg. Posteriormente las membranas fueron lavadas y reveladas contra α -tubulina. La reacción se reveló por el método colorimétrico durante 1 min. Referencia RC: Raíz Control, RN: Raíz NaCl 100 mM, RM: Raíz manitol 200 mM.

Estos resultados sugieren que la tubulina de la fracción citosólica es capaz de unirse a PA (dilinoleil-PA C18:2), sin embargo el mecanismo por el cual se une es aún desconocido. Podría ser por una interacción directa o a través de proteínas de unión a microtúbulos (MAPs) como ocurre en *Arabidopsis* (Zhang y col., 2012).

4.14 - Ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción de membrana

Resultados previos mostraron la presencia de tubulina en la fracción de membrana de 105.000 xg de coleótilos y raíces controles y estresados con NaCl y manitol. En la figura 33 se muestra el ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción de membrana de coleótilos controles y estresados. Se observó la presencia de tubulina de membrana de coleótilos unida a PA bajo las condiciones controles, de estrés salino y osmótico (Figura 33 D, E y F), en presencia de estrés salino y osmótico se observó una disminución del 20% respecto al control. En el control negativo de los anticuerpos no se observó reacción (Figura 33 A, B), al igual que la membrana unida a Cl en presencia de la fracción de membrana (Figura 33 C).

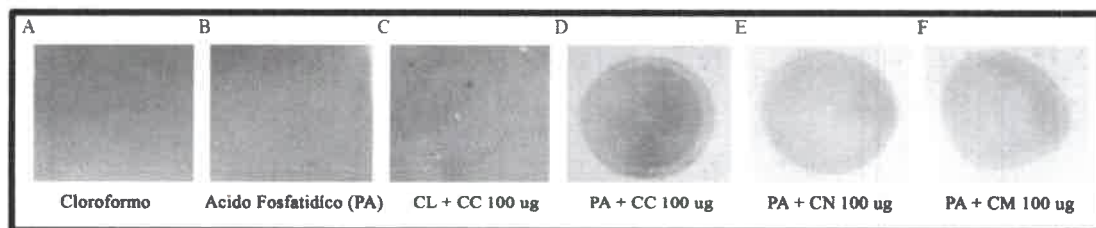


Figura 33: Ensayo de unión entre PA y tubulina de membrana en coleótilos. 10 µg de PA o Cl fueron sembrados en membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con 5% de leche descremada en TBS-Tween 20 (0.1%) e incubadas 24 h. en agitación a 4 °C con 100 µg de proteínas de la fracción de membrana de 105.000 xg. Posteriormente las membranas fueron lavadas y reveladas contra α-tubulina. La reacción se reveló por el método colorimétrico durante 1 min. Referencia CC: Coleótilo Control, CN: Coleótilo NaCl 100 mM, CM: Coleótilo manitol 200 mM.

En membrana de raíces controles y estresadas con NaCl y manitol se observó la presencia de tubulina unida al PA, mostrando un incremento del 50% cuando fueron expuestas a estrés salino y osmótico (Figura 34).

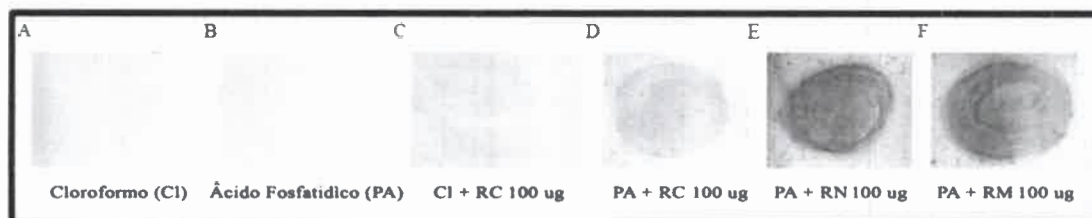


Figura 34: Ensayo de unión entre PA y tubulina de membrana en raíces. 10 µg de PA o Cl fueron sembrados en membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con 5% de leche descremada en TBS-Tween 20 (0.1%) e incubadas 24 h. en agitación a 4 °C con 100 µg de proteínas de la fracción de membrana de 105.000 xg. Posteriormente las membranas fueron lavadas y reveladas contra α-tubulina. La reacción se reveló por el método colorimétrico durante 1 min. Referencia RC: Raíz Control, RN: Raíz NaCl 100 mM, RM: Raíz manitol 200 mM.

La cantidad de tubulina unida al PA en la fracción de membrana fue mayor comparada con la fracción citosólica, ambas fueron incubadas con la misma cantidad de proteínas (100 µg) y fueron obtenidas de una misma extracción. En nuestro grupo de trabajo, Meringer (2013, Tesis doctoral) mostró durante el estrés salino y osmótico que en raíces los niveles de PA incrementaron, por lo cual se podría pensar una correlación positiva entre los niveles de PA y su capacidad de unir tubulina en la fracción de membrana.

La figura 35, muestra un modelo hipotético a partir de los resultados obtenidos de la interacción de tubulina al PA en cebada.

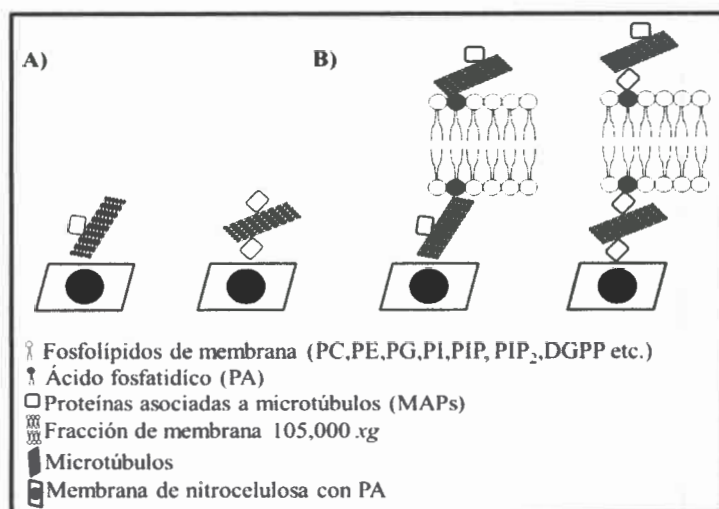


Figura 35: Modelo hipotético que muestra la interacción entre PA y tubulina a partir de la fracción citosólica y de membrana de coleóptilos y raíces de cebada. Referencia: A) Fracción citosólica. B) Fracción de Membrana.

Esta interacción puede darse debido a que tubulina se une al PA directamente o a través de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), al momento hay más de 40 MAPs descritas en *Arabidopsis* (Struk y Dhonukshe, 2013). En el panel A se observa los dos tipos posibles de interacción en la fracción citosólica y en el B los dos tipos de unión en la fracción membranal.

4.15 - Aislamiento de tubulina a partir de cerebro de rata

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto al cambio del contenido de α -tubulina en respuesta al estrés salino y osmótico en raíces y coleótilos de cebada, y a su posible interacción con el PA descrito anteriormente, se propuso realizar el aislamiento y purificación de tubulina para determinar si interacciona con PA. Dicho aislamiento se realizó a partir de ambos tejidos utilizando protocolos establecidos de extracción de tubulina a partir de células animales, debido que hasta el momento no hay protocolo de extracción a partir de plantas. El mismo fue realizado varias veces cambiando el volumen de tejido utilizado, sin poder lograr la extracción, por lo que se decidió realizar el aislamiento de tubulina a partir de cerebro de rata (Casale y col., 2001). Zhang y col., (2012) por falta de un protocolo de extracción en plantas utilizaron en sus experimentos tubulina aislada de cerebro porcino. En la figura 36, se observa el alineamiento de la secuencia de aminoácidos pertenecientes a α -tubulina proveniente de cebada (*Hordeum vulgare sp vulgare*); arábido (*Arabidopsis thaliana*); maíz (*Zea mays*) y rata (*Rattus norvegicus*) mediante el programa Vector NTI Advance 10, el cual arrojó una identidad del 78% la cual es elevada para proteínas y más en este caso proteínas estructurales.

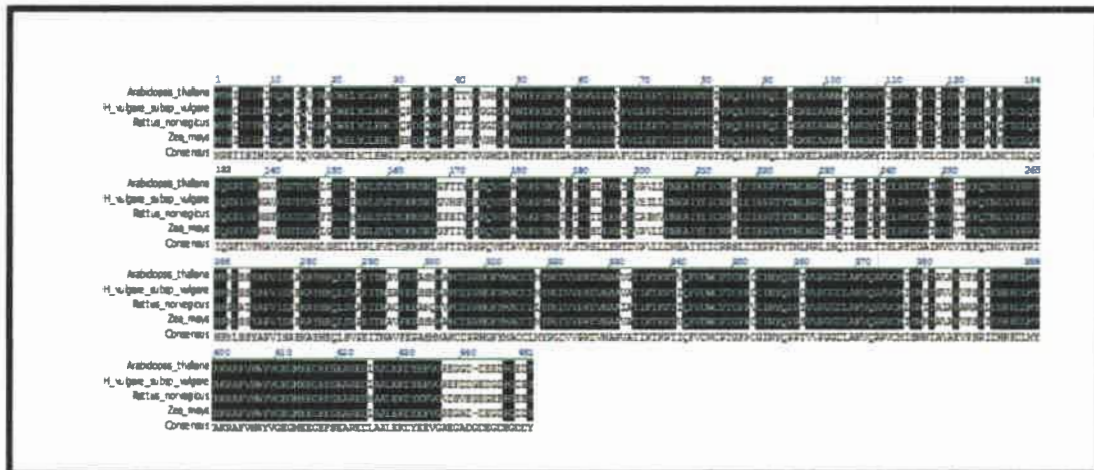


Figura 36: Alineamiento de secuencias de aminoácidos pertenecientes a α -tubulina a partir de varios organismos. Proteína α -tubulina de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: AAA32888.1), *Hordeum vulgare* sp *vulgare* (GenBank: AAB08791.1), *Zea mays* (GenBank: AAA16225.1) y *Rattus norvegicus* (GenBank: AAA42306.1) fueron alineadas usando el programa Vector NTI Advance 10. Residuos idénticos son indicados en negro.

Los sitios de unión de GTP a α -tubulina son del tipo Rossmann fold (residuos que conforman el dominio de unión a nucleótidos) y son idénticos entre las especies analizadas y solo cumple una función estructural (Gombos y col., 2013; Gregory y col., 2014), mientras que unido a β -tubulina es hidrolizado y esta hidrólisis modula la adición de nuevos dímeros α - β -tubulina durante la formación del microtúbulo. Así, el GTP se hidroliza tras un lapso de tiempo, lo que permite que, si la adición de dímeros es rápida, se forme el extremo (+) de β -tubulina unida a GTP, mientras que, de ser lenta, lo que se expone es tubulina unida a GDP. Por lo que la hidrólisis del GTP unido a β -tubulina es la que determina la velocidad de polimerización o despolimerización del microtúbulo. Debido a que la tubulina de rata comparte identidad con la de cebada se procedió a utilizarla en los ensayos posteriores.

En la figura 37 se observa la tinción de Coomassie y el western blott anti α -tubulina proveniente de 60 μ g de proteínas de la tubulina aislada a partir de cerebro de rata, el cual arrojó una banda de aproximadamente de 50 KDa que corresponde al peso molecular de tubulina en ambos casos.

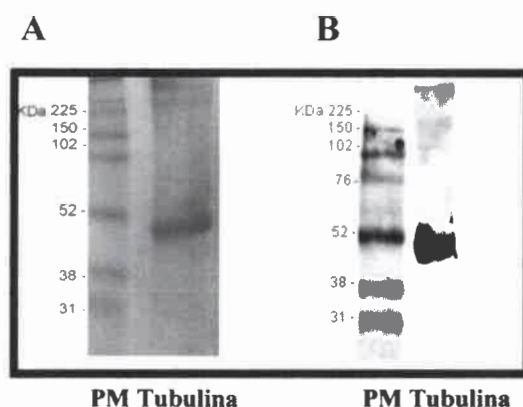


Figura 37: Extracción de tubulina de cerebro de rata. La tubulina fue obtenida a partir de cerebros de rata adulta, por el método descrito por Casale y col., (2001). Una fracción proteica total (60 µg) se separó por SDS-PAGE al 10%, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpo anti- α -tubulina. Las bandas se detectaron por el método colorimétrico. A) Tinción de Coomassie. B) Inmuno-detección de la proteína α -tubulina. Referencia: PM: Marcador de peso molecular.

4.16 – Ensayo de unión entre PA y tubulina purificada

Como se mencionó anteriormente Testerink y col., (2004) mediante un análisis proteómico proponen que tubulina es una proteína blanco de PA en *Arabidopsis*. Sin embargo la interacción no es directa, sino a través de una proteína de unión a microtúbulos (MAP) denominada atMAP65-1, cuya función es participar en la polimerización y agrupación de microtúbulos (Mao y col., 2005). Recientemente Pleskot y col., (2013) demostraron que el aumento de PA por acción de PLD α recluta a atMAP65-1 a la membrana e induce estabilización de los microtúbulos, confiriendo supervivencia frente a estrés salino. En la figura 38 se observa el ensayo de unión de tubulina aislada y purificada de cerebro de rata al PA fijado en membranas de nitrocelulosa y posteriormente revelados contra α -tubulina. Como resultado no se observó interacción directa de tubulina de cerebro de rata al PA (Figura 38 D). En *Arabidopsis*, Zhang y col., (2012) tampoco encontraron interacción directa entre tubulina aislada y purificada de porcino al PA. Considerando ambos resultados se sugiere que la unión de tubulina al PA en cebada probablemente sea a través de una MAP como ocurre en *Arabidopsis* (Zhang y col., 2012). Como control negativo de los anticuerpos también se reveló a las membranas con PA (Figura 38 A) y CI (Figura 38 B) que no se incubaron con tubulina.

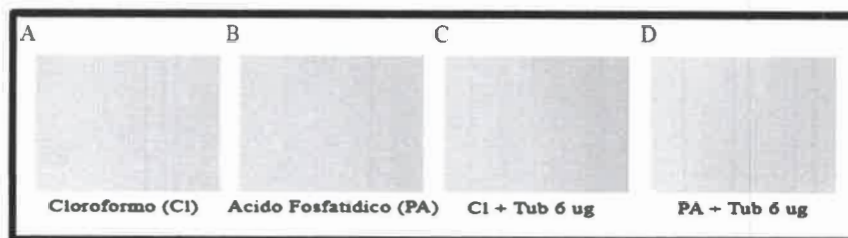


Figura 38: Ensayo de unión de tubulina al ácido fosfatídico. 10 μg de PA o Cl fueron sembrados en membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con 5% de leche descremada en TBS-Tween 20 (0.1%), incubadas 24 h. en agitación a 4 $^{\circ}\text{C}$ con 6 μg de tubulina (Tub) aislada de cerebro de rata. Posteriormente las membranas fueron lavadas y reveladas contra α -tubulina. La reacción se reveló por el método colorimétrico durante 1 min.

Sin embargo nos pareció interesante evaluar si la presencia de otra MAP promueve la unión de tubulina al PA. Para ello se realizó la extracción de tubulina a partir de cerebro de rata omitiendo el paso por la columna de fosfocelulosa que retiene las MAPs asociadas. En la figura 39 se observa que no hubo unión de tubulina de cerebro de rata al PA con las MAPs unidas.

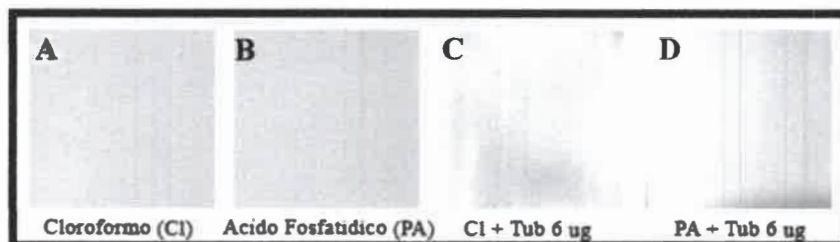


Figura 39: Ensayo de unión de tubulina con MAPs asociadas al ácido fosfatídico. 10 μg de PA o Cl fueron sembrados en membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con 5% de leche descremada en TBS-Tween 20 (0.1%), incubadas 24 h. en agitación a 4 $^{\circ}\text{C}$ con 6 μg de tubulina (Tub) aislada de cerebro de rata con MAPs asociadas. Posteriormente las membranas fueron lavadas y reveladas contra α -tubulina. La reacción se reveló por el método colorimétrico durante 1 min.

4.17 - Actividad PLD en coleóptilos y raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico

Entre las MAPs que se unen a microtúbulos en *Arabidopsis*, la MAP65-1 se asocia con los microtúbulos corticales al igual que las isoformas MAP65-2, MAP65-5, MAP65-8. Mientras que MAP65-3 y MAP65-4 se asocian con microtúbulos que forman el huso mitótico y MAP65-6 colocaliza con mitocondrias. Todavía no se ha descrito una MAP que pueda estar asociada al mismo tiempo con los microtúbulos del citósol y corticales.

Otra MAP descrita en *Arabidopsis* que se une a microtúbulos es la fosfolipasa D δ (Gardiner y col., 2001), sin embargo, esta isoforma tiene ubicación de membrana y se encuentra asociada a microtúbulos corticales. Las isoformas de PLD con mayor actividad en plantas son PLD α y PLD δ (Zhang y col., 2012). PLD α posee ubicación citosólica y de membrana y tiene la capacidad de translocarse del citósol a la membrana (Wang y col., 2014). PLD α y PLD δ actúan con concentraciones mM de Ca²⁺, el PIP₂ no es requerido para su actividad y las distingue la preferencia de sustrato. PLD α prefiere PC>PE, en contraste PLD δ utiliza PE>PC (Wang y col., 2014). Ambas están implicadas en la respuesta hídrica de la planta. La supresión de estas dos isoformas resultan en un incremento en la pérdida de agua (Distefano y col., 2012). El mecanismo por el cual se produce la pérdida de agua es por su función en la señalización de ABA la cual promueve el cierre estomático. La aplicación de PA exógena induce el cierre estomático, indicando que el PA producido por PLD promueve el cierre (Jiang y col., 2013). Sin embargo el camino en la señal de ABA difiere entre las isoformas. El PA producido por PLD α inhibe a la proteína fosfatasa ABI1 y ABA induce el cierre estomático, además el PA interacciona con NADPH oxidasa para la producción de H₂O₂ el cual disminuye los niveles de ABA, mientras que PLD δ está involucrada en la vía del H₂O₂ disminuyendo los niveles de ABA a través de la interacción con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa citosólica (Zhang y col., 2009; Guo y col., 2012).

La activación de PLD es importante para la organización de microtúbulos, la pérdida de su función deriva en una severa desorganización bajo estrés salino. PLD α está involucrada en la respuesta al estrés salino por parte de la planta y promueve la polimerización y unión de los microtúbulos (Zhang y col., 2012). Es posible evidenciar la actividad PLD a través de la reacción de transfosfatidilación, esta reacción es única para PLD y se caracteriza por la transferencia de un motivo fosfatidil de un fosfolípido a un alcohol primario para formar fosfatidil-alcohol en lugar de transferirlo al agua y formar PA. Bajo esa condición, se genera un fosfolípido no biológico denominado fosfatidilbutanol (PtdBut).

En la figura 40 A, se muestra una TLC de los productos de reacción de PLD utilizando como sustrato NBD-PC, formando PA (NBD-PtdOH) y en presencia de butanol el producto de transfosfatidilación fosfatidil butanol (NBD-PtdBut) en coleótilos controles y sometidos a estrés salino y osmótico. La figura 40 B, muestra la

actividad fosfolipasa D de coleóptilos expresada como porcentaje de formación de NBD-PdtBut en relación al control no estresado (100 %). Como se puede observar hay un aumento del 20% en la actividad en coleóptilos sometidos a condiciones de estrés salino y osmótico. En raíces (Figura 40 C) hubo un incremento un 40% en la actividad PLD en respuesta al NaCl, mientras que un incremento menor se observó en presencia de manitol (20%).

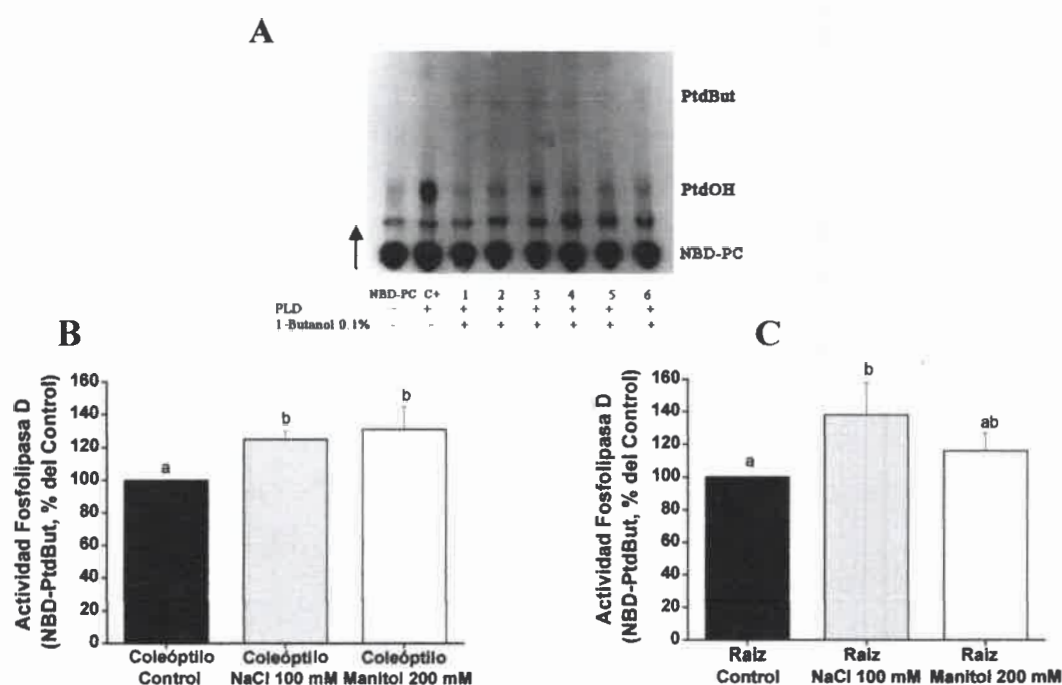


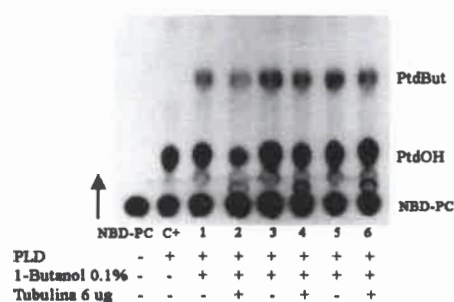
Figura 40: Actividad PLD en membranas de coleóptilos y raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico. La actividad se determinó con 60 µg de proteínas de la fracción de membrana (105.000 xg) de coleóptilos y raíces de cebada obtenida a partir de plantas controles y tratadas. La actividad de PLD se determinó como la formación de PtdBut. Los resultados corresponden a la media ± S.E., n=3, p<0.05. Referencia A) Imagen TLC, solvente 2,2,4 trimetilpentano:ácido acético:H₂O:acetato de etilo (2:3:10:13, v/v). B) Actividad PLD en coleóptilos de cebada. C) Actividad PLD en raíces de cebada.

4.18 - Actividad PLD en coleóptilos y raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico en presencia de tubulina purificada en la reacción

En base a la participación de la enzima PLD durante el estrés salino y osmótico y a su relación en la polimerización de los microtúbulos, se decidió evaluar si tubulina purificada aislada de cerebro de rata modifica su actividad. En la figura 41 A se muestra

la TLC del producto de la actividad PLD en coleóptilos controles y estresados en presencia y ausencia de tubulina purificada. En presencia de tubulina (Figura 41 B) se observó un efecto inhibitorio sobre la actividad PLD en condiciones control y tratados. En raíces se observó el mismo comportamiento, en presencia de tubulina purificada la actividad PLD se encuentra inhibida en respuesta al estrés salino y osmótico (Figura 42 B).

A



B

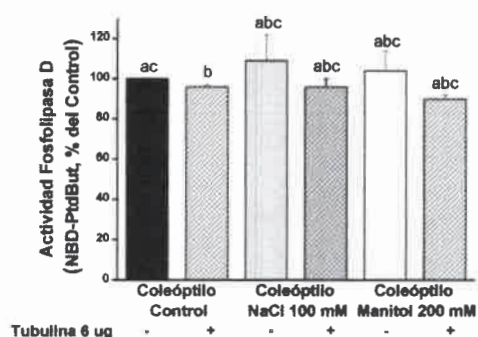
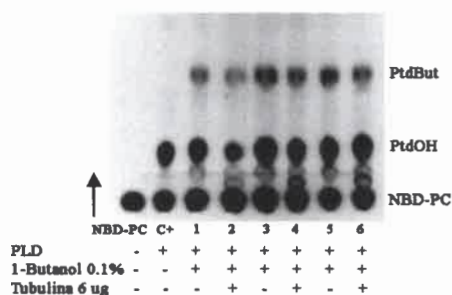


Figura 41: Actividad PLD en membranas de coleóptilos de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico en presencia de tubulina purificada. La actividad se determinó con 60 µg de proteínas de la fracción de membrana (105.000 xg) de coleóptilos con el agregado de un 10% de tubulina exógena a la reacción en condiciones controles y tratados. La actividad de PLD se determinó como la formación de PtdBut. Los resultados corresponden a la media ± S.E., n=3, p<0.05. Referencia A) Imagen TLC, solvente 2,2,4 trimetilpentano:ácido acético:H₂O:acetato de etilo (2:3:10:13, v/v). B) Actividad PLD en coleóptilos en presencia y ausencia de tubulina purificada.

A



B

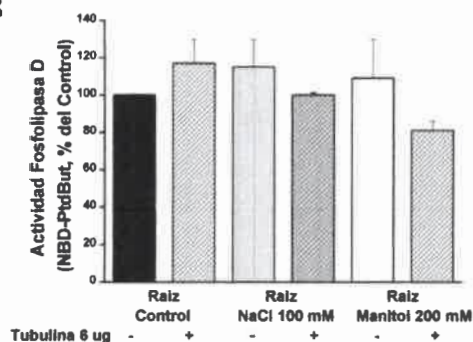


Figura 42: Actividad PLD en membrana de raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico en presencia de tubulina. La actividad se determinó con 60 µg de proteínas de la fracción de membrana (105.000 xg) de raíces con el agregado de un 10% de tubulina exógena a la reacción en condiciones controles y tratados. La actividad de PLD se determinó como la formación de PtdBut. Los resultados corresponden a la media ± S.E., n=3, p<0.05. Referencia A) Imagen TLC, solvente 2,2,4 trimetilpentano:ácido acético:H₂O:acetato de etilo (2:3:10:13, v/v). B) Actividad PLD en raíces en presencia y ausencia de tubulina purificada.

Estos resultados están de acuerdo con los mostrados por Zhang y col., (2012), en donde tubulina aislada de cerebro porcino inhibe la actividad PLD *in vitro* en *Arabidopsis*. Sin embargo el mecanismo por el cual se produce el fenómeno no es del todo claro.

4.19 - Actividad PLD en coleóptilos y raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico en presencia de Taxol y Nocodazole

El taxol (diterpeno cíclico) es uno de los muchos compuestos sintéticos antitumorales que afectan al citoesqueleto microtubular teniendo como diana la tubulina. El taxol se une al segundo dominio globular de β -tubulina. A diferencia de otros compuestos que se unen a la tubulina, como la colchicina, que inhibe el ensamblado de los microtúbulos, el taxol estabiliza el microtúbulo polimerizado y lo protege de su despolimerización. En contraste el nocodazole es un fármaco sintético (4-fluorophenyl)(thiophen-2-yl)methanone) al igual que el taxol induce la despolimerización de los microtúbulos por activación de la actividad GTPasa de β -tubulina. En base a esto, se decidió evaluar el efecto que producen ambos compuestos sobre la actividad PLD. Si PLD se encuentra unida al microtúbulo como una MAP, el efecto esperado del tratamiento *in vivo* con taxol sería una disminución en la actividad al no permitir el movimiento del microtúbulo en la célula, en relación a la capacidad de translocarse de la enzima del citósol a la membrana. En contraste al despolimerizar con nocodazole se podría esperar que la actividad incremente debido a que la enzima se encontraría libre y no unida al microtúbulo. En la figura 43 se observa el efecto que produce 10 μ M taxol y 20 μ M de nocodazole en coleóptilos controles y estresados cuando fueron tratados durante 1h *in vivo* con estos compuestos. Luego se realizó la obtención de membranas y se midió la actividad PLD (Figura 43 B). En membranas de coleóptilos ambos compuestos inhiben la actividad de la enzima en un 40% en presencia de estrés salino y un 10% en presencia de estrés osmótico.

En membranas de raíces en condiciones controles (Figura 44 B), el taxol y el nocodazole inducen la activación de la enzima, donde el incremento del taxol es el doble que el nocodazole (40 y 20%, respectivamente). Bajo estrés salino y osmótico se observó el comportamiento esperado donde el efecto del taxol provocó una disminución

aproximada del 40% en respuesta al estrés salino y de 20% en respuesta al estrés osmótico. Si bien el efecto del nocodazole fue disminuir la actividad, la inhibición fue mayor comparada con el taxol, en estrés salino disminuyó aproximadamente un 60% y en el osmótico un 30%.

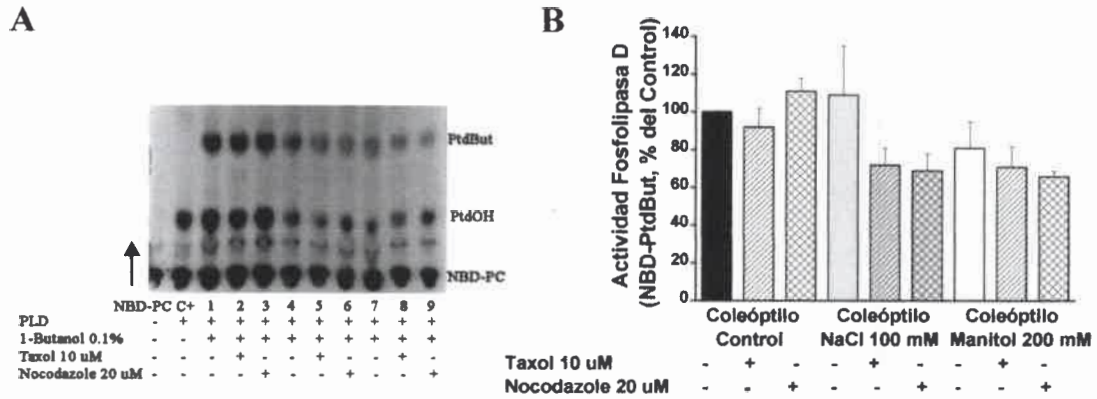


Figura 43: Actividad PLD de membrana de coleóptilos en respuesta al estrés salino y osmótico tratadas con taxol y nocodazole. Coleóptilos controles y en presencia de estrés fueron tratados durante 1h. con 10 μ M de Taxol y 20 μ M de Nocodazole. Luego se realizó la extracción de membrana y la actividad se determinó con 60 μ g de proteínas. La reacción se determinó con NBD-PC, los lípidos fueron extraídos y sembrados en placas de TLC. La actividad de PLD se determinó como la formación de PtdBut. Los resultados corresponden a la media \pm S.E., n=3, $p < 0.05$. A) Imagen de la TLC, solvente 2,2,4 trimetilpentano:ácido acético:H₂O:acetato de etilo (2:3:10:13, v/v). B) Actividad PLD en coleóptilos de cebada.

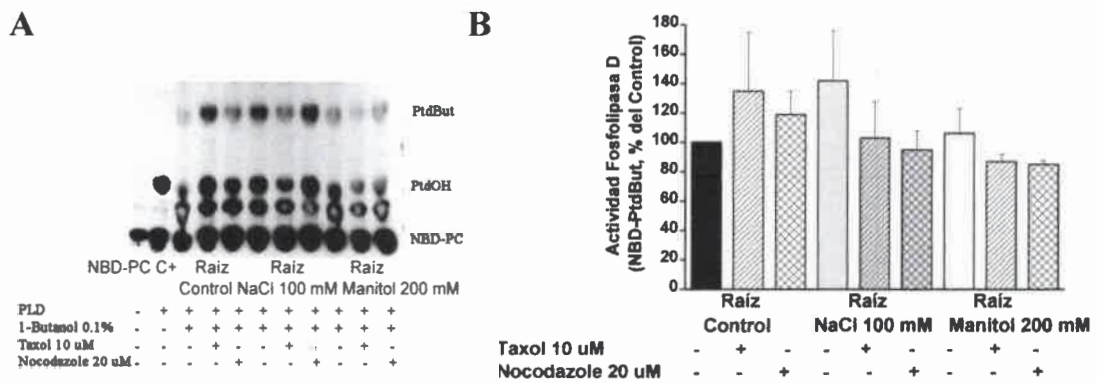


Figura 44: Actividad PLD de membrana de raíces en respuesta al estrés salino y osmótico tratadas con taxol y nocodazole. Raíces controles y en presencia de estrés fueron tratadas durante 1h. con 10 μ M de Taxol y 20 μ M de Nocodazole. Luego se realizó la extracción de membrana y la actividad se determinó con 60 μ g de proteínas. La reacción se determinó con NBD-PC, los lípidos fueron extraídos y sembrados en placas de TLC. La actividad de PLD se determinó como la formación de PtdBut. Los resultados corresponden a la media \pm S.E., n=3, $p < 0.05$. A) Imagen TLC, solvente 2,2,4 trimetilpentano:ácido acético:H₂O:acetato de etilo (2:3:10:13, v/v). B) Actividad PLD en raíces de cebada.

4.20 - Actividad PLD proveniente del ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción de membrana de coleóptilos y raíces en respuesta al estrés salino y osmótico

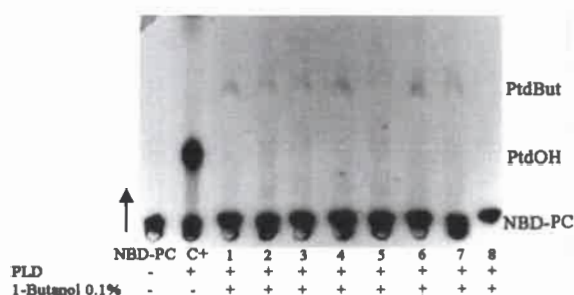
Hasta el momento pudimos observar que la actividad PLD está relacionada con el citoesqueleto microtubular en cebada, debido a que en presencia de tubulina y compuestos que afectan a los microtúbulos se modifica su actividad. Además observamos la interacción de tubulina con PA en la fracción citosólica y de membrana. Sin embargo tubulina purificada no fue capaz de interactuar con PA. Estos resultados obtenidos están de acuerdo con la hipótesis de que PLD está unida al microtúbulo como una MAP, que media la interacción entre el citoesqueleto microtubular y la membrana plasmática. Como se mencionó anteriormente hasta el momento PLD δ ha sido confirmada como una MAP en *Arabidopsis* (Gardiner y col., 2001). Sin embargo PLD α , no ha sido considerada como tal, aunque interviene en los procesos de reorganización de los microtúbulos, ya que el PA producido por PLD α interactúa con MAP65-1 e induce su reorganización en *Arabidopsis* (Zhang y col., 2012). Podemos sugerir a partir de nuestros resultados que la actividad PLD ensayada corresponde a PLD α , debido a que la mezcla de reacción contiene concentración mM de Ca²⁺, mientras que la PLD δ prefiere concentraciones del orden μ M, aunque en algunos casos actúa a concentraciones mM pero no del rango utilizado en nuestros ensayos (50 mM), además el sustrato utilizado PC es de su preferencia mientras que para PLD δ es PE. En *Arabidopsis* la pérdida de función de PLD δ , no influyó en la organización de los microtúbulos ni en la respuesta a las condiciones de estrés salino, mientras que ante la pérdida de función de PLD α la planta no fue capaz de sobrevivir a las condiciones de estrés (Zhang y col., 2012).

Si PLD α actúa como una MAP, la misma debería estar presente en el ensayo de unión de la fracción de membrana al PA, debido a que se observó la presencia de tubulina unida al PA. Para comprobar este supuesto se realizó un ensayo de unión de la fracción de membrana de coleóptilos y raíces al PA, luego se procedió a la extracción de las proteínas unidas y se midió actividad PLD. En la figura 45 podemos observar actividad PLD de coleóptilos como de raíces extraída del ensayo de unión al PA. En coleóptilos el comportamiento de la actividad fue similar al observado cuando se midió

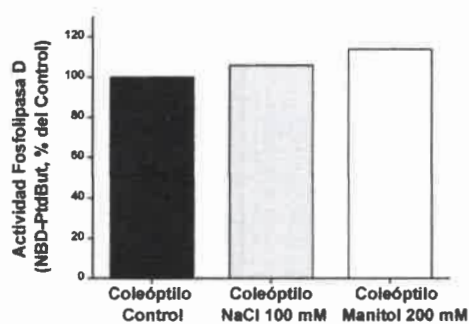
en la fracción de membrana (Figura 40 B), en donde en presencia del estrés salino y osmótico se observó aumento en la actividad (Figura 45 B). Sin embargo en raíces se observó una disminución de dicha actividad (Figura 45 C).

Este resultado sugiere que PLD se comportaría como una MAP en cebada conectado el citoesqueleto microtubular con la membrana plasmática y probablemente su interacción con PA sea debida ya que el mismo es el producto de acción de PLD.

A



B



C

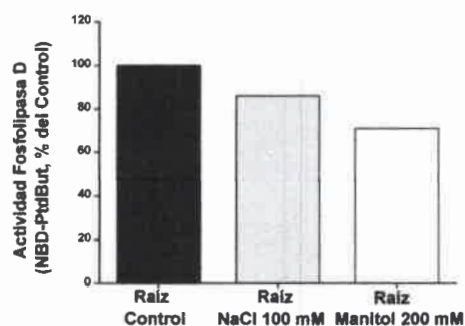


Figura 45: Actividad PLD proveniente del ensayo de unión entre PA y tubulina de la fracción de membrana de coleóptilos y raíces en respuesta al estrés salino y osmótico. Extracción de proteínas provenientes del ensayo de unión al PA se midió actividad PLD. La reacción se determinó con NBD-PC, los lípidos fueron extraídos y sembrados en placas de TLC. La actividad de PLD se determinó como la formación de PtdBut. A) Imagen TLC, solvente 2,2,4 trimetilpentano:ácido acético:H₂O:acetato de etilo (2:3:10:13, v/v). B) Actividad PLD en coleóptilos de cebada. C) Actividad PLD en raíces.

4.21 - Extracción de ARN a partir de coleóptilos y raíces de cebada en respuesta al estrés salino y osmótico

En función de los cambios en la actividad PLD α y del contenido de α -tubulina en coleóptilos y raíces controles y estresados se propuso evaluar si hay variación en los niveles de expresión de dichos genes en condiciones controles y de estrés salino y

osmótico. El ARN examinado por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 46) mostró las bandas intactas de ARNr 28S y 18S, indicando escasa degradación del ARN durante el proceso de extracción, más aun la relación de las absorbancias a 260:280 nm (medida de la pureza del ARN) fue mayor a 2 en todas las muestras. Estos parámetros demostraron una alta calidad del ARN total que satisface las necesidades para la construcción de la biblioteca de ADNc.

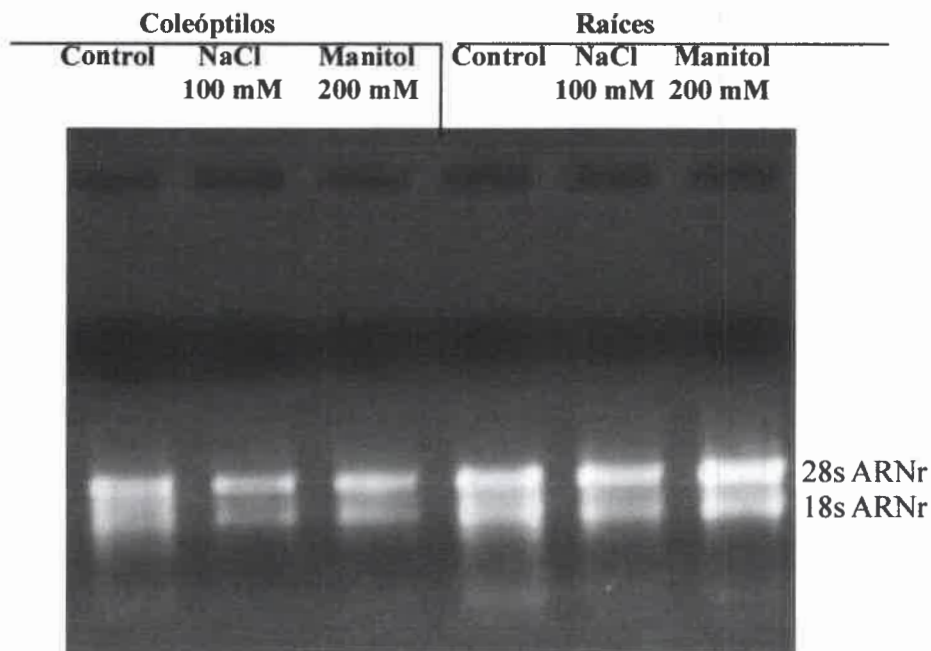


Figura 46: Extracción de ARN de coleóptilos y raíces de cebada. La extracción de ARN fue a partir de 100 mg de coleóptilos y raíces de plántulas controles y germinadas bajo estrés salino y osmótico mediante el kit de extracción *rna isolation from plant* (NucleoSpin RNA Plant). Se sembraron 2 μ l de RNA en gel de agarosa al 1% con el agregado de 10 μ g/ml de bromuro de etidio (EtBr) y visualizados con transiluminador UV.

4.22 - Expresión de α -tubulina y PLD α de raíces de cebada

El ARN obtenido mediante el kit fue tratado con DNAsa y utilizado para la obtención de ADNc mediante el kit RT de promega, posteriormente con el ADNc se realizó una PCR con cebadores diseñados para α -tubulina y PLD α . La figura 47 muestra el producto de PCR para α -tubulina y PLD α de raíces controles y sometidas a estrés salino y osmótico. El análisis de la expresión para α -tubulina arrojó el producto esperado de 524 pb, observándose un incremento en la expresión del gen durante el

estrés osmótico. La expresión de PLD α arrojó un producto de 335 pb observándose un aumento en la expresión en respuesta al estrés salino y osmótico.

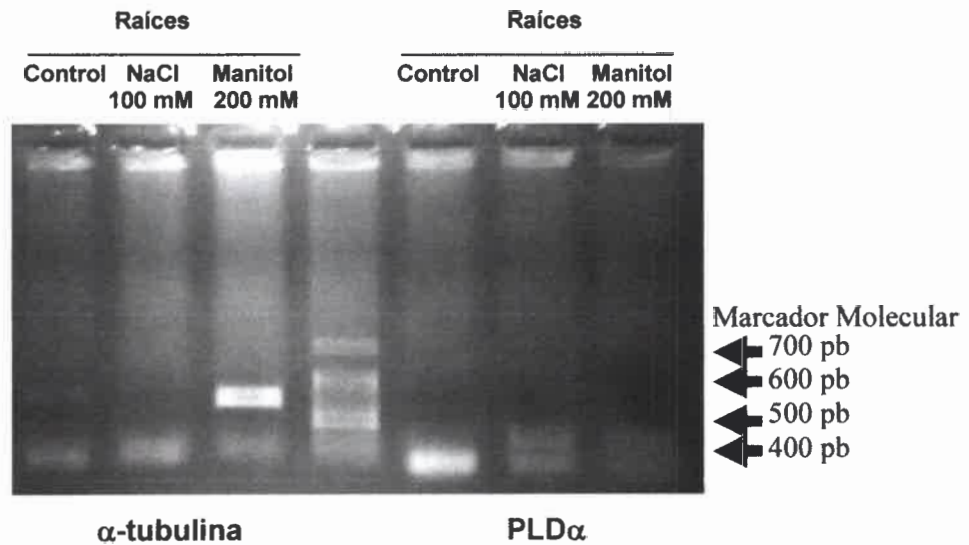


Figura 47: Expresión de α -tubulina y PLD α de raíces de cebada. La extracción de ARN fue a partir de 100 mg de raíces de plántulas controles y germinadas bajo estrés salino y osmótico mediante el kit de extracción *rna isolation from plant* (NucleoSpin RNA Plant). Se analizó la expresión por PCR mediante el uso de ADNc con cebadores diseñados para PLD α y α -tubulina en gel de agarosa al 1% con el agregado de 10 μ g/ml de bromuro de etidio (EtBr) y visualizados con transiluminador UV.

Estos resultados están en concordancia con las pruebas bioquímicas realizadas en cuanto al contenido de α -tubulina y actividad PLD α , donde el estrés salino en raíces disminuye el contenido de tubulina y el osmótico lo incrementa. En cuanto a la actividad PLD tanto el estrés salino como el osmótico incrementó su actividad, sugiriendo así que la enzima es de vital importancia para para la adaptación de los tejidos vegetales a estas condiciones desfavorables.

Conclusiones

Los fosfolípidos son componentes vitales de las membranas que cumplen funciones muy importantes durante el ciclo de vida de la planta funcionando como mediadores en la transducción de la señal y generando la respuesta adecuada. La germinación de las semillas incluyen eventos fisiológicos, celulares, bioquímicos y moleculares que son necesarios para el saliente del eje embrionario (Nonogaki y col., 2010; Bewley y col., 2013). Al iniciarse la germinación, tanto la percepción como la transducción de la señal son importantes durante las primeras etapas del desarrollo de la plántula. La complejidad de las señales basadas en fosfolípidos incluye una variedad de enzimas que metabolizan dichos compuestos y sus correspondientes productos, los que conectan numerosos procesos celulares.

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que los fosfolípidos de membrana juegan un papel fundamental en la conversión de señales externas en internas afectando la fisiología celular (Villasuso y col., 2003; Villasuso y Machado 2004, Meringer y col., 2012).

Los resultados presentados en éste trabajo permiten concluir que durante la germinación temprana de semillas de cebada la presencia del estrés salino y osmótico:

- ✓ Afectó el porcentaje de germinación.
- ✓ Provocó disminución de la longitud de cada tejido analizado.
- ✓ Se determinó que ambos tejidos sometidos a condiciones de estrés salino incrementan el volumen celular como así también el contenido de Na^+ intracelular en respuesta a estrés salino.
- ✓ Provocó cambios morfológicos en respuesta a estrés salino.
- ✓ Incrementó el contenido de solutos.
- ✓ Provocó disminución del potencial osmótico.
- ✓ Provocó modificación del citoesqueleto microtubular en respuesta a estrés salino.

Con respecto a las vías de señalización que se ponen en marcha durante la respuesta al estrés salino y osmótico:

- ✓ Incrementó la actividad PLC en ambos tejidos durante el estrés salino.
- ✓ Incrementó la actividad PLD en respuesta a ambos estreses.

De acuerdo a la relación entre PLD y el citoesqueleto microtubular:

- ✓ Se observaron cambios en la concentración de α -tubulina total y de membrana y estos cambios fueron dependientes de la concentración de los efectores utilizados.
- ✓ Se observó la presencia de tubulina unida al PA de la fracción citosólica y de membrana en ambos tejidos y en respuesta a las condiciones de estrés.
- ✓ El incremento en la unión al PA de tubulina en membranas de raíces bajo estrés salino y osmótico se correlacionó con el incremento en el contenido de α -tubulina de membrana de raíces y éstos con el incremento de la actividad PLD, sugiriendo así una posible participación de PLD como una proteína asociada a microtúbulos y su papel en la respuesta a las condiciones de estrés salino y osmótico.
- ✓ Este hecho se sustenta en que: i) tubulina exógena inhibió la actividad PLD; ii) el uso de compuestos que estabilizan y desestabilizan microtúbulos afectaron su actividad y iii) realizando la medición de la actividad PLD a partir de la extracción de proteínas unidas a PA se observó la presencia de la enzima.
- ✓ El nivel de expresión de PLD α y α -tubulina en respuesta a estrés osmótico y salino en raíces guardó relación con las pruebas bioquímicas realizadas en cuanto a la actividad y contenido de tubulina.

Los resultados confirman la hipótesis planteada oportunamente, **“En respuesta a procesos de estrés las plantas modifican su estructura interna y en ello involucran actividades enzimáticas relacionadas al metabolismo de fosfolípidos”**.

Bibliografia

- Ariga H, Katori T, Yoshihara R, Hase Y, Nozawa S, Narumi I, Iuchi S, Kobayashi M, Tezuka K, Sakata Y, Hayashi T, Taji T (2013).** Arabidopsis sos1 mutant in a salt-tolerant accession revealed an importance of salt acclimation ability in plant salt tolerance. *Plant Signal Behavior*, 8 (7): e24779.
- Azza Mazher A, Fatma E, Quensi E, Farahat M (2007).** Responses of ornamental plants and woody trees to salinity. *World J. Agric. Sci.*, 3(3): 386-395.
- Bargmann B, Laxalt A, Ter Riet B, Van Schooten B, Merquiol E, Testerink C (2009).** Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiol.* 50: 78-98.
- Bargmann B, Munnik T (2006).** The role of phospholipase D in plants stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 515-22.
- Barkla B, Pantoja O (1996).** Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 47: 159-184.
- Barragan V, Leidi E, Andres Z, Rubio L, De Luca A (2012).** Ion Exchangers NHX1 and NHX2 Mediate Active Potassium Uptake into Vacuoles to Regulate Cell Turgor and Stomatal Function in Arabidopsis. *Plant Cell.* 24: 1127–1142.
- Berridge M (1993).** Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature.* 361: 315-325.
- Bewley D (1997)** Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Boyer JS (1982).** Plant productivity and environment. *Science* 218: 443 – 448.
- Bradford M (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-254.
- Brandizzi F, Wasteneys G (2013).** Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: an emerging role for microtubules. *Plant J.* 75: 339–349.
- Breckle S (2002).** Salinity, halophytes and salt-affected natural ecosystems. In: *Salinity: environment plant molecules*. Ed: Lauchli, A. Luttge, U. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. NL: pp 53-77.
- Casale H, Alonso A, Barra H (2001).** Brain plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase is inhibited by acetylated tubulin. *Mol. Cel. Biochem.* 216: 85–92.
- Chapman K (1998).** Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci.* 3: 412-419.
- Chen Z, Pottosin I, Cuin T, Fuglsang A, Tester M, Jha D, Zepeda-Jazo I, Zhou M, Palmgren M, Newman I, Shabala S (2007).** Root Plasma Membrane Transporters Controlling K⁺/Na⁺ Homeostasis in Salt-Stressed Barley. *Plant Physiol.* 145: 1714–1725.

- Cisneros J, Cantero J, Cantero A (1997).** Vegetation, soil hydrophysical properties, and grazing relationships in saline-sodic soils of Argentina. *Can. J. Soil Sci.* 79: 399-409.
- Crockcroft V, Ortells M, What G (1995).** Ligands receptor models, and evolution. In diversity of interacting receptors. Ed Abood, L.G. y Lajtha, A. USA. Vol 757: pp 40-50.
- Darwish E, Testerink C, Khalil M, El-Shihy O, Munnik T (2009).** Phospholipid Signaling Responses in Salt-Stressed Rice Leaves. *Plant Cell Physiol.* 50(5): 986-997.
- DeWald D, Torabinejad J, Jones C, Shope J, Cangelosi A, Thompson J, Prestwich G, Hama H (2001).** Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 759-769.
- Dhonukshe P, Laxalt A, Goedhart J, Gadella T, Munnik T (2003).** Phospholipase D Activation Correlates with Microtubule Reorganization in Living Plant Cells. *Plant Cell* 15: 2666-2679.
- Distefano A, Scuffi D, Garcia-Mata C, Lamattina L, Laxalt A (2012).** Phospholipase Ddelta is involved in nitric oxide-induced stomatal closure. *Planta* 236:1899-1907.
- Divecha N, Irvine R (1995).** Phospholipid signaling. *Cell* 80: 269-347.
- Dowd PE, Gilroy S (2010).** The Emerging Roles of Phospholipase C in Plant Growth and Development. T. Munnik (ed.), *Lipid Signaling in Plants, Plant Cell Monographs* 16, pp 23-17.
- Dreyer I, Uozumi N (2011).** Potassium channels in plant cells. *FEBS J.* 278: 4293-4303.
- Dubey R, Rani M (1990).** Influence of NaCl Salinity on the Behaviour of Protease, Aminopeptidase and Carboxypeptidase in Rice Seedlings in Relation to Salt Tolerance. *Australian J. of Plant Physiol.* 17: 215 - 221.
- Epstein E, Norlyn JD, Rush DW, Kingsbury RW, Kelley DB, Cunningham GA (1980).** Saline culture of crops: a genetic approach. *Sci.* 210: 399 - 404.
- Exton J (1997).** New developments in phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 272: 15579-15582.
- Fan L, Zheng S, Wang X (1997).** Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid-ethylene promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 9: 2183-2196.
- Fincher G (1989).** Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 40: 305-346.
- Frank W, Munnik T, Kerkmann K, Salamini F, Bartels D (2000).** Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12: 111-123.

- Gardiner J, Harper J, Weerakoon N, Collings D, Ritchie S, Gilroy S, Cyr R, Marc J (2001).** A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell* 13: 2143-2158.
- Ghoulam C, Foursy A, Fares K (2002).** Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 47: 39–50.
- Glenn E, Brown J y Blumwald E (1999).** Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Rev. Plant Sci.* 18: 227-255.
- Gombos L, Neuner A, Berynsky M, Fava L, Wade R, Sachse C, Schiebel E (2013).** GTP regulates the microtubule nucleation activity of γ -tubulin. *Nature Cell Biology.* Vol. 15: 1317–1327.
- Guo L, Devaiah S, Narasimhan R, Pan X, Zhang Y, Zhang W, Wang X (2012).** Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases Interact with Phospholipase Dd to Transduce Hydrogen Peroxide Signals in the Arabidopsis Response to Stress. *Plant Cell*, 24: 2200–2212.
- Heim S, Wagner K (1990).** Kinetics of incorporation of labelled inorganic phosphate into the phospholipids of suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Physiol.* 90: 7-13.
- Ho A, Day D, Brown M, Marc J (2009).** Arabidopsis phospholipase D delta as an initiator of cytoskeleton-mediated signaling to fundamental cellular processes. *Funct Plant Biol.* 36: 190-198.
- Hsiao T, Xu L (2000).** Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *J. Exp. Botany* 51: 1596–1616.
- Jenkins G, Frohman M (2005).** Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol. Life Sci.* 62: 2305-2316.
- Jiang Y, Wu K, Lin F, Qu Y, Liu X, Zhang Q (2013).** Phosphatidic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Planta* 239: 565-575.
- Johansen D (1940).** *Plant Microtechnique* (New York: McGraw-Hill Book Co Inc.) pp 523.
- Katagiri T, Ishiyama K, Kato T, Tabata S, Kobayashi M, Shinozaki K (2005).** An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 43: 107-117.

- Katagiri T, Takahashi S, Shinozaki K (2001).** Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, At PLDd, in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signaling. *Plant. J.* 26: 595-605.
- Kim S, Guo, L, Wang, X (2013).** Phosphatidic Acid Binds to Cytosolic Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase and Promotes Its Cleavage in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 288: 11834-11844.
- Laemmli U (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laxalt A, Munnik T (2002).** Phospholipid signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 332- 338.
- Lee S, Park J, Lee Y (2003).** Phosphatidic acid induces actin polymerization by activating protein kinases in soybean cells. *Mol. Cells.* 15: 313–319.
- Lee S, Suh S, Kim S, Crain R, Kwak J, Nam H, Lee Y (1997).** Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants. *Plant J.* 12: 547–556.
- Liu H, Huang W, Pan Q, Weng F, Zhan J, Liu Y, Wan S, Liu Y (2006).** Contributions of PIP(2)-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *J. Plant Physiol.* 163: 405-416.
- Maas E, Nieman R (1978).** *Physiology of Plant Tolerance to Salinity.* Ed. Am. Soc. Agron, Madison pp 277-299.
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas J, Damsz B, Narasimhan M, Hasegawa P, Joly R and Bressan R (2002).** Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction?. *Plant J.* 31(6), 699-712.
- Mao G, Chan J, Calder G, Doonan J, Lloyd C (2005).** Modulated targeting of GFP-AtMAP65-1 to central spindle microtubules during division. *Plant J.* 43: 469-78.
- Martínez-Estévez M, Ku-González A, Muñoz-Sánchez J, Loyola-Vargas V, Pérez-Brito D, Tapia-Russell R, Escamilla-Bencomo J, Hernández-Sotomayor S (2003).** Changes in some characteristics between the wild and Al-tolerant coffee (*Coffea arabica* L.) cell line. *J. Inorg. Biochem.* 97: 69-74.
- Maser P, Thomine, S, Schroeder J, Ward J, Hirsch K, Sze H, Talke I, Amtmann A, Maathuis F, Sanders D, Harper J, Tchieu J, Gribskov M, Persans M, Salt D, Kim S, Gueriot M (2001).** Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126: 1646-67.
- McDermott M, Wakelam M, Morris A (2004).** Phospholipase D. *Biochem. Cell Biol.* 82: 255- 253.

- Meijer H, Munnik T (2003).** Phospholipid-based signalling in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 54: 265- 306.
- Meringer M (2013).** Señal celular disparada por fitohormonas y efectores abióticos en coleóptilos, raíces y aleurona de cebada (*Hordeum vulgare*). Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Meringer M, Villasuso A, Pasquaré S, Giusto N, Machado E, Racagni G (2012).** Comparative phytohormone profiles, lipid kinase and lipid phosphatase activities in barley aleurone, coleoptile, and root tissues. *Plant Physiol. Biochem.* 58: 83-88.
- Munnik T (2001).** Phosphatidic acid: a second messenger in signaling plants. *Trends Plant Sci.* 6: 227- 233.
- Munnik T, de Vrije T, Irvine R, Musgrave A (1996).** Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants. *J. Biol. Chem.* 27: 15708- 15715.
- Munnik T, Irvine E, Musgrave A (1994).** Rapid turnover of phosphatidylinositol 3-phosphate in the green alga *Chlamydomonas* eugametos: signs of a phosphatidylinositide 3-kinase signalling pathway in lower plants? *Biochem. J.* 298: 269-273.
- Munnik T, Irvine R, Musgrave A (1998a).** Phospholipid signalling in plants. *Biochem. Biophys. Acta* 1389: 222- 272.
- Munnik T, Meijer H, Riet B, Hirt H, Frank W, Bartels D, Musgrave A (2000).** Hyperosmotic stress stimulate phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J.* 22: 147-154.
- Munnik T, van Himbergen J, Riet B, Braun F, Irving R, Van den Ende H, Musgrave A (1998b).** Detailed analysis of the turnover of polyphosphoinositides and phosphatidic acid upon activation of phospholipase C and D in *Chlamydomona* cells treated with non-permeabilizing concentrations of mastoparan. *Planta* 207: 133- 145.
- Nonogaki H, Bassel G, Bewley J (2010).** Germination – still a mystery. *Plant Sci.*, 179: 574–581.
- Othman Y, Al-Karaki G, Al-Tawaha A, Al-Horani A (2006).** Variation in Germination and Ion Uptake in Barley Genotypes under Salinity Conditions. *World J. Agric. Sci.* 2: 11- 15.
- Parre E, Ghars A, Leprince A, Thiery L, Lefebvre D, Bordenave M, Richard L, Mazars C, Abdelly C, Savoure A (2007).** Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144: 503– 512.

- Parrotta L, Cai G, Cresti M (2010).** Changes in the accumulation of alpha- and beta-tubulin during bud development in *Vitis vinifera* L. *Planta*. 231(2): 277-91.
- Peters N, Logan K, Miller A, Kropf D (2007).** Phospholipase D Signaling Regulates Microtubule Organization in the Furoid Alga *Silvetia compressa*. *Plant Cell Physiol*. 48: 1764-1774.
- Pical C, Westergren T, Dove S, Larsson C, Sommarin M (1999).** Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *J. Biol. Chem*. 274: 38232-38240.
- Pitman MG, Lauchli A (2002).** Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: *Salinity: environment-plant-molecules*. Lauchli A., Luttge U. (eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. NL. 3-20.
- Pleskot R, Li J, Zarsky V, Potocky M, Staiger CJ (2013).** Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends Plant Sci*. 1058: 1–9.
- Qin C, Wang X (2002).** The Arabidopsis phospholipase D family: Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholineselective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiol*. 128(3):1057-1068.
- Ritchie S, Gilroy S (1998).** Abscisic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 2697-2702.
- Rodríguez-Pérez L (2006).** Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. *Agronomía Colombiana* 24(1): 28-37.
- Ruzin SE (1999).** Plant microtechnique and microscopy. In *New Phytol*. Ed. Oxford, UK: Oxford University pp 57-58.
- Saboora A, Kiarostami K, Behroozbayati F, Hashemi S (2006).** Salinity (NaCl) tolerance of wheat genotypes at germination and early seedling growth, Pakistan. *J. Biol. Sci*. 9(11): 2009-2021.
- Stevenson J, Perera I, Heilmann I, Persson S, Boss W (2000).** Inositol signalling and plant growth. *Trends Plant Sci*. 5(20): 252- 258.
- Struk S, Dhonukshe (2013).** MAPs: cellular navigators for microtubule array orientations in Arabidopsis. *Plant Cell Rep*. DOI 10.1007/s00299-013-1486_2. Review Online.
- Sugimoto K, Williamson R, Wasteneys G (2000).** New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of arabidopsis. *Plant Physiol* 124: 1493–1506.

- Takahashi S, Katagiri T, Hirayama T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001).** Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* Cell Culture. *Plant Cell Physiol.* 42(2): 214–222.
- Tanji K (2002).** Salinity in the soil environment. In: Salinity: environment-plants-molecules. Ed: Lauchli, A. Luttge, U. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. NL pp 21-52.
- Testerink C, Dekker H, Lim Z, Johns M, Holmes A, De Koster C, Ktistakis N, Munnik T (2004)** .Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *Plant J.* 39 (4): 527-536.
- Thiery L, Leprince A, Lefebvre D, Ali Ghars M, Debarbieux E, Savoure A (2004).** Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279 (15): 14812–14818.
- Usorach J (2010).** Efecto del estrés osmótico y salino sobre el metabolismo lipídico y acumulación de prolina en coleoptilos y raíces de cebada (*Hordeum vulgare*). Tesina de Grado. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Venema K, Quintero F, Pardo J, Donaire J (2002).** The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *J Biol Chem.* 277: 2413-2418.
- Villasuso A, Machado E (2004).** Gibberellin signaling pathway: role of phospholipids in barley aleurone. *Plant Growth Regul.* 43: 101-108.
- Villasuso A, Molas M, Racagni G, Abdala G, Machado-Domenech E (2003).** Gibberellin signaling in barley aleurone: early activation of PLC by G proteína mediates amylase secretion. *Plan Growth Regul.* 41: 197-205.
- Wang C, Zhang LJ, Huang RD (2011).** Cytoskeleton and plant salt stress tolerance. *Plant Signal. Behavior* 6: 29-31.
- Wang S, Kurepa J, Hashimoto T, Smalle JA (2011).** Salt stress–induced disassembly of arabidopsis cortical microtubule arrays involves 26S proteasome–dependent degradation of SPIRAL1. *Plant Cell* 23: 3412–3427.
- Wang X (2005).** Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development and stress responses. *Plant Physiol.* 139: 566 – 573.
- Wang X, Guo L, Wang G, Li M (2014).** Phospholipases in Plant Signaling, Signaling and Communication in Plants. DOI 10.1007/978-3-642-42011-51. Online Review.

- Wang X, Zhang W, Li W, Mishra G (2004).** Phospholipid signaling in plant response to drought and salt stress. M.A. Jenks et al. (eds.), *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, pp 183–192.
- Wang Y, Zhang W, Li K, Sun F, Han C, Wang Y, Li X (2008).** Salt-induced plasticity of root hair development is caused by ion disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res.* 121: 87–96.
- Ward D, Ohanian J, Heagerty A, Ohanian V (1995).** Phospholipase D-induced phosphatidate production in intact small arteries during noradrenaline stimulation: involvement of both G-protein and tyrosine-phosphorylation-linked pathways. *Biochem. J.* 307: 451- 456.
- Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou HE (2002).** Profiling membrane lipids in plant stress responses: role of phospholipase D α in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 31994-2002.
- Wu D, Cai S, Chen M, Ye L, Chen Z, Zhang H, Dai F, Wu F, Zhang G (2013).** Tissue Metabolic Responses to Salt Stress in Wild and Cultivated Barley. *Plos One* 8: e55431.
- Young S, Wang X, Leach J (1996).** Changes in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during resistant interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Cell.* 8: 1079-1090.
- Zalejski C, Zhang Z, Quettier A, Maldiney R, Bonnet M, Braut M, Demandre C, Miginiac E, Rona JP, Sotta B, Jeannette E (2005).** Diacylglycerol pyrophosphate is a second messenger of abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J.* 42: 145-152.
- Zhang Q, Lin F, Mao T, Nie J, Yan M, Yuan M, Zhang W (2012).** Phosphatidic Acid Regulates Microtubule Organization by Interacting with MAP65-1 in Response to Salt Stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 4555–4576.
- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X (2004).** Phospholipase D 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Procc. Nat. Acad. Sci. of the USA.* 101: 9508-9513.
- Zhao J, Wang X (2004).** *Arabidopsis* phospholipase D α 1 interacts with the heterotrimeric G-protein α -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 279: 1794–1800.
- Zhao J, Wang X (2013).** Biochemical Analysis of the Interaction Between Phospholipase D α 1 and GTP-Binding Protein α -Subunit from *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol. Biol.* 1043: 21-35.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis fueron presentados en los siguientes congresos:

- **Usorach J**, Meringer V, Machado E, Racagni G. "Signalling pathways in response to salt and osmotic stress in barley roots (*Hordeum vulgare*)". **CELL SIGNALING NETWORK, 13 TH INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (IUBMB) Conference, 1st Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB) Conference and 3rd Meeting of the Signal Transduction and Oxidative Stress Branches of Sociedad Mexicana de Bioquímica**. Mérida, Yucatán, México, Octubre 22-27 de 2011.
- **Jl Usorach**, MV Meringer, AL Villasuso, EE Machado, GE Racagni. Phospholipase Activities Correlate With Proline Accumulation Under Saline Stress In Barley Roots. XLIV Reunión Anual – **SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. SAIB**. 29 de Octubre al 1 de Noviembre del 2012. Mendoza. Argentina.
- **Usorach JI**, Ku-Gonzales AF, Villasuso AL, Machado EE, Racagni GE. Morphological and Biochemical Changes Under Saline Stress In Barley Roots (*Hordeum vulgare*). XLV Reunión Anual – **SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. SAIB**. Del 6 al 7 de Noviembre del 2013. Buenos Aires. Argentina.