



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



Departamento de Biotecnología

**“FUNCIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA FLORACIÓN ACELERADA POR
ESTRÉS EN *ARABIDOPSIS THALIANA*”**

Silvia Segarra Manzano
TESIS DOCTORAL

Director:
Dr. José León Ramos

Valencia, 2007



INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR
Y CELULAR DE PLANTAS "Primo Yúfera"



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
DE VALENCIA
AVDA. DE LOS NARANJOS, S/N.
46022 VALENCIA - ESPAÑA
TEL. 34 (9) 63877730
FAX 34 (9) 63877879
<http://www.ibmcp.upv.es>

Dr. D. José León Ramos, Científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada "FUNCIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA FLORACIÓN ACELERADA POR ESTRÉS EN *ARABIDOPSIS THALIANA*." ha sido realizada por Silvia Segarra Manzano bajo mi dirección, y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo.

Para que así conste a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a nueve de Noviembre de dos mil siete.

Fdo. José León Ramos.

A mis padres

RESUMEN

En *Arabidopsis*, el momento en que se produce la transición a la floración viene determinado por la interacción entre la competencia de la planta para su desarrollo interno y las señales medioambientales que determinan las condiciones favorables para el suceso reproductivo. Sin embargo, plantas expuestas a condiciones de estrés medioambiental pueden activar el programa de floración prematuramente. Algunos factores de estrés capaces de alterar el tiempo de floración, como la infección por patógenos, temperaturas extremas o altas irradiaciones, conllevan un incremento en los niveles de algunos metabolitos como etileno, ácido abscísico y ácido salicílico (SA) (Blee, 2002; Dempsey *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 1996; Pastori y Foyer, 2002; Raskin, 1992).

Estudios recientes sugieren que SA pueda ser un regulador de la transición a la floración en plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés (Martínez *et al.*, 2004). Para que se produzca un adelanto en el tiempo de floración en plantas sometidas a irradiación con luz UV-C es necesaria tanto la síntesis como la acumulación de SA, ya que no se produce en plantas transgénicas nahG, que no acumulan SA ya que lo degradan rápidamente a catecol. Sin embargo, se desconoce en gran medida el mecanismo mediante el cual SA regula el tiempo de floración.

Mediante el uso de plantas transgénicas en las que el promotor de *BGL2*, gen *PR* inducible por SA, está fusionado al gen reportador GUS, se determinó el espacio temporal en el que se correlacionan cambios en los niveles endógenos de SA con la activación de la expresión de genes que inducen la transición floral. Bajo nuestras condiciones de cultivo, el décimo día tras la siembra se da un aumento tanto de los niveles de tinción GUS, asociados al tejido vascular, como de la expresión del gen *ICSI/SID2* que codifica la isocorismato sintasa 1 encargada de sintetizar SA en *Arabidopsis* (Wildermuth *et al.*, 2001) y del gen activador de la floración *FT*, cuya proteína ha sido recientemente caracterizada como señal encargada de activar la transición floral (Jaeger y Wigge, 2007; Lin *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2007; Corbesier *et al.*, 2007).

Del resultado del análisis transcriptómico comparado de plantas deficientes en SA (con fenotipo de floración tardía) *versus* plantas silvestres realizado durante la ventana temporal antes descrita, se identificaron 15 genes diferencialmente expresados. De todos ellos, escogimos *Pathogen and Circadian Controlled 1 (PCCI)* por ser el único que se induce en respuesta a luz UV-C en plantas silvestres pero no en plantas nahG. Además, *PCCI* está descrito que responde al ataque por patógenos, evento caracterizado por la

síntesis de SA, y muestra una expresión basal regulada por el reloj circadiano (Sauerbrunn y Schlaich, 2004), lo que lo convierte en un potencial candidato para mediar entre SA y su función como regulador del tiempo de floración. Así mismo, la expresión de *PCCI* en plantas no sometidas a estrés y cultivadas en condiciones de días largos, depende del estado de desarrollo de la planta, lo que le confiere potencialidad como regulador de otras transiciones de fase durante el desarrollo.

Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran que la expresión de *PCCI* está regulada por el reloj circadiano y es estrictamente dependiente de la síntesis, acumulación y señalización de SA. Además, su activación requiere la función del gen de tiempo de floración *CO* de la vía dependiente de fotoperiodo. En este trabajo, se pone de manifiesto que plantas deficientes en SA además de no mostrar expresión de *PCCI* muestran sobreexpresión constitutiva del componente del reloj *CCA1* y la pérdida de regulación circadiana de *CO*, lo que sugiere que el SA podría tener un papel como regulador del reloj circadiano, de las rutas de salida del reloj o de ambas.

Mediante la generación de plantas transgénicas de pérdida y ganancia de función de *PCCI* en distintos fondos genéticos de *Arabidopsis*, se ha demostrado que el gen *PCCI* regula el tiempo de floración. La expresión reducida o aumentada de *PCCI* en fondo genético silvestre y en fondo mutante *fve-3*, conlleva un retraso o adelanto, respectivamente, del tiempo de floración. En cambio, en el fondo mutante *co-1* el tiempo de floración es independiente del nivel de transcrito de *PCCI*, indicando que la regulación del tiempo de floración por la vía activada por estrés requiere no sólo de la función de *PCCI*, sino también de la funcionalidad dependiente de fotoperiodo de *CO*. El retraso en la floración de las líneas con expresión reducida de *PCCI* en fondo silvestre, conlleva niveles de expresión más bajos del gen integrador *FT*, mientras que los niveles de *SOC1* permanecen constantes. Estos datos sugieren que *PCCI* interaccionaría con la vía de fotoperiodo en algún punto entre *CO* y *FT*. Además, fenotípicamente las líneas de sobreexpresión en fondo Col-0 cultivadas en condiciones de día largo son parecidas al silvestre, mientras que las líneas de RNAi, poseen un fenotipo parecido al del mutante *ft-4*. Son claramente más tardías y presentan una roseta más compacta y con hojas y flores más grandes y tallos más gruesos.

Al estudiar el comportamiento de las líneas transgénicas de sobreexpresión y de RNAi, en los diferentes fondos genéticos Col-0, *co-1* y *fve-3*, en otros procesos que requieren de la síntesis de SA, como son la defensa frente a patógenos biotrofos (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990; Reymond y Farmer, 1998) y la senescencia (Morris *et al.*,

2000), nuestros datos apuntan que *PCCI* podría tener una función antisenescente ya que las líneas de RNAi en fondo silvestre presentan signos de senescencia anteriores a los observados en el control silvestre Col-0 en condiciones de senescencia forzada por oscuridad, mientras que no se aprecian cambios entre Col-0 y las líneas generadas en cuanto a resistencia frente a *Pseudomonas syringae*.

RESUM

En *Arabidopsis*, el moment en que es produeix la transició a la floració ve determinat per l'interacció entre la competència de la planta per al seu desenvolupament intern i els senyals mediambientals que determinen les condicions favorables per al succés reproductiu. No obstant això, plantes exposades a condicions d'estrès mediambiental poden activar el programa de floració prematurament. Alguns factors d'estrès capaços d'alterar el temps de floració, com l'infecció per patògens, temperatures extremes o altes irradiacions, comporten un increment en els nivells d'alguns metabolits com l'etilè, l'àcid abscísic i l'àcid salicílic (SA) (Blee, 2002; Dempsey *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 1996; Pastori i Foyer, 2002; Raskin, 1992).

Estudis recents suggereixen que SA pugui ser un regulador de la transició a la floració en plantes d'*Arabidopsis thaliana* sotmeses a estrès (Martínez *et al.*, 2004). Perquè es produïska un avanç en el temps de floració en plantes sotmeses a irradiació amb llum UV-C és necessària tant la síntesi com l'acumulació de SA, ja que no es produeix en plantes transgèniques nahG, que no acumulen SA ja que ho degraden ràpidament a catecol. No obstant això, es desconeix en gran mida el mecanisme mitjançant el qual el SA regula el temps de floració.

Mitjançant l'ús de plantes transgèniques en les quals el promotor de *BGL2*, gen PR inducible per SA, està fusionat al gen reportador GUS, es va determinar l'espai temporal en el qual es correlacionen canvis en els nivells endògens de SA amb l'activació de l'expressió de gens que indueixen la transició floral. Sota les nostres condicions de cultiu, el desè dia després de la sembra es dona un augment tant dels nivells de tinció GUS, associats al teixit vascular, com de l'expressió del gen *ICS1/SID2* que codifica l'*isocorismato sintasa 1* encarregada de sintetitzar SA en *Arabidopsis* (Wildermuth *et al.*, 2001) i del gen activador de la floració *FT*, la proteïna de la qual ha estat recentment caracteritzada com senyal encarregat d'activar la transició floral (Jaeger i Wigge, 2007; Lin *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2007; Corbesier *et al.*, 2007).

Del resultat de l'anàlisi transcriptòmic comparat de plantes deficientes en SA (amb fenotip de floració tardana) versus plantes silvestres realitzat durant la finestra temporal abans descrita, es van identificar 15 gens diferencialment expressats. De tots ells, vam escollir *Pathogen and Circadian Controlled 1 (PCCI)* per ser l'únic que s'indueix en resposta a llum UV-C en plantes silvestres però no en plantes nahG. A més, *PCCI* està descrit que respon a l'atac per patògens, esdeveniment caracteritzat per la síntesi de SA, i

mostra una expressió basal regulada pel rellotge circadià (Sauerbrunn i Schlaich, 2004), el que ho converteix en un potencial candidat per a intervir entre SA i la seua funció com regulador del temps de floració. Així mateix, l'expressió de *PCCI* en plantes no sotmeses a estrès i cultivades en condicions de dies llargs, depèn de l'estat de desenvolupament de la planta, el que li confereix potencialitat com regulador d'altres transicions de fase durant el desenvolupament.

Les dades obtingudes en el present treball mostren que l'expressió de *PCCI* està regulada pel rellotge circadià i és estrictament dependent de la síntesi, acumulació i senyalització de SA. A més, la seua activació requereix de la funció del gen de temps de floració *CO* de la via dependent de fotoperíode. En aquest treball, es posa de manifest que plantes deficientes en SA a més de no mostrar expressió de *PCCI* mostren sobreexpressió constitutiva del component del rellotge *CCA1* i la pèrdua de regulació circadiana de *CO*, el que suggereix que el SA podria tenir un paper com regulador del rellotge circadià, de les rutes d'eixida del rellotge o d'ambdues.

Mitjançant la generació de plantes transgèniques de pèrdua i guany de funció de *PCCI* en diferents fons genètics de *Arabidopsis*, s'ha demostrat que el gen *PCCI* regula el temps de floració. L'expressió reduïda o augmentada de *PCCI* en fons genètic silvestre i en fons mutant *fve-3*, comporta un retard o avanç, respectivament, del temps de floració. En canvi, en el fons mutant *co-1* el temps de floració és independent del nivell de transcrit de *PCCI*, indicant que la regulació del temps de floració per la via activada per estrès requereix no només de la funció de *PCCI*, sinó també de la funcionalitat dependent de fotoperíode de *CO*. El retard en la floració de les línies amb expressió reduïda de *PCCI* en fons silvestre, comporta nivells d'expressió més baixos del gen integrador *FT*, mentre que els nivells de *SOC1* romanen constants. Aquestes dades suggereixen que *PCCI* interaccionaria amb la via de fotoperíode en algun punt entre *CO* i *FT*. A més fenotípicament les línies de sobreexpressió en fons Col-0 conreades en condicions de dia llarg són semblants al silvestre, mentre que les línies de RNAi, posseeixen un fenotip semblant al del mutant *ft-4*. Són clarament més tardanes i presenten una roseta més compacta i amb fulles i flors més grans i tiges més gruixudes.

Estudiant el comportament de les línies transgèniques de sobreexpressió i de RNAi, en els diferents fons genètics Col-0, *co-1* i *fve-3*, en altres processos que requereixen de la síntesi de SA, com són la defensa enfront de patògens biotrofos (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990; Reymond i Farmer, 1998) i la senescència (Morris *et al.*, 2000), les

nostres dades apunten que *PCCI* podria tindre una funció antisenescent ja que les línies de RNAi en fons silvestre presenten signes de senescencia anteriors als observats en el control silvestre Col-0 en condicions de senescencia forçada per foscor, mentre que no s'aprecien canvis entre Col-0 i les línies generades en quant a resistència enfront de *Pseudomonas syringae*.

ABSTRACT

In *Arabidopsis*, the transition to flowering is determined by the interaction between the plant competence for internal development and the environmental signs which favour the reproduction success. Nevertheless, plants exposed to environmental stress could accelerate their flowering. Some stress factors able to alter the flowering time, such as pathogen infection, extreme temperatures or high radiations, drive in an increase of some metabolites like ethylene, abscisic acid and salicylic acid (SA) (Blee, 2002; Dempsey *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 1996; Pastori y Foyer, 2002; Raskin, 1992).

Recent studies suggest that SA could be a regulator of the transition to flowering in *Arabidopsis thaliana* plants under stress conditions (Martínez *et al.*, 2004). The accelerated flowering upon UV-C radiation required the synthesis as well as the accumulation of SA, since it will not occur in transgenic *nahG* plants that do not accumulate SA due to its rapid degradation to catechol. The way SA regulates the flowering time is up to date almost unknown.

By using transgenic plants with the promoter of *BGL2* gene (PR gene induced by SA) is fused to the reporter *GUS* gene, it was determined the time and space that correlate changes in internal levels of SA with the activation of gene expression leading to the transition to flowering. An increase in the *GUS* expression levels associated to the vascular tissue takes place the tenth day after sowing. Concomitantly, the expression of *ICS1/SID2* gene, which codes for the *isochorismate synthase 1* that synthesizes SA in *Arabidopsis* (Wildermuth *et al.*, 2001), and the *FT* gene, whose protein has been recently characterized as a signal activating the flowering transition (Jaeger y Wigge, 2007; Lin *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2007; Corbesier *et al.*, 2007) was up-regulated.

The comparative analysis of the transcriptomes of SA-deficient plants (with late flowering phenotype) *versus* wild plants performed during the temporal frame previously described yielded 15 differentially expressed genes. We chose *Pathogen and Circadian Controlled 1 (PCC1)* since it was the only one responsive to UV-C light up-regulating its expression in wild plants but not in *nahG* plants. Besides, *PCC1* was previously described as responsive to pathogen attacks, event characterized by the synthesis of SA, and also showing basal expression regulated by circadian clock (Sauerbrunn y Schlaich, 2004). *PCC1* is thus a potential candidate to mediate between SA and its function as flowering time regulator. Moreover, the expression of *PCC1* in long-day grown plants under no stress

depends on the development stage of the plant, which gives support to a function as a regulator of other transitions of developmental phases.

The data obtained in the present work show that the expression of *PCCI* is regulated by the circadian clock and is strictly dependent on the synthesis, accumulation and signalling of SA. Its activation requires the function of the photoperiod-dependent flowering time gene *CO*. SA-deficient plants showed constitutive overexpression of the clock component *CCA1* and the loss of circadian regulation of *CO* thus explaining the inability to activate *PCCI* gene expression. These data suggest that SA could have a role as a regulator of the circadian clock, output pathways or both of them.

Transgenic plant with loss or gain of *PCCI* function in different Arabidopsis genetic background allowed to demonstrate that *PCCI* regulates the timing of flowering. The reduced or increased expression of *PCCI* in wild type and *fve-3* mutant genetic background caused delayed or early flowering phenotype, respectively. However, in the mutant *co-1* background the flowering timing is independent on the *PCCI* transcript level, suggesting that stress-activated transition to flowering required not only *PCCI* but also *CO*. The delay in flowering time observed in lines with reduced *PCCI* expression in wild-type background correlated with lower expression of the *FT* integrator gene. By contrast, levels of *SOCI* remained constant. These data suggest that *PCCI* will interact with the photoperiod way in a point between *CO* and *FT*. Furthermore, the long day-grown *PCCI* overexpression plants in Col-0 background looks like the wild type plants but the RNAi lines has a phenotype similar to the *ft-4* mutant. They showed a more compact rosette with larger leaves and flowers and thicker stalks.

The overexpression and RNAi transgenic lines in the Col-0, *co-1* and *fve-3* genetic backgrounds were tested for other process requiring SA synthesis such as defense against biotrophic pathogens (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990; Reymond y Farmer, 1998) or senescence (Morris *et al.*, 2000). Our data point out that *PCCI* could have an antisenescent function, since the RNAi lines in wild-type background showed symptoms of darkness-induced senescence earlier to that observed in non-transformed wild-type Col-0 control plants. However, no changes were observed between Col-0 and transgenic lines regarding resistance against *Pseudomonas syringae*.

Listado de genes mencionados en la tesis.

<u>Gen</u>	<u>Breve descripción</u>
<i>FLC</i> , <i>FLOWERING LOCUS C</i> .	Represor universal de floración.
<i>PHYA</i> al <i>E</i> , <i>PHYTOCHROME A</i> al <i>E</i> .	Fitocromos. Fotorreceptores, perciben la cantidad y calidad de la luz roja y roja lejana.
<i>CRY1</i> y <i>2/FHA</i> , <i>CRYPTOCHROME 1</i> y <i>2</i> .	Criptocromos. Fotorreceptores, perciben la cantidad y calidad de la luz azul y ultravioleta A.
<i>PHOT1</i> y <i>2</i> , <i>PHOTOTROPIN 1</i> y <i>2</i> .	Fototropinas. Fotorreceptores, perciben la cantidad y calidad de la luz azul y ultravioleta A.
<i>ELF3</i> y <i>4</i> , <i>EARLY FLOWERING 3</i> y <i>4</i> .	Elementos de señalización de luz, median entre los fotorreceptores y el reloj circadiano.
<i>PIF3</i> , <i>PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3</i> .	Media en la activación por luz de <i>CCA1</i> .
<i>CCA1</i> , <i>CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1</i> .	Componente del oscilador central del reloj circadiano.
<i>LHY</i> , <i>LATE ELONGATED HYPOCOTYL</i> .	Componente del oscilador central del reloj circadiano.
<i>TOC1</i> , <i>TIMING OF CAB EXPRESSION 1</i> .	Componente del oscilador central del reloj circadiano.
<i>CO</i> , <i>CONSTANS</i> .	Regula el tiempo de floración, interviene en la ruta de fotoperiodo. Gen de salida del reloj.
<i>GI</i> , <i>GIGANTEA</i> .	Regula el tiempo de floración, interviene en la ruta de fotoperiodo. Forma parte del reloj circadiano.
<i>ZTL</i> , <i>ZEITLUPE</i> .	Interacciona con <i>TOC1</i> para su degradación y regulación del reloj circadiano.
<i>EPRI</i> , <i>EARLY PHYTOCHROME RESPONSIVE 1</i> .	Forma parte del reloj circadiano, interviene en el ajuste fino del reloj.
<i>PRR7</i> y <i>9</i> , <i>PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7</i> y <i>9</i> .	Forman parte del oscilador central del reloj circadiano.
<i>SOCI/AGL20</i> , <i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1</i> .	Regula el tiempo de floración, interviene en la ruta de fotoperiodo.

<i>FT</i> , <i>FLOWERING LOCUS T</i> .	Regula el tiempo de floración, interviene en la ruta de fotoperiodo. Su proteína actúa como florígeno.
<i>FWA</i>	Regula el tiempo de floración, interviene en la ruta de fotoperiodo.
<i>SPA</i> , <i>SUPPRESSOR OF PHYA-105</i> .	Interviene en la estabilización de CO.
<i>FCA</i> , <i>FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN FCA ALPHA, BETA, DELTA AND GAMMA</i> .	Regula el tiempo de floración, interviene en la vía autónoma reprimiendo <i>FLC</i> .
<i>FY</i>	Regula el tiempo de floración, interviene en la vía autónoma reprimiendo <i>FLC</i> .
<i>FVE</i>	Regula el tiempo de floración, interviene en la vía autónoma reprimiendo <i>FLC</i> .
<i>FPA</i>	Regula el tiempo de floración, interviene en la vía autónoma reprimiendo <i>FLC</i> .
<i>LD</i> , <i>LUMINIDEPENDENS</i> .	Regula el tiempo de floración, interviene en la vía autónoma reprimiendo <i>FLC</i> .
<i>LFY</i> , <i>LEAFY</i> .	Gen de identidad del meristemo. Promueve la transición a la floración.
<i>API y 2</i> , <i>APETALA 1 y 2</i> .	Gen de identidad del meristemo. Promueve la transición a la floración.
<i>CO-like</i> , <i>CONSTANS LIKE</i> .	Familia de genes similares a <i>CO</i> .
<i>CAL</i>	Regulador positivo del tiempo de floración. Homólogo a <i>API</i>
<i>VRN2</i> , <i>REDUCED VERNALIZATION RESPONSE 2</i> .	Regula el tiempo de floración en respuesta a vernalización reprimiendo <i>FLC</i> .
<i>SPY</i> , <i>SPINDLY</i> .	Regula el tiempo de floración como represor de la respuesta a GA, es un regulador positivo de la señalización por citokininas.
<i>GAI</i> , <i>GA INSENSITIVE</i> .	Regula el tiempo de floración como represor de LFY, es un represor de la señalización mediada por GA.

<i>RG1</i> , <i>REPRESSOR OF GAI-3</i> .	Regula el tiempo de floración como represor de LFY. Regulador negativo de la respuesta a giberelinas.
<i>ICS1/SID2</i> , <i>SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2</i> .	Codifica la isocorismato sintasa 1 que interviene en la biosíntesis de SA.
<i>EDS1 Y 5</i> , <i>ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5</i> .	Participan en la biosíntesis de SA.
<i>PAD4</i> , <i>PHYTOALEXIN DEFICIENT 4</i> .	Participa en la señalización por defensa en SA.
<i>PRI, 2 Y 5</i> , <i>PATHOGENESIS-RELATED GENE 1, 2 y 5</i>	Participan en la señalización por defensa en SA.
<i>JR2</i> , <i>JASMONIC ACID RESPONSIVE 2</i> .	Participa en la ruta de señalización de JA.
<i>BGL2</i> , <i>BETA-1,3-GLUCANASE 2</i> .	Participa en la señalización por defensa en SA.
<i>NPRI</i> , <i>NONEXPRESSER OF PR GENES 1</i> .	Participa en la ruta de señalización de SA.
<i>PLT2</i> , <i>PLETHORA 2</i>	Participa en diferenciación celular y en desarrollo de la raíz.
<i>PCC1</i> , <i>PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1</i> .	La expresión de PCC1 está regulada por el reloj circadiano y responde a patógenos.
<i>RPW8</i> , <i>RESISTANCE TO POWDERY MILDEW 8</i> .	Respuesta en defensa frente a hongos.
<i>NOLI/NOP2</i>	Función desconocida.
<i>RAV2</i> , <i>REGULATOR OF THE ATPASE OF THE VACUOLAR MEMBRANE</i> .	Forma parte del complejo RAVE, regulador de la ATPasa de las membranas vacuolar y endosomal.
<i>UBQ10</i> , <i>POLYUBIQUITIN 10</i> .	Gen constitutivo de Arabidopsis.
<i>ACT2/8</i> , <i>ACTIN 2</i> .	Gen constitutivo de Arabidopsis.

Índice

Introducción

1) <i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo para el estudio del desarrollo vegetal.	
1.1.- Aspectos generales.	2
1.2.- Ciclo vital.	3
2) La transición a la floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>.	5
3) Control del tiempo de floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>.	6
3.1.- Vía de fotoperiodo.	8
Fotorreceptores.	8
El reloj circadiano.	9
Transducción de la señal luminosa. ELF3, ELF4 y PIF3.	10
El oscilador central. TOC1, CCA1 y LHY.	11
Genes de salida del reloj. GI, CO y FT.	14
3.2.- Vía autónoma.	17
3.3.- Integración de las rutas.	18
4) Respuestas a estrés en <i>Arabidopsis thaliana</i>.	19
5) Ácido salicílico. Generalidades y biosíntesis.	21
6) Funciones del ácido salicílico.	23
6.1.- Respuesta de la planta al ataque de patógenos. Ácido salicílico y defensa.	24

Índice

6.2.- <i>Ácido salicílico y desarrollo. Termogénesis, senescencia y floración.</i>	25
<i>Termogénesis.</i>	26
<i>Senescencia.</i>	26
<i>Floración.</i>	27
<u>Objetivos</u>	31
<u>Materiales y Métodos</u>	
1) <i>Material vegetal y condiciones de cultivo.</i>	33
2) <i>Tratamientos realizados.</i>	
<i>Aplicación de compuestos.</i>	34
<i>Irradiación con luz UV-C.</i>	34
<i>Inoculación con patógenos.</i>	35
3) <i>Aislamiento y manipulación del DNA de plantas.</i>	
<i>Extracción de DNA.</i>	35
<i>Reacciones de amplificación mediante PCR.</i>	36
<i>Purificación de DNA.</i>	36
<i>Reacciones de ligación.</i>	37

4) Aislamiento y manipulación de RNA.	
<i>Extracción de RNA.</i>	37
<i>Retrotranscripción del RNA.</i>	38
<i>PCR cuantitativa.</i>	38
<i>Análisis Southern. PCR semicuantitativa.</i>	39
<i>Análisis Northern.</i>	40
<i>Transferencia de DNA y RNA a membrana.</i>	40
<i>Marcaje e hibridación de sondas radiactivas.</i>	40
5) Manipulación de microorganismos.	
<i>Obtención y transformación de células competentes de Escherichia coli.</i>	42
<i>Obtención y transformación de células competentes de Agrobacterium tumefaciens.</i>	43
<i>Aislamiento, purificación y digestión de plásmidos bacterianos.</i>	44
6) Generación de líneas transgénicas de Arabidopsis thaliana.	
<i>Generación de las construcciones.</i>	45
<i>Transformación de Arabidopsis thaliana.</i>	45
<i>Análisis genético para la identificación de plantas homocigotas.</i>	46
7) Análisis fenotípico de las líneas transgénicas generadas.	46
8) Cuantificación de los niveles de ácido salicílico.	47
9) Detección de la actividad β-glucuronidasa.	48

10) *Análisis transcriptómico mediante micromatrices de oligonucleótidos.* 48

11) *Aplicaciones bioinformáticas.* 49

Resultados

1) *Correlación entre niveles endógenos de ácido salicílico y transición floral.* 51

2) *Análisis transcriptómico comparado de plantas deficientes en ácido salicílico y plantas silvestres durante la transición floral.* 54

3) *Caracterización molecular de PCCI.* 58

4) *Conexión funcional entre PCCI y las diferentes vías de transición floral.* 60

5) *Patrón de expresión de PCCI a lo largo del desarrollo.* 64

6) *Conexión entre ácido salicílico y el reloj circadiano.* 66

7) *Caracterización funcional de PCCI.* 69

8) *Funciones de PCCI no relacionadas con la regulación de la transición floral.* 82

9) *Caracterización de los mutantes de la vía de fotoperiodo en eventos que requieren de la síntesis de ácido salicílico.* 87

10) *Variación genética natural en la transición floral activada por luz UV-C en Arabidopsis thaliana.* 90

Discusión

Cambios en los niveles endógenos de ácido salicílico correlacionan con el tiempo de floración. 97

<i>PCCI relaciona ácido salicílico con el reloj circadiano y la vía de fotoperiodo.</i>	98
<i>PCCI participa en la regulación del tiempo de floración.</i>	100
<i>Otras funciones para PCCI.</i>	101
<i>¿Qué confiere a PCCI su función reguladora?</i>	102
<i>Variación natural. Otra aproximación.</i>	103
<u>Conclusiones</u>	105
<u>Bibliografía</u>	107

Índice de figuras y tablas

Introducción

<i>Figura I. Ciclo vital de Arabidopsis.</i>	5
<i>Figura II. Modelos propuestos de regulación de la floración por el fotoperiodo.</i>	10
<i>Figura III. Modelo propuesto de oscilador central.</i>	14
<i>Figura IV. Diagrama de rutas de transición a la floración.</i>	19
<i>Figura V. Esquema de las rutas de biosíntesis de SA.</i>	23

Materiales y Métodos

<i>Tabla I. Oligonucleótidos empleados en qRT-PCR.</i>	39
<i>Tabla II. Oligonucleótidos empleados en RT-PCR semicuantitativa.</i>	40
<i>Tabla III. Fragmentos de cDNA empleados en marcaje de sondas.</i>	41

Resultados

<i>Figura 1. Cambios en el contenido basal de SA se correlacionan temporalmente con la transición del estado vegetativo a reproductivo.</i>	53
<i>Figura 2. Análisis de la expresión GUS en plantas cultivadas en días cortos.</i>	54
<i>Tabla 1. Genes diferencialmente expresados en el análisis transcriptómico de plantas deficientes en SA frente a plantas silvestres.</i>	56

Tabla 2. Análisis qRT-PCR de la expresión de genes en plantas Col-0 y nahG irradiadas con luz UV-C frente a plantas no irradiadas.	57
Figura 3. La expresión de PCC1 se activa por irradiación con luz UV-C o aplicación exógena de SA.	59
Figura 4. La activación de la expresión de PCC1 requiere la función de CO.	61
Figura 5. La activación de la expresión de PCC1 por aplicación exógena de SA requiere la función de CO y se modula negativamente por JA.	62
Figura 6. Niveles de transcrito de PCC1 en plantas tratadas con diferentes fitohormonas o especies reactivas donadoras de oxígeno y nitrógeno.	63
Figura 7. Patrón de expresión espacio- temporal de PCC1.	64
Figura 8. La expresión de PCC1 está regulada por el reloj circadiano.	66
Figura 9. Niveles de transcrito de CCA1 y CO a lo largo del fotoperiodo en D.L. en plantas silvestres Col-0 y deficientes en SA.	67
Figura 10. Expresión de PCC1 en respuesta a UV-C y tratamiento con SA en plantas mutantes sobreexpresoras de CCA1.	68
Figura 11. Tiempo de floración, respuesta a UV-C y expresión de FT y SOC1 en líneas transgénicas de PCC1 en fondo Col-0.	71
Figura 12. Homología de secuencia entre At3g22235, At3g22240 y PCC1. Niveles de transcrito relativo en las líneas de RNAi de PCC1 en fondo Col-0.	73
Figura 13. Niveles de SA en líneas transgénicas de PCC1 en fondo Col-0.	74
Figura 14. Análisis fenotípico en D.L. de las líneas transgénicas de PCC1 en fondo Col-0.	75
Figura 15. Análisis morfológico de los órganos reproductivos de las líneas RNAi PCC1 en fondo Col-0.	76

Figura 16. Análisis fenotípico en D.C. de las líneas transgénicas de PCC1 en fondo Col-0.	77
Figura 17. Tiempo de floración y respuesta a UV-C en líneas transgénicas de PCC1 en fondo co-1.	79
Figura 18. Tiempo de floración y respuesta a UV-C en líneas transgénicas de PCC1 en fondo fve-3.	81
Tabla 3. Resistencia frente a <i>Pseudomonas</i> de las líneas transgénicas de PCC1 en fondo Col-0, co-1 y fve-3.	83
Figura 19. Estudio de la senescencia natural y forzada en líneas transgénicas de PCC1 en fondo Col-0.	85
Figura 20. Estudio de la senescencia en líneas transgénicas de PCC1 en fondo co-1 y fve-3.	86
Figura 21. co-1 muestra diferencias con los mutantes de la vía de fotoperiodo en resistencia frente a <i>Pseudomonas</i> y en la activación de la síntesis de SA.	88
Figura 22. Respuesta al tratamiento con SA y JA en mutantes de la vía de fotoperiodo.	89
Figura 23. Estudio de la senescencia forzada en mutantes de la vía de fotoperiodo.	90
Tabla 4. Tiempo de floración de plantas irradiadas y control en ecotipos silvestres de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	92
Figura 24. Correlación entre la respuesta a estrés en tiempo de floración y distintas coordenadas geográficas en ecotipos silvestres de <i>Arabidopsis</i> .	93
Figura 25. Niveles basales de SA en ecotipos silvestres de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	94
Figura 26. Tiempo de floración en respuesta a estrés en ecotipos sensibles e insensibles a irradiación de <i>Arabidopsis</i> y en líneas híbridas recombinantes.	96

Introducción

Introducción

El reino vegetal comprende una enorme variedad de organismos, desde las algas unicelulares hasta las plantas terrestres, que se presentan en una gran diversidad de formas. Una característica fundamental que comparten las plantas y las diferencia de los animales es que son organismos incapaces de cambiar de lugar voluntariamente, están sujetas al suelo a través de las raíces. Esta característica condiciona en gran medida su modo de desarrollo ya que las hace dependientes del medio en el que viven por su incapacidad para trasladarse a entornos más favorables.

Para asegurar su adaptación al medio, las plantas poseen un desarrollo post-embriionario muy plástico. En el embrión se establece un esbozo básico de la futura arquitectura de la planta, pero los órganos que aparecen en el adulto se desarrollan a lo largo de su ciclo vital de forma continua e iterativa, adaptándose a las condiciones ambientales. Las células de la planta deben ser capaces de recibir información precisa acerca de su posición espacial y de las características de su entorno, por lo que requieren de una comunicación intracelular, intercelular y con el medioambiente a lo largo de todo el desarrollo.

El desarrollo implica procesos de diferenciación (generación de diversidad celular), morfogénesis (organización espacial de las células en tejidos y órganos), crecimiento (aumento de tamaño del organismo) y reproducción (producción de gametos). Las estructuras clave en el desarrollo de las plantas son los meristemos, que contienen células que se mantienen en estado indiferenciado (células madre) y se dividen durante toda la vida del individuo, produciendo nuevas células que pueden diferenciarse para dar lugar a las distintas estructuras de la planta en las posiciones adecuadas. Así pues, es en los meristemos donde se generan todos los órganos, determinando la morfología final de éstos y la arquitectura general de la planta (Bowman, 1994).

1) *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo para el estudio del desarrollo vegetal.

1.1.- Aspectos generales.

Hasta bien entrado el siglo XX, la mayoría de los estudios en plantas se realizaron con especies de interés económico con el fin de mejorar sus cultivos. Entre estas especies se encuentran el maíz (*Zea mays*), el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el guisante (*Pisum sativum*) o el tabaco (*Nicotiana tabacum*). Sin embargo, estas plantas presentan muchos inconvenientes que dificultan el análisis y la manipulación en el laboratorio, como es su tamaño relativamente grande, su largo tiempo de generación o, en lo referente al material genético, sus grandes genomas con elevados niveles de ploidía. Por este motivo, desde mediados de los años 80 se ha generalizado la utilización de *Arabidopsis thaliana* para la investigación del desarrollo vegetal (Somerville y Koornneef, 2002). *Arabidopsis* es una angiosperma dicotiledónea perteneciente a la familia de las crucíferas o brassicáceas, a la que también pertenecen especies como la col (*Brassica oleracea*), el rábano (*Raphanus sativus*) y las mostazas (Strasburger *et al.*, 1994).

Aunque no tiene valor económico, sus características la convierten en un organismo modelo muy apropiado para su estudio en el laboratorio. Presenta un tamaño pequeño, con alrededor de treinta centímetros de altura máxima, lo que permite siembras de alta densidad; su arquitectura es relativamente simple, y su ciclo vital, de unos dos meses, resulta corto para una planta con flores. Además es autógena, es decir, se autopoliniza sin intervención externa, y produce un gran número de semillas, lo que facilita la propagación de las diversas líneas. También resulta relativamente fácil realizar cruzamientos entre distintas plantas y las semillas pueden almacenarse durante varios años a temperatura ambiente sin perder viabilidad (Somerville y Koornneef, 2002).

Arabidopsis es una planta diploide, cuyo genoma, que ha sido totalmente secuenciado (TAGI, 2000), está organizado en cinco cromosomas y es muy apropiado para los estudios moleculares por su pequeño tamaño (125 Mb) y su escaso contenido en DNA repetitivo. Su uso intensivo en investigación ha propiciado la creación de bases de datos de dominio público en las que se ofrecen gran cantidad de herramientas informáticas, así como información acerca de mutantes, polimorfismos de DNA, protocolos de laboratorio, etc. La mayoría de la información relativa a aspectos moleculares de *Arabidopsis* está centralizada en TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.Arabidopsis.org>). Mediante técnicas de mutagénesis basadas en la inserción de transposones o T-DNAs se ha generado

una amplísima colección de alelos mutantes de prácticamente todos los genes de *Arabidopsis* y se han depositado en bancos de semillas públicos y altamente organizados (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

Además de los recursos genético-moleculares, *Arabidopsis* presenta una amplia variación genética natural susceptible de ser explotada. En este sentido, existen numerosos ecotipos de *Arabidopsis*, mantenidos en bancos de semillas de acceso público y de los que se dispone de precisos datos de localización geográfica y caracterización fenotípica:

<http://www.mpizkoeln.mpg.de/english/research/koornneefGroup/koornneef/index.html>

<http://www.weigelworld.org/research/projects/naturalvariation>

<http://www.dpw.wau.nl/natural>

<http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat>

<http://www.inra.fr/internet/Produits/vast>

Mediante cruzamiento de diferentes ecotipos se han generado numerosas colecciones de líneas híbridas recombinantes (RILs):

<http://www.inra.fr/internet/Produits/vast/RILs.htm>

<http://www.dpw.wau.nl/natural/resources/populations.htm>

que representan herramientas muy útiles para el análisis de caracteres cuantitativos (QTLs).

1.2.- Ciclo vital.

El ciclo vital de *Arabidopsis* consta de cinco fases: embriogénesis, germinación, desarrollo vegetativo, desarrollo reproductivo y fertilización. Durante la embriogénesis se establecen los dos meristemos principales que van a generar el eje apical-basal de la planta: el meristemo apical del tallo, que dará lugar a las partes aéreas de la planta, y el meristemo apical de la raíz, que originará las raíces (Lyndon, 1990). Al final de la embriogénesis, la germinación conduce al establecimiento de una plántula donde queda definido un esbozo de la estructura final de la planta, con los dos meristemos principales establecidos, una radícula y dos cotiledones u hojas embrionarias cuya función principal es la de servir de órganos de reserva durante las primeras etapas tras la germinación (Bowman, 1994; Wolpert *et al.*, 2002).

A lo largo de toda la fase vegetativa, el meristemo apical del tallo produce únicamente hojas dejando una escasa distancia entre ellas denominada entrenudo, lo que da como resultado una roseta compacta. La duración de esta etapa, y por tanto el número final de hojas de la roseta, depende de las condiciones de cultivo y de la planta (Bowman, 1994).

Durante la fase reproductiva, a partir del meristemo de inflorescencia se forma el tallo principal debido a un incremento de la longitud de los entrenudos. La aparición de meristemos laterales asociados a las axilas de las hojas caulinares genera ramificaciones del tallo. En los extremos del tallo principal y sus ramificaciones se forman las inflorescencias, con las flores dispuestas en racimo.

En la antesis, la flor alcanza la madurez y tiene lugar la autopolinización y la fertilización de los óvulos, que desencadenan la fructificación y el desarrollo de las semillas. Al final de la fase reproductiva, la planta inicia los programas de senescencia que conducen a la dehiscencia y escisión de órganos como las silicuas, lo que permite la liberación de las semillas contenidas en sus frutos (Bowman, 1994; Wolpert *et al.*, 2002).

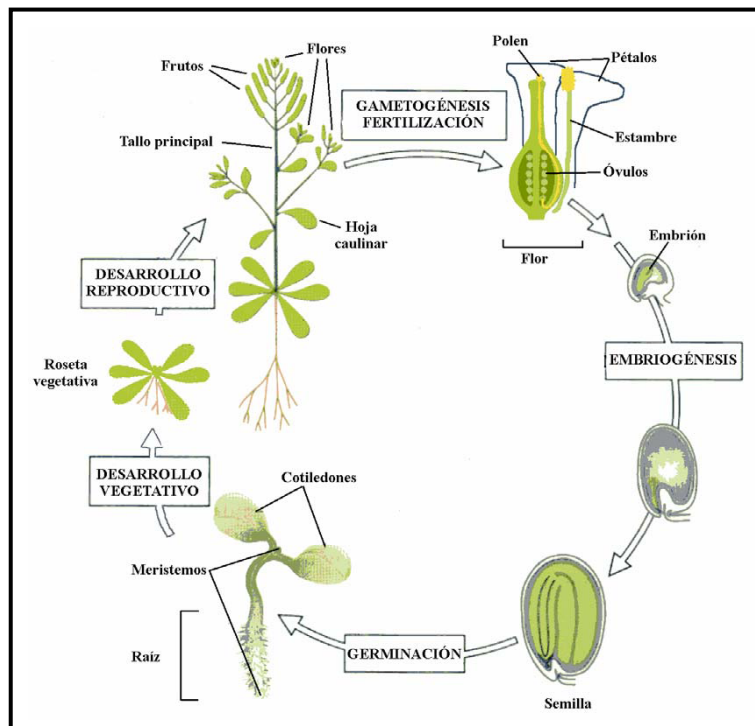


Figura I. Ciclo vital de *Arabidopsis*. Se indican los principales eventos y las estructuras más relevantes de cada estadio. Modificado a partir de Wolpert *et al.* (2002).

2) La transición a la floración en *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis es una especie anual en la que las fases de desarrollo vegetativo y reproductivo están temporalmente separadas. Una de las fases clave del desarrollo vegetal para asegurar la descendencia de la especie es la transición a la floración, o cambio de fase del desarrollo vegetativo a reproductivo. *Arabidopsis* es una especie facultativa y generalmente no muestra un requerimiento obligado para ninguna condición medioambiental específica. Sin embargo, algunos factores adelantan o retrasan la transición a la floración en esta especie. Determinadas condiciones fotoperiódicas y las bajas temperaturas activan la transición a la floración, y la calidad de la luz (longitud de onda) y la cantidad de luz (densidad de flujo de fotones) son también factores importantes en el control del proceso. Otras condiciones medioambientales como son la disponibilidad de nutrientes y la temperatura de crecimiento también parecen tener algún efecto sobre la transición floral pero no han sido suficientemente analizados. Finalmente, la aplicación exógena de fitohormonas y otros compuestos puede imitar el efecto de algunas condiciones medioambientales. *Arabidopsis* responde al estrés producido por condiciones desfavorables para la supervivencia de la especie adelantando la floración. Cambios en la calidad de la luz o la sombra por cercanía a otras plantas vecinas (lo que provoca un enriquecimiento en radiaciones con longitud de onda rojo-lejano) promueven la floración. Así pues, el momento en que se da la transición a la floración está determinado por la interacción entre la competencia de la planta, controlada por su programa de desarrollo interno, y las señales medioambientales que marcan las condiciones más favorables para su eficiencia reproductiva.

La transición floral comprende varios pasos desde la percepción de las condiciones medioambientales hasta la diferenciación de estructuras tridimensionales, el primordio floral y el meristemo (Zeevaart 1976). *Arabidopsis* pertenece a un grupo característico de plantas que crecen como roseta durante la fase de crecimiento vegetativo debido a la reiterativa producción de hojas sin elongación de los entrenudos. La transición a la fase reproductiva, en el meristemo apical, es el resultado de dos fenómenos básicos: la adquisición por el meristemo apical de competencias reproductivas y la producción de un estímulo floral en las hojas que pueda translocarse hasta el meristemo apical. Cuando

ambos procesos coinciden espacio-temporalmente, el meristemo vegetativo pasa a ser reproductivo. De principal importancia en la transición floral es un grupo de células del tallo llamadas el meristemo apical del tallo (MAT), que consiste en un pequeño número de células morfológicamente indiferenciadas en división alrededor de un organizador principal. La división celular en la zona central es lenta y sirve para mantener el meristemo, mientras en la zona periférica la división es rápida. El MAT actúa como una población de células progenitoras para la parte aérea de la planta: las hojas, el tallo y las flores. La organogénesis es el resultado de sucesivos cambios en la identidad del meristemo a través de diferentes transiciones de fase en el meristemo. El desarrollo vegetativo comprende una fase juvenil y luego una fase adulta competente para iniciar la transición floral. En *Arabidopsis* se han descrito marcas visuales de esa transición: las hojas juveniles producen tricomas sólo en la cara de arriba, mientras las hojas adultas producen tricomas tanto en el haz como en el envés. Una vez ocurre la transición floral, el primordio floral se inicia desde los bordes del MAT y comienza el desarrollo de los órganos florales. El cambio de meristemo vegetativo a floral es controlado por la función de los productos de expresión de los denominados genes de identidad del meristemo. Finalmente, la organogénesis floral es ejecutada por la función solapante de los denominados genes homeóticos florales.

Tras la transición del meristemo vegetativo a reproductivo y la formación de la primera flor se produce la elongación de los entrenudos del tallo. Como resultado de este proceso, la inflorescencia de *Arabidopsis* está compuesta de dos tipos de nudos. El primer nudo basal da lugar a meristemos laterales indeterminados los cuales se desarrollan como coflorescencias en las axilas de las hojas caulinares, mientras los nudos más tardíos dan lugar a flores que no están asociadas con hojas (Schultz y Haughn, 1991).

3) Control del tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*.

La floración está controlada por condiciones medioambientales y por factores endógenos del desarrollo. La regulación de la transición floral viene determinada por las múltiples interacciones entre una compleja red de vías de señalización. Diferentes aproximaciones experimentales, fundamentalmente genéticas, en *Arabidopsis* permitieron la identificación de múltiples componentes que participan en diferentes vías de señalización que controlan la floración, y su posición y jerarquía dentro de cada ruta de señalización

molecular. Además, se ha comprobado que las distintas vías de floración convergen en la activación de los denominados genes integradores de floración. Esta convergencia permite la integración de la función de diferentes factores activadores o represores, que son en su mayoría el resultado de la señalización activada por diferentes tipos de señales tanto endógenas como ambientales. Mediante el estudio del tiempo de floración de diferentes mutantes en respuesta a la vernalización y el fotoperiodo, combinado con los análisis genéticos de epistasia (Alonso-Blanco *et al.*, 1998; Koornneef *et al.* 1998 a, b), en *Arabidopsis* se han descrito múltiples vías que regulan la transición floral. Dos de esas vías median señales del medioambiente. La vía de fotoperiodo integra el efecto de la longitud del día a través de una serie de genes que perciben y responden a la transición regular entre el día y la noche (Corbesier *et al.*, 1996). La vía de floración dependiente de la vernalización promueve la floración en algunos ecotipos de floración tardía en respuesta a un largo periodo de temperaturas frías (Michaels y Amasino, 2000). Esto no es simplemente una respuesta a estrés, es una adaptación a las condiciones invernales de climas más fríos donde la floración ocurre después del invierno, asegurando así la formación de flores y semillas durante la primavera.

En contraste con estas vías de respuestas al medioambiente, existe una vía que integra el efecto de factores endógenos independientes del ambiente y que se conoce como la vía autónoma (Martínez-Zapater y Somerville, 1990; Koornneef *et al.*, 1991). En esta vía son esenciales las funciones de genes que promueven la floración mediante la represión de un represor universal de la floración conocido como *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Plantas mutantes en los genes de la vía autónoma, florecen más tarde tanto en días largos como en días cortos. Además de las tres rutas ya descritas, existe una cuarta vía de transición a la floración que se activa por la fitohormona ácido giberélico (GA) y que, por tanto, integra también factores activadores endógenos (Wilson *et al.* 1992; Blázquez *et al.*, 1998). En *Arabidopsis*, mutantes defectivos en la biosíntesis y en la vía de señalización de GA o florecen muy tarde o incluso no florecen (Wilson *et al.*, 1992). El análisis de las relaciones epistáticas entre mutantes de GA y otros mutantes de tiempo de floración sugieren que la vía de promoción de la floración activada por giberelinas funciona de manera independiente de las otras (Blázquez *et al.*, 2000).

3.1.- Vía de fotoperiodo.

Uno de los factores más importantes que controlan el tiempo de floración es la duración del día o fotoperiodo. Arabidopsis es una planta facultativa de día largo, que florece más temprano en condiciones de día largo pero también florece en condiciones de día corto. Esta vía requiere un mecanismo capaz de percibir la luz y de cuantificar su calidad y cantidad, además de un grupo de genes que transmitan la señal florigénica a los genes de identidad del meristemo para activar la transición de la fase vegetativa a reproductiva.

La luz es percibida por los fotorreceptores, las tres clases de fotorreceptores conocidos en plantas realizan funciones fotosensoras distintivas. Así, los criptocromos y fototropinas absorben luz en la región azul-ultravioleta del espectro, mientras que los fitocromos lo hacen principalmente a longitudes de onda del rojo e infrarrojo. Una vez se percibe la luz, la señal se traduce a un reloj interno capaz de medir el tiempo, este reloj se conoce como el reloj circadiano, en el momento en que el reloj circadiano identifica un fotoperiodo largo, activa la vía facultativa de día largo. Mediante un abordaje genético-molecular se han identificado genes necesarios para la respuesta a la luz del día, algunos de esos genes codifican proteínas reguladoras específicas involucradas en la regulación de la floración, mientras otras codifican componentes de rutas de transducción de señal de la luz o están involucradas en funciones del reloj circadiano.

Fotorreceptores

Los fotorreceptores perciben la calidad y cantidad de la luz. El espectro de luz blanca se puede dividir en tres longitudes de onda o calidades de luz: rojo lejano, rojo y azul. El rojo y rojo lejano es percibido por los fitocromos (Wang y Deng 2002) y la luz azul y ultravioleta-A se detectan por los criptocromos y fototropinas (Lin y Shalitin, 2003). Los criptocromos y fitocromos controlan las respuestas de crecimiento y de desarrollo a variaciones en la longitud de onda, intensidad y duración de la irradiación diurna (Cashmore *et al.*, 1999; Smith, 2000), mientras que la función principal de las fototropinas es la de controlar la dirección del crecimiento en respuesta a la dirección e intensidad de la luz (Sakai *et al.*, 2001). En Arabidopsis se han descrito cinco fitocromos (*PHYA* al *PHYE*) (Clack *et al.*, 1994), dos criptocromos (*CRY1* y *CRY2*) (Brudler *et al.*, 2003; Lin y Shalitin,

2003) y dos fototropinas (*PHOT1* y *PHOT2*) (Briggs y Christie, 2002; Takemiya *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2007).

El reloj circadiano.

Una característica común de múltiples organismos estudiados es disponer de un reloj interno con capacidad de medir el tiempo (Staiger, 2002). El sistema más extensamente estudiado es el reloj circadiano. Por definición, un ritmo circadiano es aquel que persiste con una periodicidad de aproximadamente 24 horas bajo condiciones constantes, es decir, en ausencia de la señal externa originaria (Barak *et al.*, 2000). El reloj se ajusta mediante señales ambientales tales como la variación de luz-oscuridad o temperatura que tienen lugar tanto al amanecer como al oscurecer y prepara a los organismos para cambios regulares en su ambiente, de manera que puedan anticipar su respuesta a unas condiciones que tendrán lugar en un momento concreto del día (Staiger, 2001).

La importancia del reloj circadiano en plantas se pone de manifiesto por el gran número de procesos biológicos que controla. En *Arabidopsis* se ha caracterizado que el reloj circadiano es vital para la sincronización de distintos procesos de desarrollo como la floración (Reeves y Coupland, 2000; Samach y Coupland, 2000; Hayama y Coupland, 2003) y procesos tales como el movimiento de los cloroplastos (Sweeney, 1987), movimiento de las hojas y cotiledones, apertura de los estomas (McClung, 2001) y la elongación del hipocotilo (Dowson-Day y Millar, 1999). La expresión de un gran número de genes también muestra ritmicidad circadiana.

Se han propuesto dos modelos de regulación de la floración por el fotoperiodo (Samach y Coupland, 2000):

Modelo de coincidencia externa.- Se propone que la luz actúa como señal externa que interactúa con un ritmo sensible a la luz a ciertos tiempos del día. En plantas de día largo, como *Arabidopsis*, si la planta se expone a la luz en una fase crucial del ritmo se promueve la floración.

Modelo de coincidencia interna.- Sugiere que en fotoperiodos inductivos, dos ritmos se encuentran en la misma fase e interaccionan promoviendo la floración mientras que en fotoperiodos no inductivos, esos ritmos están fuera de fase.

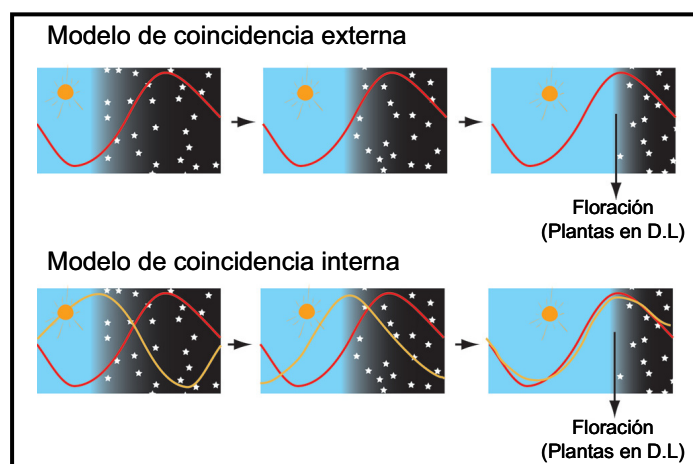


Figura II. Modelos propuestos de regulación de la floración por el fotoperiodo. Modificado a partir de Ausín *et al.* (2005).

El mecanismo que genera ese ritmo circadiano está descrito en tres secciones interrelacionadas. Hay rutas de entrada en la que intervienen los fotorreceptores, que sincronizan el mecanismo del reloj con los ciclos diarios de luz y oscuridad, un oscilador central que genera la ritmicidad circadiana en función de su sincronización y una ruta de salida de la respuesta circadiana, que se traduce en la regulación del movimiento de las hojas, expresión génica, etc. (Eriksson y Millar, 2003).

Transducción de la señal luminosa. *ELF3*, *ELF4* y *PIF3*.

En la ruta de señalización hacia el reloj, el estímulo luminoso captado por los distintos fotorreceptores, llega al oscilador central mediante una cascada de señalización formada por distintos componentes. *EARLY FLOWERING3 (ELF3)* y *EARLY FLOWERING4 (ELF4)* se encuentran entre los componentes con un papel demostrado en la transducción de la señal hacia el reloj. El tiempo de floración en el mutante *elf3* es independiente del fotoperiodo (Hicks *et al.*, 1996). El mutante *elf4* muestra floración temprana bajo fotoperiodo de días cortos, mientras que bajo fotoperiodo de días largos florece igual que el silvestre (Doyle *et al.*, 2002). El mutante *elf3* es arrítmico en luz continua pero retiene ritmicidad en oscuridad continua, sugiriendo que *ELF3* es un componente de la ruta de entrada de luz hacia el oscilador (Hicks *et al.*, 1996; Covington *et al.*, 2001). El mutante *elf4* afecta a la ritmicidad de genes regulados por el reloj, pudiendo *ELF4* estar asociado al oscilador circadiano (Eriksson y Millar, 2003). Los transcritos de

ELF3 y *ELF4* presentan expresión circadiana con expresión máxima al final del día (Hicks *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001).

PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) es un factor de transcripción que se une directamente a los fitocromos A y B (Ni *et al.*, 1999; Halliday *et al.*, 1999; Toledo-Ortíz *et al.*, 2003). Estudios realizados por Kim y colaboradores (2003) muestran que PIF3 es un componente tanto negativo como positivo de la señalización por fitocromo, dependiendo de la naturaleza de la luz aplicada. Así mismo, se ha postulado que PIF3 pudiera mediar la activación por luz de CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) desde los fotorreceptores (Shimizu-Sato *et al.*, 2002).

El oscilador central. TOC1, CCA1 y LHY.

La persistencia de los ritmos circadianos incluso en ausencia de la señal ambiental que los sincroniza, indica que están conducidos por un oscilador automantenido. El oscilador central del reloj circadiano incluye un circuito de retroalimentación negativa, que implica una ritmicidad de 24 horas en los niveles de los transcritos de los reguladores que actúan tanto negativa como positivamente (Harmer y Kay, 2005; Young y Kay, 2001). Adicionalmente, un sistema de regulación post-transcripcional de los transcritos del oscilador además de modificaciones post-transduccionales de las proteínas que codifican, contribuyen al mantenimiento de la periodicidad de 24 horas (Edery 1999; Allada *et al.*, 2001). La ritmicidad producida por las proteínas que conforman el oscilador, traduce la información temporal en la ritmicidad de los distintos procesos biológicos mediante las rutas de salida de la señal (Brown y Schibler, 1999).

El oscilador circadiano en *Arabidopsis* (Yanovsky y Kay, 2001) está compuesto por tres elementos principales, los factores de transcripción del tipo MYB, CCA1 y LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) y la proteína TOC1 (TIMING OF CAB EXPRESSION 1). La proteína TOC1 posee dos dominios característicos, el primero de ellos en el extremo N terminal es similar al dominio receptor regulador de respuesta de sistemas de transducción de señal de dos componentes. El segundo motivo, en el extremo C terminal, es el dominio CCT, que también posee la familia de reguladores transcripcionales CONSTANS (CO). Los niveles de transcrito *TOC1* en ciclos de luz /oscuridad dan un pico por la tarde y muestran un ritmo circadiano en luz continua. *toc1-1* se ha identificado como una mutación semidominante que acorta el periodo de varios ritmos bajo un amplio rango de condiciones de luz y temperatura, entre los que se encuentran el movimiento de las hojas

y de los estomas, floración y expresión génica (Somers *et al.*, 1998). Los mutantes *toc1-1* florecen más temprano en días cortos y este fenotipo puede ser rescatado cultivando las plantas en ciclos diarios de 21 horas en lugar de 24, lo que indica que la duración más corta del periodo circadiano es la causa del fenotipo temprano en los mutantes *toc1* (Blázquez *et al.*, 2002). En el mutante *toc1-1*, el periodo del ritmo circadiano de la expresión de *TOCI* en luz continua es más corto, indicando que *TOCI* controla su propio ritmo de expresión a través de un bucle de retroalimentación que lo convierte en candidato a componente del oscilador (Strayer *et al.*, 2000). *TOCI* tiene una función crucial en la integración de señalización por luz del control circadiano y respuestas morfogénicas, ya que mientras la sobreexpresión de *TOCI* elimina la ritmicidad en todas las condiciones, el silenciamiento del gen *TOCI* causa arritmia en oscuridad continua y muestra una reducción de la sensibilidad a la luz rojo lejano en el control de la elongación del hipocotilo (Más *et al.*, 2003a).

Los factores de transcripción *CCA1* y *LHY*, se considera que están implicados en la ritmicidad circadiana, ya que su sobreexpresión constitutiva altera distintos ritmos como el movimiento de la hoja y la expresión génica (Schaffer *et al.*, 1998; Wang y Tobin, 1998). Hay una relación estrecha entre el efecto de *LHY* y *CCA1* en la regulación del reloj y el tiempo de floración. La expresión del gen *CCA1* está transitoriamente inducida por fitocromos y oscila con un ritmo circadiano (Wang y Tobin, 1998). La sobreexpresión de *CCA1* y *LHY* da el mismo fenotipo circadiano, lo que sugiere que sus funciones están en gran parte solapadas. La sobreexpresión causa floración tardía en días largos y rompe todos los ritmos circadianos: movimiento de las hojas y expresión rítmica de genes en diferentes fases, incluyendo la expresión de *CCA1* y *LHY* (Mizoguchi *et al.*, 2002). Además de la interrupción del ritmo circadiano, la sobreexpresión de *CCA1* suprime su propia expresión, y produce hipocotilos más largos y retraso en la floración (Wang y Tobin, 1998). La pérdida de función de *LHY* o *CCA1* produce un acortamiento de la duración del periodo circadiano de 3 horas y adelanta el tiempo de floración en día corto. Mutantes *cca1* muestran un fenotipo de periodo más corto para la expresión de varios genes en ensayos de luz continua, lo que indica que la función de *LHY* está parcialmente compensada por la falta de *CCA1* (Green y Tobin, 1999). Además, *CCA1* y *LHY* presentan un ritmo circadiano de expresión, regulan sus propios transcritos a través de un bucle de retroalimentación y ambos suprimen todos los ritmos observados cuando se expresan constitutivamente, lo que sugiere que deben ser componentes del oscilador (Wang y Tobin, 1998; Fowler *et al.*, 1999).

La propuesta de que TOC1 y LHY/CCA1 deben formar parte de un oscilador central se ha reforzado con la demostración de que forman parte de un bucle autoregulatorio (Alabadí *et al.*, 2001). LHY y CCA1 unidos al promotor de *TOC1* in vitro, reducen la expresión de *TOC1*, mientras que en mutantes *toc1*, la duración del periodo de expresión de *CCA1* y *LHY* es más corto y sus niveles de expresión se reducen. Así pues, *TOC1*, *LHY* y *CCA1* deben activar un bucle regulador negativo, en el que la expresión de *LHY* y *CCA1* se eleva por la mañana y reprimen la expresión de *TOC1*. De acuerdo con este modelo, *LHY* y *CCA1* reprimen su propia expresión y cuando los niveles de sus proteínas caen, la expresión de *TOC1* se eleva. TOC1 promueve la expresión de *LHY* y *CCA1* iniciando otro ciclo (Alabadí *et al.*, 2001) y actúa como integrador de las señales luminosas que controlan las respuestas circadianas y morfogénicas de la planta (Más *et al.*, 2003a). Este bucle de retroalimentación debe regular el tiempo de floración por determinación del momento del día en el que se expresan los genes de tiempo de floración en la vía de fotoperiodo *CO* y *GIGANTEA (GI)*. Sin embargo, la regulación del funcionamiento del reloj no sólo ocurre a nivel transcripcional. Se ha descrito que la proteína TOC1 interacciona con ZEITLUPE (ZTL) y se degrada vía proteasoma, siendo esta interacción importante para la regulación de la estabilidad de TOC1 y por tanto para la modulación del periodo circadiano (Más *et al.*, 2003b)

Sin embargo, las actividades de CCA1 y LHY no son suficientes por sí solas para el mantenimiento de la ritmicidad circadiana. El estudio de los dobles mutantes *cca1 lhy-R* muestra que son incapaces de mantener las oscilaciones en sus niveles de expresión en condiciones de luz constante o en oscuridad continua (Alabadí *et al.*, 2002). Estos resultados se ven apoyados por estudios que añaden un nuevo componente al reloj circadiano: *EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 (EPR1)* (Kuno *et al.*, 2003). EPR1 es una proteína de localización nuclear con un único dominio tipo MYB con alta similitud a CCA1 y LHY. Al igual que *CCA1* y *LHY*, muestra acumulación circadiana de su transcrito con un máximo de acumulación al amanecer (aunque ligeramente desfasado de *CCA1* y *LHY*) y reprime su propia expresión, sugiriendo que es parte del bucle de retroalimentación negativo. *EPR1* está regulado por los fitocromos A y B y pierde su ritmicidad en los mutantes *cca1-ox* y *lhy*. Plantas que sobreexpresan la proteína EPR1 presentan un retraso en la floración y una alteración en la apertura de los cotiledones. Estos resultados indican que EPR1 forma parte del reloj circadiano de Arabidopsis, sin embargo su sobreexpresión

no afecta la ritmicidad de *CCA1* y *LHY*, sugiriendo que *EPR1* no forma parte del oscilador central, sino que parece jugar un papel en el ajuste fino del reloj circadiano.

En los últimos años se ha estudiado la posibilidad de que haya más de un oscilador central. Kikis y colaboradores (2005) mostraron que *ELF3* y *ELF4* son necesarias para la expresión inducida por la luz de *CCA1* y *LHY*, y en cambio, *CCA1* y *LHY* actúan negativamente en la expresión de *ELF4* inducida por la luz. Estos datos son consistentes con la hipótesis de la existencia de un bucle de retroalimentación negativo formado por *CCA1/LHY* y *ELF4* de modo análogo al propuesto para el oscilador central *CCA1/LHY/TOC1*. Estos datos sugieren que el oscilador está formado por dos o más bucles de retroalimentación transcripcionales interrelacionados entre sí y que actuarían en condiciones distintas (Kikis *et al.*, 2005). Estudios aún más recientes apuntan la idea de que habría tres bucles de retroalimentación relacionados entre sí (Locke *et al.*, 2006). El primer bucle de retroalimentación se expresa al comienzo del día y está formado por *LHY* y *CCA1* que activarían la transcripción de *PRR7* y *PRR9* (Farre *et al.*, 2005; Nakamichi *et al.*, 2005; Nakamichi *et al.*, 2007), mientras que las proteínas *PRR7* y *PRR9* reprimen la activación de *LHY* y *CCA1*. El segundo bucle autoregulatorio estaría formado por *LHY* y *CCA1*, que reprimen la expresión de *TOC1* y de *GI* (Locke *et al.*, 2005b), por su parte, la proteína *TOC1* activa el transcrito de un gen X, hasta ahora desconocido, que una vez activado activaría la transcripción de *LHY* y *CCA1* formando el segundo bucle autoregulatorio. Por otra parte, *GI* activa la expresión de *TOC1* y la expresión de *TOC1* reprime la expresión de *GI*, formando el tercer bucle de retroalimentación que se expresa al atardecer.

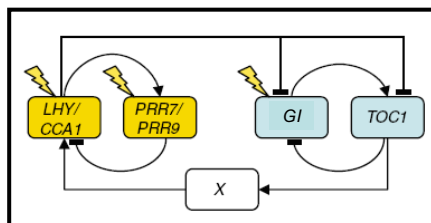


Figura III. Modelo propuesto de oscilador central formado por tres bucles de retroalimentación. Modificado a partir de Locke *et al.* (2006).

Genes de salida del reloj. *GI*, *CO* y *FT*.

Entre los mutantes de tiempo de floración en *Arabidopsis*, hay un grupo que presenta floración tardía en días largos pero que se comportan igual que plantas silvestres

en días cortos. Los genes *CRYPTOCHROME2/FHA (CRY2)*, *GI*, *CO*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1/AGL20)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *FWA* participan en la ruta que favorece la floración en respuesta a días largos. *CO* es específico de esta vía (Suárez-López *et al.*, 2001), el resto de genes también actúan en otras rutas o tienen funciones integradoras como *FT*, *SOC1* y *FWA*, que actúan por debajo de *CO* (Onouchi *et al.*, 2000; Kardailsky *et al.*, 1999; Samach y Coupland, 2000), o como *CRY2* y *GI* que preceden funcionalmente a *CO* (Suárez-López *et al.*, 2001).

GI es una proteína nuclear implicada en la promoción de la floración en días largos, en la entrada de la señal luminosa al reloj circadiano y en la fotomorfogénesis de la semilla bajo luz roja continua, pero no en rojo lejano (Oliverio *et al.*, 2007). En condiciones de día corto, el pico de expresión máxima es a las ocho horas del comienzo de la luz. En días largos, los niveles de los picos de expresión de *GI* están ligeramente por debajo y ocurren dos horas más tarde que en día corto, a las diez horas del comienzo de la luz y continúan ciclando en fase bajo condiciones de luz continua y de oscuridad, lo que indica que está bajo control del reloj circadiano (Fowler *et al.*, 1999). Los patrones de expresión circadianos de *GI* y los genes asociados al reloj *LHY* y *CCA1*, están alterados en mutantes *gi*, mostrando que *GI* se requiere para mantener la amplitud circadiana y la duración del periodo apropiada para esos genes (Park *et al.*, 1999). Mutantes *gi* presentan floración independiente del fotoperiodo, y alteración del ritmo circadiano (Fowler *et al.*, 1999). La mutación *gi-1* también afecta a la señalización por luz del reloj, lo que sugiere que *GI* participa en un bucle autoregulatorio del reloj circadiano de la planta (Fowler *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). En los últimos años se ha descrito que *GI* potencialmente participa en una ruta secundaria de señalización de la luz hacia el reloj circadiano (Locke *et al.*, 2005a; Locke *et al.* 2005b; Locke *et al.*, 2006). *GI* regula el tiempo de floración en parte a través de la regulación del mRNA de *CO*. Los mutantes *gi* contienen niveles reducidos de mRNA de *CO* (Suárez-López *et al.*, 2001), mientras que la sobreexpresión de *GI* da lugar a altos niveles de expresión de *CO*.

CO es un miembro de una familia génica de *Arabidopsis* formada por 17 miembros. La proteína que codifica *CO* contiene 2 regiones de 43 aminoácidos en el extremo amino terminal de la proteína y un dominio carboxi terminal CCT (denominado así porque está presente en proteínas CO, CO-like y TOC1) (Robson *et al.*, 2001). Este dominio es necesario y suficiente para la localización nuclear de las proteínas de fusión a la proteína fluorescente verde (GFP), GFP:CO o GFP:TOC1. Una mutación que afecte al

dominio CCT retrasa la floración sin afectar la función de localización nuclear, sugiriendo que este dominio tiene funciones adicionales (Robson *et al.*, 2001). Los niveles del transcrito de *CO* muestran un ritmo diurno a lo largo de los días, con un pico bifásico entre las 12 y 24 horas y los niveles máximos a las 16 y 24 horas. Este pico es más estrecho en día corto, finalizando 4 horas antes (Suárez-López *et al.*, 2001). Los niveles de transcrito de *CO* se expresan más en días largos que en días cortos. Plantas en día largo muestran un ritmo circadiano en los niveles de transcrito de *CO* cuando se llevan a luz continua, indicando que ese ritmo está controlado por el reloj circadiano (Suárez-López *et al.*, 2001). Además, mutantes del reloj circadiano, *lhy*, *gi*, y *elf3*, muestran un ritmo alterado en los niveles de transcrito de *CO* que se correlaciona con su fenotipo de floración. Por otro lado, *CO* parece mediar entre el reloj circadiano y el gen *FT*. Observando la activación de la expresión de *FT* por *CO*, se propuso que la activación post-transcripcional de *CO* por luz debe llevar a la activación de *FT* y en último termino la floración (Suárez-López *et al.*, 2001). Este modelo sugiere que el reloj circadiano actúa dentro de la vía de fotoperiodo para regular la expresión de genes que están por debajo como son *CO* y *FT* (Suárez-López *et al.*, 2001). De acuerdo con esto, plantas *35S::FT* pueden suprimir el efecto de mutantes *co*. Sin embargo no se encontró ninguna mutación que suprimiera totalmente el fenotipo temprano de *35S::CO*, sugiriendo que *CO* activa rutas paralelas (Onouchi, 2000). Cuando se sobreexpresa constitutivamente *CO* se induce la floración temprana, se aumentan los niveles de expresión de *FT* y *SOC1* (indicando que esos genes actúan por debajo de *CO*) y se pierde sensibilidad al fotoperiodo. Además, la sobreexpresión de *CO* se suprime parcialmente en mutantes de los genes *FT*, *SOC1* y *FWA* (Onouchi, 2000).

En los últimos años se ha propuesto que criptocromos y fitocromo A, actúan al final del día estabilizando la proteína CO (Valverde *et al.*, 2004). La estabilización de CO por exposición a la luz puede explicar como CO promueve la expresión de *FT* y así la floración en días largos. Se ha sugerido que la estabilización de la proteína CO esté mediada por la proteína SUPPRESSOR OF PHYA-105 (SPA) (Laubinger *et al.*, 2006).

FT se ha caracterizado como una diana temprana de *CO* (Samach *et al.*, 2000), y sus niveles de transcrito siguen un ritmo circadiano con pico a las 20 horas en día largo (Suárez-López *et al.*, 2001). En los últimos años se ha propuesto que el mRNA de *FT* se transporta desde la hoja al meristemo apical e induce la floración, proponiendo a *FT* como un componente de lo que se ha denominado como florígeno (Huang *et al.*, 2005, Corbesier y Coupland, 2006). Sin embargo, estudios recientes revelan a la proteína FT como la señal

florigénica (Jaeger y Wigge, 2007; Lin *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2007; Corbesier *et al.*, 2007). Mediante la fusión de la proteína FT a GFP (green fluorescent protein) se comprobó que la proteína de fusión FT-GFP es capaz de ser exportada a través del floema y desacoplando los efectos del mRNA de *FT* y la proteína FT *in vivo*, se comprobó que la exportación de la proteína FT a través del floema sería suficiente para inducir la floración (Mathieu *et al.*, 2007).

3.2.- Vía autónoma.

En la vía autónoma participan una serie de genes cuyos mutantes florecen tardíamente en condiciones tanto de día largo como de día corto, es decir, son totalmente independientes del fotoperiodo. Su floración tardía puede ser adelantada con un periodo de vernalización, lo que significa que se da una estrecha relación entre la vía autónoma y la vía de vernalización, de hecho, estas dos vías se disponen paralelamente y terminan reprimiendo a *FLC*. Los genes que integran esta vía actúan todos sobre *FLC* (Koornneef *et al.*, 1998a), y no parece que actúen de manera sucesiva, sino que lo reprimen agrupados. Se ha comprobado mediante análisis epistáticos, que existen al menos dos grupos en esta vía que reprimen a *FLC*. Uno formado por *FCA* y *FY* y otro formado por *FVE* y *FPA* (Rouse *et al.*, 2002) y se piensa que el gen *LD* pueda constituir un tercer grupo, aunque este gen no es activo en el ecotipo Landsberg erecta (Koornneef *et al.*, 1991). Además es posible que exista otro grupo formado por genes de la vía de fotoperiodo como son *FHA*, *FE* y *FT* (Dean *et al.*, 2002; Reeves y Coupland, 2001).

Como ya hemos apuntado previamente, en todos estos mutantes se han constatado altos niveles de transcrito de *FLC*, lo que muestra, que estos genes son represores de *FLC*, es decir, actúan promoviendo la transición a la floración. Además, la represión se ejerce directamente sobre *FLC*, y no sobre *FRI*, lo que reafirma la hipótesis de que este gen actúa sinérgicamente con *FLC*, pero no independientemente (Koornneef *et al.*, 1998a).

FVE codifica la proteína AtMSI4, relacionada con proteínas asociadas al retinoblastoma en mamíferos y que podría participar en la represión transcripcional mediante complejos histona deacetilasa (Kim *et al.*, 2004; Ausín *et al.*, 2004).

Por lo que a *FCA* se refiere, se conoce que éste gen actúa como un fuerte represor en la vía autónoma. El producto de la transcripción de este gen es una proteína con dos dominios de unión a RNA y un dominio WW de interacción con proteínas que podrían funcionar en la regulación post-transcripcional de transcritos implicados en el control del

tiempo de floración. Una de sus principales características es que el RNA de este gen experimenta procesamiento alternativo, por el cual produce cuatro proteínas diferentes, de las cuales sólo es activa, la llamada γ -FCA, presente en una proporción del 35% (Macknight *et al.*, 1997; Page *et al.*, 1999, Quesada *et al.*, 2003).

La función en última instancia de la vía autónoma es reducir la expresión de *FLC*, inducir la transcripción de genes de identidad del meristemo como *LFY* y consecuentemente, promover la transición floral.

3.3.- Integración de las rutas.

Cada una de las rutas genéticas regulan la floración en respuesta a diferentes señales ambientales, pero estas rutas finalmente convergen para regular la expresión de los mismos genes. Todas las rutas de transición a la floración inducen, en última instancia, la activación transcripcional de un mismo conjunto de genes de identidad del meristemo (Piñeiro y Coupland, 1998). *LFY* es el primero de estos genes que se expresa, y activa directamente otros genes de identidad del meristemo, como *API* (Wagner *et al.*, 1999). La vía de transición a floración dependiente del fotoperiodo y la de GA, inducen la expresión de *LFY*, cada una por separado (Blázquez y Weigel, 2000). Se puede afirmar, por tanto, que estas dos rutas convergen en *LFY*.

La convergencia entre la vía del fotoperiodo y la autónoma también se ha estudiado. Estas rutas están claramente separadas hasta los genes *FLC* y *CO*. El gen *SOCI*, que actúa por debajo de *CO*, se activa por *CO* y se reprime por *FLC* (Hepworth *et al.*, 2002) sugiriendo que ambas rutas convergen en *SOCI* (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000; Michaels y Amasino, 2000). Además, *SOCI* está regulado por GA, y por tanto representa un punto de convergencia de las tres rutas importantes de floración (Borner *et al.*, 2000).

La expresión de *FT*, un segundo gen del tiempo de floración regulado por más de una ruta, se reduce en mutantes de la vía de fotoperiodo y de la vía autónoma y se activa mediante la sobreexpresión de *CO*, lo cual indica que *FT* actúa por debajo de estas dos rutas (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Samach *et al.*, 2000). Como consecuencia, la ruta del fotoperiodo y las rutas autónoma y de vernalización están integradas en la regulación de *FT* y *SOCI*. Estas rutas difieren en sus contribuciones relativas a la regulación de estos dos genes.

La función de los genes de floración integradores de las rutas *FT* y *SOC1* es activar la expresión de genes de identidad del meristemo, y promover así la transición a floración. *SOC1* activa directamente la expresión de *LFY*, mientras que *FT* no actúa sobre *LFY* para regular su expresión, sino que actúa en una ruta paralela. *FT* puede activar la expresión de otros genes de identidad del meristemo como *AP1* (Ruiz-García *et al.*, 1997). Por tanto, la primera activación de *LFY* y *AP1* puede que ocurra a través de rutas paralelas, y la rápida y completa expresión de los genes de identidad del meristemo, puede requerir la subsiguiente activación directa de *AP1* por *LFY*.

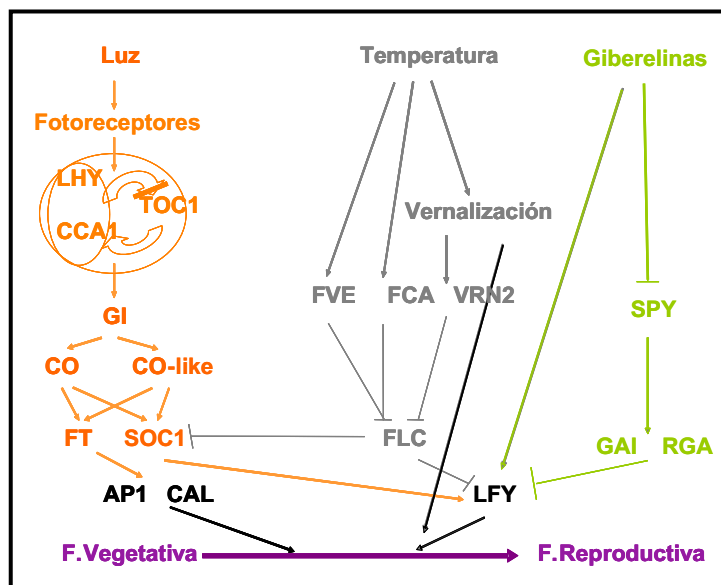


Figura IV. Diagrama con las rutas de transición a la floración y los principales genes que las integran.

4) Respuestas a estrés en *Arabidopsis thaliana*.

Como parte del proceso evolutivo, las plantas han desarrollado múltiples mecanismos que les han permitido adaptarse a diferentes entornos ambientales. Para los casos donde la adaptación no es posible, la planta ha desarrollado también mecanismos que le permiten defenderse de los distintos factores de estrés que comprometan su viabilidad o supervivencia. Dichos factores de estrés pueden ser clasificados de acuerdo a su naturaleza en factores de tipo abiótico, si lo produce algún factor ambiental, como son la exposición a temperaturas extremas, el estrés hídrico, la irradiación con luz UV y la exposición a ozono,

o de naturaleza biótica, derivados de la actividad de un organismo vivo, entre los que se encuentra el ataque de patógenos como bacterias, virus y hongos, así como el daño mecánico producido por insectos y por herbívoros.

Algunos de estos mecanismos de defensa son constitutivos, es decir, se encuentran establecidos en la planta antes de sufrir el estrés. Así, la existencia en las plantas de una serie de barreras defensivas de tipo estructural, tales como la propia pared celular o la cutícula, las protegen de distintas condiciones adversas (Hückelhoven, 2007). Sin embargo, la defensa incluye también otros mecanismos más sofisticados, en los que, tras la percepción del factor de estrés, se activa de forma específica una cascada de señales que desencadenan una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, y que requieren a menudo la activación de un conjunto de genes cuyos productos proporcionan protección, no sólo a nivel local sino también, a menudo, sistémicamente en áreas distales (Shah *et al.*, 1999). Esa corriente de información en forma de flujo de señales es lo que constituye el proceso de transducción de las señales defensivas. Cada una de estas señales intermediarias es capaz de inducir la expresión de múltiples genes, por lo que muchas respuestas de defensa comparten intermediarios comunes que establecen interacciones reguladoras entre las diversas rutas de señalización.

Las moléculas tradicionalmente caracterizadas como reguladoras en procesos de estrés son el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico, el etileno y el ácido abscísico (ABA) (Zeevaart y Creelman, 1988; Pieterse *et al.*, 2001; Kunkel y Brooks, 2002; Nandi *et al.*, 2003; Spoel *et al.*, 2003; O'Donnell *et al.*, 2003). SA está implicado en la activación de defensas locales y en la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Dempsey *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 1999), así como en la irradiación de las plantas con luz UV-C y la exposición a ozono (Yalpani *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 1996). Los jasmonatos, además de actuar en la resistencia a patógenos necrotrofos (Thomma *et al.*, 1999), están implicados en otros procesos como la elongación de las raíces, el desarrollo del polen, la dehiscencia de las anteras, la maduración de las semillas y la defensa contra los daños producidos por herida, ozono o insectos (Devoto y Turner, 2003). El etileno es la hormona vegetal de mayor simplicidad estructural. A pesar de ello, juega un papel importante en la regulación de un amplio espectro de procesos tales como maduración del fruto, senescencia de las hojas, desarrollo de las semillas, y la respuesta a una serie de agentes estresantes ambientales como frío, inundación, herida y ataque por patógenos (Abeles *et al.*, 1992). El ácido abscísico tiene como función principal la adaptación de las plantas a estrés, tanto de tipo

biótico como abiótico. Chen y colaboradores (1983) demostraron que intervenía en la modulación de la expresión de genes encargados de la respuesta adaptativa en plantas a condiciones medioambientales adversas (inundación, alta salinidad y frío). ABA participa también en otros procesos fisiológicos como el cierre de los estomas, abscisión de hojas y fruto, embriomorfogénesis, desarrollo de las semillas (interviene en la maduración, dormición y crecimiento), síntesis y almacenaje de proteínas y lípidos, senescencia de las hojas y defensa frente a patógenos (Zeevaart y Creelman, 1988; Koornneef *et al.*, 1989; Hetherington y Quatrano, 1991; Ingram y Bartels, 1996).

5) *Ácido salicílico. Generalidades y biosíntesis.*

SA pertenece a un grupo muy diverso de sustancias conocidas como compuestos fenólicos, que se caracterizan por poseer un anillo aromático con un grupo hidroxilo o derivados funcionales. En las plantas, los compuestos fenólicos, relacionados con el metabolismo secundario, participan en gran cantidad de actividades como la regulación del crecimiento, desarrollo de la planta e interacción con otros organismos. Estos compuestos son esenciales para la síntesis de lignina de la pared celular vegetal, pueden funcionar como fitoalexinas y algunos han sido asociados con defensas químicas de la planta contra microorganismos, insectos y herbívoros. Además se ha propuesto que puedan funcionar como moléculas señalizadoras de interacciones entre plantas y microorganismos simbióticos (Chou y Patrick, 1976).

Diferentes estudios han mostrado la función relevante de SA en la regulación de diferentes procesos fisiológicos y de adaptación de las plantas (Harborne, 1980). SA se encuentra en los tejidos de las plantas en forma libre o conjugada. Su alta constante de disociación y su pequeño tamaño lo hacen ideal para el transporte a larga distancia en el floema. Por lo tanto, SA, a menos que sea activamente transportado, metabolizado o conjugado, se transporta con facilidad, vía tejido vascular, desde el punto de aplicación o síntesis hasta tejidos distantes.

Biosíntesis del ácido salicílico en plantas.

Se ha propuesto la existencia de al menos dos rutas de biosíntesis de SA en plantas. En plantas solanáceas se ha caracterizado una ruta biosintética derivada de la ruta general

de los fenilpropanoides que requiere la conversión de la fenilalanina en ácido *trans*-cinámico, catalizado por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Verberne *et al.*, 1999) y la posterior conversión del ácido *trans*-cinámico en ácido benzoico (Ribnicky *et al.*, 1998; Jarvis *et al.*, 2000) y SA, sucesivamente (Yalpani *et al.*, 1993; León *et al.*, 1993). Sin embargo, la vía mediada por PAL no parece producir todo el SA en las células de las plantas, sugiriendo que debe haber rutas alternativas de biosíntesis. En algunas bacterias, el SA es sintetizado a partir de corismato vía isocorismato. Las enzimas isocorismato sintasa (ICS) e isocorismato piruvato liasa (IPL) catalizan los dos pasos de corismato a SA (Serino *et al.*, 1995). En *Arabidopsis* se ha comprobado la existencia de una ruta análoga a la biosíntesis bacteriana de SA. Un mutante *sid2-1* afectado en el gen *SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 (SID2)*, que codifica la ICS1 localizada en el cloroplasto, es incapaz de sintetizar SA y de activar resistencia en respuesta a la inoculación con patógenos (Wildermuth *et al.*, 2001). La aplicación de SA complementa el defecto que tiene el mutante *sid2* para sintetizar SA y establecer la respuesta SAR, confirmando la implicación de SID2 en la síntesis de SA (Wildermuth *et al.*, 2001; Nawrath y Metraux, 1999).

El gen *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5 (EDS5)*, codifica una proteína que tiene homología con la familia de transportadores que extruyen toxinas de la familia MATE (Nawrath *et al.*, 2002). En el mutante *eds5/sid1* la activación de la síntesis de SA, inducida por luz UV o por patógenos, así como la correspondiente activación de resistencia quedan bloqueadas (Nawrath *et al.*, 2002). EDS5 puede haber evolucionado para transportar compuestos fenólicos precursores de la biosíntesis de SA. Los mutantes *eds1 (enhanced disease susceptibility1)* y *phytoalexin deficient 4 (pad4)* comprometen también la síntesis de SA en las interacciones planta-patógeno (Jirage *et al.*, 1999; Feys *et al.*, 2001), y en mutantes constitutivos de la señalización por SA (Clarke *et al.*, 2001; Jirage *et al.*, 2001). *eds1* y *pad4* bloquean también la expresión de EDS5, activada por patógenos, sugiriendo que EDS1 y PAD4 preceden funcionalmente a EDS5 en la síntesis de SA. Además, EDS5 actúa por encima de SID2 en la biosíntesis de SA, ya que la expresión inducida por patógeno de EDS5 no se ve alterada en el mutante *sid2*.

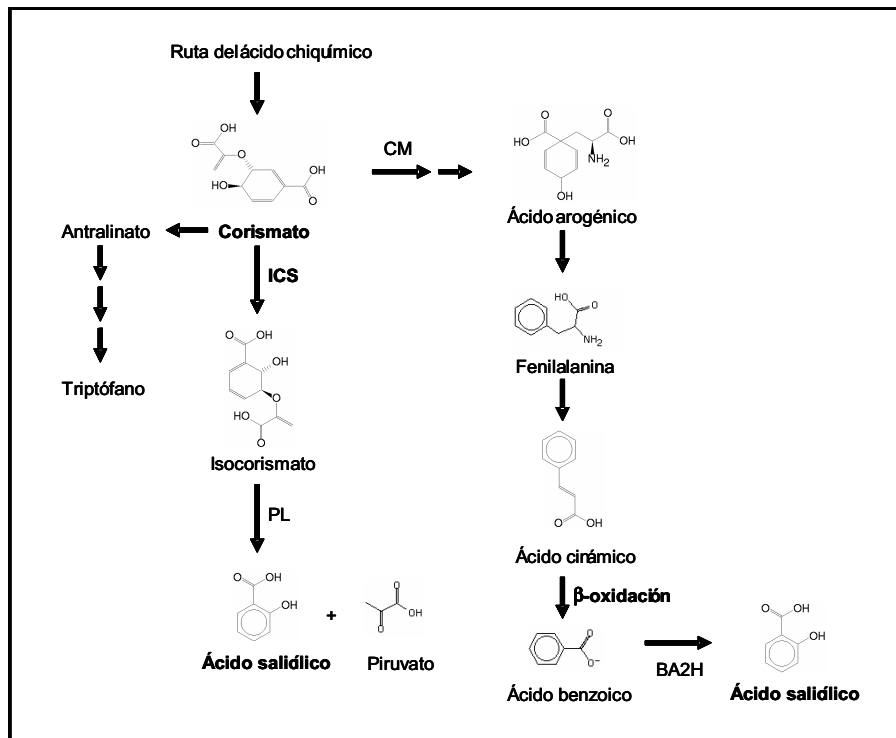


Figura V. Esquema de las rutas de biosíntesis de SA.

6) Funciones del ácido salicílico.

SA ha sido ampliamente caracterizado como una molécula con actividad reguladora en procesos de defensa de plantas frente a patógenos biotrofos. Las plantas responden al ataque de patógenos biotrofos activando la síntesis y acumulación de SA (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). También se ha descrito la acumulación de SA en respuesta a determinados factores de estrés como la irradiación de las plantas con luz UV-C y la exposición a ozono, promoviendo la expresión de genes *PR* y el aumento de la resistencia en la planta (Yalpani *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 1996).

En los últimos años, se han identificado nuevas funciones para el SA, algunas de las cuales están relacionadas con el desarrollo. Entre éstas, se ha caracterizado que SA es un regulador de la senescencia en hojas (Morris *et al.*, 2000) y también que regula la transición a la floración de plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés (Martínez *et al.*, 2004).

6.1.- Respuesta de la planta al ataque de patógenos. Ácido salicílico y defensa.

En respuesta al ataque de patógenos, las plantas sintetizan diferentes compuestos que les confieren resistencia tanto a nivel local como a nivel sistémico. Entre estos compuestos podemos encontrar: fitoalexinas, fitoancipinas, proteínas relacionadas con la patogenicidad (PRs), algunos péptidos antibióticos y determinadas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (como H_2O_2 y NO). Muchos de estos compuestos proporcionan a la planta una defensa efectiva de amplio espectro (Yoder *et al.*, 1993; Jackson y Taylor, 1996; Yoder *et al.*, 2001) y constituyen la inmunidad natural de las plantas a un gran número de patógenos. Además de la inmunidad natural, las plantas disponen de mecanismos de defensa inducibles que permiten hacer frente a infecciones de determinados patógenos y que viene genéticamente determinada tanto por parte de la planta (genes de resistencia “R”) como del patógeno (genes de avirulencia “Avr”) (Staskawicz *et al.*, 1995). La interacción específica de ambos productos génicos es la responsable de la activación de la respuesta defensiva, tal y como propuso Flor en 1971 con la hipótesis de la interacción “gen a gen”. En el caso de que no se produzca la interacción “gen a gen”, por la falta de un gen R, o de un gen Avr, o por deficiencias en el reconocimiento, la interacción es de tipo compatible y el patógeno escapa a la respuesta defensiva, invadiendo la totalidad del órgano afectado o la planta entera (Staskawicz *et al.*, 1995). En el caso contrario, cuando se produce el reconocimiento “gen a gen” se dice que la interacción planta-patógeno es incompatible y se activa una cascada de señalización que finalmente dará lugar al colapso o muerte celular de aquellas células y tejidos situados en el sitio de inoculación, impidiéndose de este modo la propagación del agente infeccioso. Este mecanismo se conoce como respuesta hipersensible o HR (Agrios, 1988; Mathieu *et al.*, 1991; Goodman y Novacky, 1994; Dangl *et al.*, 1996). El reconocimiento del patógeno por parte de la planta es el principio de un complejo proceso de señalización y transducción de señales a nivel celular. Estos cambios comienzan a producirse de manera local en la zona donde se ha producido la invasión del patógeno y más tarde se extienden de manera sistémica por toda la planta. Este fenómeno de muerte celular programada que ocurre en el lugar de entrada del patógeno provoca la aparición posterior en toda la planta de una resistencia sistémica no específica o resistencia sistémica adquirida “SAR” (Ryals *et al.*, 1996). La SAR se caracteriza por ser de duración larga (desde días hasta semanas dependiendo del patógeno), por conferir protección en tejidos distales a los puntos de infección inicial, por su inespecificidad al proporcionar resistencia a

un amplio espectro de patógenos, por la acumulación de SA y por la activación de la expresión selectiva y coordinada de un grupo característico de genes de defensa (genes SAR), que estarán directamente implicados en el establecimiento y mantenimiento de dicha resistencia (Ward *et al.*, 1991; Dong, 1998; Glazebrook, 1999; Glazebrook, 2001; Gozzo, 2003; Pieterse y Van Loon, 2004; Durrant y Dong, 2004; Grant y Lamb, 2006).

El conjunto mayoritario de proteínas defensivas sintetizadas en las plantas durante dicha respuesta SAR pertenece a la familia de las proteínas PR, pero sólo los genes que codifican proteínas PR ácidas (*PR-1*, *PR-2*, *PR-5*) responden fuertemente a SA o cualquiera de sus análogos y se expresan tanto local como sistémicamente después de una infección (Stintzi *et al.*, 1993; Brederode *et al.*, 1991; Van Loon *et al.*, 2006). La adición exógena de SA tanto a hojas de plantas de tabaco como de *Arabidopsis thaliana* induce la expresión de un conjunto de genes SAR y por consiguiente una mayor resistencia de las plantas a patógenos (Ward *et al.*, 1991). La inducción de resistencia en partes de la planta distantes del sitio de inoculación inicial sugiere la existencia de una señal que se desplazaría sistémicamente dando lugar al establecimiento de SAR (Bi *et al.*, 1995). En un inicio se propuso al SA como dicha señal (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990), sin embargo ciertos experimentos han demostrado que no es la señal sistémica, aunque su presencia en tejidos distales es absolutamente necesaria para la implantación de SAR (Vernooij *et al.*, 1994). El papel central del SA en las defensas inducibles de las plantas se puso de manifiesto con la utilización de las plantas transgénicas nahG. Estas plantas expresan constitutivamente el gen bacteriano *nahG*, que codifica una salicilato hidroxilasa de *Pseudomonas putida*, que convierte el SA en catecol. Las plantas nahG de tabaco y *Arabidopsis thaliana* muestran una mayor susceptibilidad a una amplia gama de patógenos (oomicetos, hongos, bacterias y virus) (Delaney *et al.*, 1995; Kachroo *et al.*, 2000).

6.2.- Ácido salicílico y desarrollo. Termogénesis, senescencia y floración.

La síntesis de SA y la señalización mediada por dicha molécula, participan no sólo en respuesta a patógenos sino a muchos otros factores ambientales y relacionados con el desarrollo de las plantas. Se han descrito numerosos procesos relacionados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas regulados por salicilatos. Entre ellos, han sido relativamente bien caracterizados tres procesos del desarrollo que parecen estar regulados por salicilatos: la termogénesis (Raskin *et al.*, 1987), la senescencia de las hojas (Morris *et*

Introducción

al., 2000) y la transición a la floración de plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés (Martínez *et al.*, 2004).

Termogénesis

En algunas plantas se ha observado un aumento de temperatura en lugares y órganos determinados. La termogénesis, o producción de calor en las plantas, que descubrió Lamarck en 1778 para el género *Arum*, actualmente se sabe que ocurre en estructuras reproductivas masculinas de flores e inflorescencias de varias especies de angiospermas (Meeuse y Raskin, 1988). Se comprobó que el ápice de la inflorescencia de la planta *Sauromatum guttatum*, perteneciente al género *Arum*, en los días próximos a la anthesis generaba calor, que facilitaba la volatilización de sustancias volátiles como aminas (Smith y Meeuse, 1966), que atraen a insectos polinizadores. En 1987, un análisis espectroscópico del extracto calorígeno altamente purificado de flores masculinas de *S. guttatum*, indicó la presencia de SA (Raskin *et al.*, 1987). Por otro lado, la aplicación exógena de SA a secciones del ápice inmaduro, llevó a un aumento de la temperatura de 12 °C. Este incremento duplica, en magnitud y duración, los incrementos de temperatura producidos por el extracto calorígeno crudo, lo cual indica que SA es el responsable de la inducción de la termogénesis. La cinética observada de acumulación de SA en el ápice se ajusta a la proposición inicial de Van Herk (1937) de que el calorígeno se produce en las flores masculinas y se mueve al ápice de estas durante el día anterior a la floración. SA además, produce grandes cantidades de aminas e indoles en el día previo a la floración (Raskin *et al.*, 1987). En el día anterior a la anthesis, los niveles de SA aumentaron hasta 100 veces. El nivel de SA comenzó a aumentar por la tarde hasta alcanzar el máximo al anochecer. El descubrimiento del papel de SA como regulador de la termogénesis fue la primera función reguladora caracterizada para SA endógeno.

Senescencia

La senescencia de las hojas es un proceso complejo controlado por múltiples señales del desarrollo y ambientales y se manifiesta con la expresión inducida de un gran número de genes. La senescencia marca el final del estado de desarrollo de la hoja y se inicia un periodo catabólico que permite la movilización de los nutrientes reciclados desde la hoja a los órganos sumideros como flores o frutos. Morris y colaboradores (2000) llevaron a cabo estudios que demostraron, por primera vez, que la ruta señalizadora de SA

jugaba un papel en el control de la expresión de los genes durante el desarrollo de la senescencia. Se utilizaron plantas de *Arabidopsis* afectadas en la ruta de señalización de SA para investigar la expresión de los genes implicados en la senescencia, y un número de genes mostraron sus patrones de expresión alterados. Estos cambios en los patrones de expresión, acompañados por retrasos en el amarilleo y reducción de la necrosis, en plantas mutantes, afectadas en la señalización de SA, sugerían la implicación de SA en la muerte celular que ocurre en el estado final de la senescencia. Morris y colaboradores (2000) propusieron que en las hojas senescentes existen un mínimo de tres factores de señalización promotores de la senescencia, uno de los cuales es SA. Estudios recientes mediante la comparación de transcriptomas sugieren el papel de SA como regulador de la senescencia natural y no de la senescencia forzada por oscuridad en hojas cortadas (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Recientemente se ha postulado que no sólo el SA como tal está implicado en el proceso de senescencia, sino que también el equilibrio entre SA y JA es capaz de regular la función antagonista entre el factor de transcripción específico de senescencia WRKY53 y la proteína inducible por JA EPITHIOSPECIFYING SENESCENCE REGULATOR (ESR/ESP) (Miao y Zentgraf, 2007).

Floración

Además de regular la termogénesis en flores y la senescencia foliar, al final de la década de los 70 y principio de los 80 se había propuesto que SA podría ser una molécula con actividad inductora de la floración (Cleland y Ajami, 1974; Cleland y Tanaka, 1979; Watanabe *et al.*, 1981). Los efectos protectores de SA sobre la conservación de la flor cortada se habían descrito desde hace tiempo, y aunque inicialmente se propuso que esto era debido a que SA inhibe la biosíntesis de etileno (observado en suspensiones celulares de pera), también se observó que esta inhibición era mayor en condiciones ácidas. Experiencias posteriores confirmaron que el efecto de conservación de las flores cortadas se debía más a la acidificación del medio que a una posible acción específica de SA (Raskin, 1992).

El primer indicio de que SA podría estar implicado en la regulación de la floración de las plantas, viene de los experimentos realizados con áfidos que se alimentaban de brotes vegetativos y reproductivos de la planta de día corto *Xanthium strumarum*. Se partió de la hipótesis de que un factor transportable por el floema que fuera el responsable de la inducción de la floración podía encontrarse en las secreciones de los áfidos. Se probaron

diferentes fracciones de las secreciones aplicándolas sobre plantas de *Lemna gibba* en condiciones no inductivas de la floración y se identificaron sustancias inductoras y sustancias inhibitoras. Entre las sustancias activadoras se identificó a SA, el cual, a una concentración de 5,6 μM , causaba la máxima inducción de la floración en *Lemna gibba* (Cleland y Ajami, 1974). Los efectos de SA, potenciadores de la floración, se demostraron en otras especies de *Lemna*, tanto de día largo como de día corto (Cleland y Ajami, 1974; Cleland y Tanaka, 1979; Watanabe y Takimoto, 1979). Pronto se realizaron más demostraciones de la influencia de SA en la floración de plantas pertenecientes a otras familias. SA aplicado en los ápices de las plantas, así como el GA_3 y el β -naftol, inducen la formación de yemas florales en *Impatiens balsamina*, una planta cualitativa de día corto, estrictamente bajo periodos no inductivos (Nanda y Sharma, 1976; Sood y Nanda, 1979). El efecto de SA sobre el tiempo de iniciación y el número total de yemas florales formadas fue sinérgico con el efecto del GA y estuvo acompañado por el incremento en el contenido de ARN total (Kumar *et al.*, 1981a), fosfatasa (Kumar *et al.*, 1981b) y varias proteínas no identificadas (Kumar *et al.*, 1981c) en los órganos vegetativos de las plantas tratadas. En *Arabidopsis thaliana* se observó un sinergismo similar entre SA y GA_3 en la aceleración de la floración (Goto, 1981). No obstante, el mecanismo mediante el cual SA induce la floración en plantas ha permanecido desconocido. Aunque no se ha propuesto un mecanismo molecular que explicase la función reguladora del SA sobre la floración, se sugirió que SA podría inducir la floración actuando como un agente quelante (Oota, 1975). Esta hipótesis se basa en el hecho de que los agentes quelantes pueden inducir la floración en *Lemnaceae* (Oota, 1972; Venkataraman *et al.*, 1970; Seth *et al.*, 1970) y esta inducción es similar al efecto inductor de la floración que ejerce SA (Pieterse y Müller, 1977). Sin embargo, la actividad florigénica del ácido benzoico (Fraser, 1981; Watanabe y Takimoto, 1979) y otros fenólicos no quelantes (Watanabe *et al.*, 1981) sugiere que pueden estar implicados otros mecanismos inductores de floración.

La función de SA en la regulación de la floración, nunca ha sido correlacionada con cambios en los niveles endógenos de SA, ni se ha propuesto un mecanismo molecular que la explicase. Recientemente, ha sido identificada una vía que promueve la floración temprana en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés a través de un proceso que requiere la participación de SA. De hecho, en ausencia de estrés, plantas *sid2*, *eds5* y *nahG*, deficientes en la síntesis y acumulación de SA, muestran fenotipo de floración tardía comparados con plantas silvestres. Este retraso en el tiempo de floración se acentúa en

plantas crecidas en condiciones de día corto. En los mutantes *sid2* y *eds5* cultivados en día largo, es posible rescatar el tiempo de floración del silvestre mediante aplicación de SA o activación de su síntesis al irradiar con luz UV-C, lo que sugiere que la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis* requiere la acumulación endógena de SA (Martínez *et al.*, 2004).

De entre todos los agentes medioambientales testados que provocan estrés en plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en condiciones de día largo (temperaturas extremas, sequía o alta irradiación) sólo la irradiación con luz UV-C, que conlleva un aumento en los niveles endógenos de SA, fue capaz de acelerar la transición a la floración. Al comparar los niveles de transcritos de genes marcadores de la síntesis de SA, *SID2* y *PR1*, y de genes inductores de la floración *CO*, *FT* y *SOC1* en plantas silvestres y nahG irradiadas con luz UV-C, se observó un aumento en los transcritos de *SID2*, *PR1* y *FT* en plantas silvestres pero no en nahG. Esto sugiere que la síntesis y acumulación de SA se requieren para activar la transición a la floración mediante la irradiación con luz UV-C y que *FT* podría ser la diana para la función de SA como promotor de la floración (Martínez *et al.*, 2004).

Plantas deficientes en SA tienen niveles de transcrito de *FLC* incrementados dos veces en plantas cultivadas en condiciones de día largo y tres veces si han sido cultivadas en día corto. Los niveles de transcrito de *CO*, *FT* y *SOC1* se reprimen en un 50 % en plantas deficientes en SA cultivadas en condiciones de día largo, mientras que cuando se cultivan en día corto sólo los niveles de *FT* se reducen. También se midieron los niveles de transcrito de *FLC* en mutantes *fve-3* y *fca-9* y al aplicar SA se reducen los niveles de transcrito de *FLC*. Estos datos proponen a SA como un regulador negativo del represor *FLC* independiente de *FVE* y *FCA* y un activador de genes que promueven la floración como *FT* (Martínez *et al.*, 2004).

Midiendo el tiempo de floración de dobles mutantes de genes de la vía de fotoperiodo y autónoma con nahG se observó que sólo los dobles *co-1 nahG* y *fca-9 nahG* son más tardíos que sus parentales *co-1* y *fca-9* respectivamente. Luego SA parece interactuar tanto con la vía dependiente de fotoperiodo como con la vía autónoma para regular la floración acelerada por estrés, y parece que estas funciones se ejercen a través de mecanismos independientes de la función de genes de ambas rutas como *CO*, *FCA* y *FLC* y estrictamente dependientes de la función del gen *FT* (Martínez *et al.*, 2004).

Objetivos

Objetivos

El presente trabajo pretende analizar la función del ácido salicílico como regulador en la interacción entre las respuestas a estrés y el control del tiempo de floración en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Para ello se plantean los siguientes objetivos:

1. Caracterización del ácido salicílico como un regulador endógeno de la transición entre el desarrollo vegetativo y reproductivo.
2. Identificación de dianas moleculares reguladas por ácido salicílico con potencial función reguladora del tiempo de floración.
3. Caracterización molecular y funcional de las dianas identificadas.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos.

1) Material vegetal y condiciones de cultivo.

Para el estudio de la relación entre SA y el tiempo de floración se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo silvestre Columbia (Col-0), así como plantas deficientes en la acumulación (nahG), síntesis (*eds5* y *sid2*) y señalización (*npr1-1*) de SA. También se utilizaron los mutantes de la vía de fotoperiodo *gi-2*, *co-1*, *soc1* y *ft-4*, mutantes de la vía autónoma como: *fve-3*, *ld-1*, *flc-3* y *fca9* y mutantes de pérdida y ganancia de función del gen *CCA1* (*ccal-1* y *CCA1ox*). Todas las plantas se encuentran en fondo genético Col-0 a excepción del mutante *ccal-1* que se encuentra en fondo genético Wassilewskija (Ws). Los ecotipos Col-0 y Ws se obtuvieron del NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center). Los mutantes de tiempo de floración *co-1* y *ld-1* se obtuvieron del ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center; <http://Arabidopsis.org>). *flc-3* y *soc1* fueron facilitados por los doctores R. Amasino y J.H. Ahn respectivamente. El mutante *ft-4* fue aislado de la colección de mutantes de inserción de T-DNA Syngenta (SAIL 165_G11). Las semillas nahG fueron facilitadas por Dr. J. Ryals, los mutantes *sid2-1* y *eds5-3* por el Dr. J.P. Métraux y *fca-9* por la Dra. C. Dean. El Dr. J.M. Martínez-Zapater suministró los mutantes *gi-2* y *fve-3*. Los mutantes *ccal-1* y la línea transgénica *CCA1ox* fueron originados en el grupo de la Dra. E.M. Tobin y proporcionados por el Dr. David Alabá. Las semillas de *BGL2::GUS* y *npr1-1* fueron facilitadas por la Dra. X. Dong. En el apartado de variación natural se utilizó una colección de 37 ecotipos silvestres de *Arabidopsis thaliana* y una colección de RILs (líneas híbridas recombinantes) Col-(5/3) x Nd-1 obtenidas del NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center).

Las plantas se cultivaron en cámaras de cultivo, bajo condiciones controladas de fotoperiodo de día largo (D.L.) (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad) o corto (D.C.) (8 horas de luz, 16 horas de oscuridad), con iluminación fluorescente ($150 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$), una temperatura controlada de 20 a 22° C y una humedad relativa del 50 al 60 %. Para el cultivo *in vitro* de plántulas de *Arabidopsis*, las semillas se esterilizaron con una solución de lejía al 30 % y Tween al 0,02 % durante 10 minutos y se lavaron exhaustivamente con H₂O estéril.

Una vez esterilizadas, se sembraron en placas Petri que contenían medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con agar (0,8 %) y sacarosa (1 %). Para realizar la selección de plantas transgénicas, se añadió al medio kanamicina (50 mg/L). Con objeto de favorecer y sincronizar la germinación de las semillas se estratificaron un mínimo de 72 horas a 4° C, antes de ser transferidas a cámaras de cultivo *in vitro*. Las plantas cultivadas *in vitro* durante aproximadamente 10 días se transfirieron a un sustrato compuesto por turba, vermiculita y perlita en una proporción 2:1:1. Tras varios días en condiciones de alta humedad para favorecer su enraizamiento, se cultivaron en las condiciones antes descritas.

2) Tratamientos realizados.

Aplicación de compuestos.

Para la aplicación de tratamientos, las semillas se germinaron y cultivaron en medio MS líquido en placas de 24 pocillos. En cada pocillo se dispusieron entre 8 y 10 semillas y 1 ml de medio MS suplementado con sacarosa al 1 % (p/v). Estas semillas se mantenían en condiciones de D.L. durante una semana, al cabo de la cual el medio se renovaba mediante la adición de 500 µl de medio fresco. A los dos días de renovar el medio se llevaba a cabo el tratamiento mediante adición del compuesto al medio a la concentración final indicada. Las muestras se recogieron a los tiempos indicados en cada experimento. En el estudio de respuesta de plantas Col-0 a diferentes fitohormonas o donadores de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las plantas se cultivaron *in vitro* en medio sólido durante 14 días, tras los cuales se pasaron a medio líquido. En cada pocillo que contenía 1 ml de medio MS suplementado con sacarosa al 0,5 % (p/v) se depositaron cuatro plántulas durante 1 día para su aclimatación, transcurrido ese tiempo se realizó el tratamiento correspondiente en cada pocillo, recogiendo las muestras a las 0, 6 y 24 horas de añadir el tratamiento.

Irradiación con luz UV-C.

Para estudiar el efecto de la irradiación con luz UV-C sobre los niveles de transcrito de algunos genes, se irradiaron plántulas a las cinco horas de luz del día décimo tras la siembra con luz UV-C (254 nm) mediante una cámara de irradiación con luz UV-C de Amersham Pharmacia Biotech (San Francisco, CA, USA) aplicando una dosis de 200

mJ/cm². 24 horas después de la irradiación, se recogieron muestras de las plantas irradiadas y de sus controles no irradiados congelándolas en N₂ líquido y almacenándolas a - 80° C hasta que el material fuera procesado. Para analizar el efecto en el tiempo de floración, las plántulas se irradiaron al quinto día tras la siembra, asegurando así que la irradiación se realizaba en un estadio de la planta anterior al cambio de fase vegetativo a reproductivo. Dos días después, tanto las plantas irradiadas como los controles respectivos no irradiados se transfirieron a las condiciones de cultivo indicadas anteriormente.

Inoculación con patógenos.

El análisis de la respuesta a la inoculación con bacterias fitopatógenas de tipo biotrofo se llevó a cabo empleando la cepa virulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst.*) DC3000. Las bacterias se cultivaron en medio sólido Luria-Bertani (LB) suplementado con kanamicina (50 mg/L). El cultivo bacteriano se incubó a 23° C de día y 19° C de noche durante 48 horas tras las cuales se resuspendió en Cl₂Mg 10 mM y se midió la absorbancia, calculando el volumen necesario para tener finalmente una D.O._{600nm} = 0,1 (10⁸ c.f.u./ml). La inoculación se llevó a cabo mediante la inmersión de plántulas que se cultivaron en condiciones de D.C. durante dos semanas y se sumergieron durante 20 segundos en la solución bacteriana. Tras la inoculación, se dejaron en condiciones de alta humedad en D.C. durante 5 horas. Para cuantificar el crecimiento bacteriano se recogieron 4 réplicas de cada genotipo a 1 y 72 horas después de la inoculación, cada réplica consta de tres plántulas de peso conocido en 1 ml de Cl₂Mg 10 mM con Silwet L-77 en una concentración de 200 µl/l. Se agitaron a 28° C durante 1 hora y se realizaron diluciones seriadas en placas de 96 pocillos, que se sembraron posteriormente en placas de medio LB con kanamicina (50 mg/L) y rifampicina (25 mg/L). Las placas se mantuvieron a 28° C durante dos días al cabo de los cuales se contó el número de colonias en las diferentes diluciones y réplicas. Los datos así obtenidos se representaron como la media y la desviación estándar del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mg de peso fresco (log (cfu/mg PF)) de cuatro réplicas.

3) Aislamiento y manipulación del DNA de plantas.

Extracción de DNA.

El protocolo seguido para la extracción de DNA genómico fue el descrito por Edwards *et al.* (1991), consistente en triturar las muestras a temperatura ambiente durante 15 segundos, tras los cuales se añaden 400 µl del tampón de extracción TNES (200 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) y se agita vigorosamente durante 5 segundos. Seguidamente, se centrifugan durante 1 minuto y 300 µl del sobrenadante se pasan a un eppendorf nuevo al que se añaden 300 µl de isopropanol. Tras mezclar por inversión se mantienen a temperatura ambiente 2 minutos, seguidamente se centrifugan durante 5 minutos y tras eliminar el sobrenadante se dejan secar a temperatura ambiente para finalmente disolver las muestras en 100 µl de buffer 1 x TE (Tris 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM) o H₂O.

Reacciones de amplificación mediante PCR.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un volumen final de 25 µl empleando los siguientes componentes: tampón de reacción 1 x (Tris-HCl 75 mM pH 8,0, MgCl₂ 2 mM, KCl 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM y 0,0001 % BSA), dNTPs 200 µM, 400 nM de los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos y 1U de DNA polimerasa (Netzyme N.E.E.D.). Se utilizaron los termocicladores “Mastercycler Personal” de Eppendorf y el “Gene Amp PCR System 24000” de Perkin Elmer. Para cada caso se empleó un programa adecuado en función de la secuencia de los cebadores y de la longitud de los fragmentos amplificados.

Purificación de DNA.

Para conocer el tamaño de los fragmentos de DNA amplificados en cada caso se utilizaron electroforesis en geles de agarosa, generalmente al 1 % (p/v) (dependiendo del tamaño esperado) teñidos con bromuro de etidio, en tampón 1 x TBE (Tris 88 mM, ácido bórico 88 mM y EDTA 2 mM pH 8,0). Las bandas de DNA se visualizaron utilizando un transiluminador UV. Se aislaron las bandas de interés y el DNA se extrajo con el sistema “QUIAEX II” de QIAGEN. El sistema consiste primero en la disolución de la agarosa, seguida de la absorción de los ácidos nucleicos por partículas de sílice en presencia de una

alta concentración de sales. La separación del DNA de la resina se realizó mediante la adición de 20 μ l de Tris-Cl 10 μ M pH 8,5. Para la purificación del DNA amplificado en reacciones de PCR se utilizó el sistema “QIAquick” de QIAGEN. Este sistema se basa en la unión del DNA a membranas de sílice en presencia de una alta concentración de sales, limpiando el DNA de contaminantes que no son retenidos por la columna.

Reacciones de ligación.

Para las reacciones de ligación se siguió el protocolo de la T4 DNA ligasa de Fermentas. Para optimizar las reacciones se empleó una relación estequiométrica 1:5 entre vector e inserto. Para la realización de esta tesis, los vectores que se emplearon fueron: pBluescript SK+ y el vector binario BinA7. Las reacciones de ligación contenían en un volumen final de 20 μ l: entre 200 y 500 ng de vector y cinco veces más cantidad (relación molar) del inserto, 2 μ l del tampón de ligación 10 x (Tris-HCl 400 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 5 mM, pH 7,8) y 5 U de la T4 DNA ligasa, completando el volumen final con H₂O. En el caso del vector BinA7, para la construcción de sobreexpresión se utilizaron 250 ng de vector, mientras que para la construcción de RNAi se emplearon 500 ng de vector en la ligación. En el caso del vector pBluescript SK+, la ligación se realizó con 200 ng de vector. La reacción de ligación se incubó durante la noche a 22° C, inactivándola posteriormente a 65° C durante 10 minutos.

4) Aislamiento y manipulación de RNA.

Extracción de RNA.

La extracción del RNA de diferentes tejidos de Arabidopsis se realizó según el protocolo descrito por Logemann *et al.* (1987) con ligeras modificaciones. El RNA obtenido se almacena a - 80° C hasta su uso posterior. El RNA total aislado mediante este procedimiento se utilizó para análisis Northern, así como para retrotranscripción y posterior PCR tanto cuantitativa como semicuantitativa. Para la extracción de los RNAs de gran pureza, que se emplearon para los análisis con micromatrices de oligonucleótidos, se utilizó el sistema Micro-to-Midi RNA Isolation Kit (Invitrogen). La cuantificación del RNA se realizó midiendo la A_{260nm} de 1 μ l de RNA en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

Retrotranscripción del RNA.

Partiendo de 1 µg de RNA total se retrotranscribió mediante la enzima transcriptasa reversa de Amersham. Para ello, al RNA total se le añadió 1 µl del oligonucleótido cebador Oligo dT (Roche) a una concentración de 80 pM y H₂O tratada con DEPC hasta obtener un volumen final de 11 µl. Seguidamente se calentó durante 10 minutos a 70° C, y se dejó en hielo. Una vez frío se añadió a la mezcla 4 µl del tampón de la transcriptasa reversa 5 x (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 a 25° C, KCl 250 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 50 mM), 2 µl de dNTPs 10 mM, 20 U del inhibidor de RNasa y 1,5 µl de H₂O tratada con DEPC. Tras 10 minutos a 37° C se añadió a la mezcla 50 U de la transcriptasa reversa, se incubó a 42° C una hora y finalmente, se inactivó la enzima calentando a 70° C durante 10 minutos. Para obtener cDNA del transgen *GUS* al RNA total se le añaden 20 pM del oligonucleótido cebador específico reverso de *GUS* en lugar de Oligo dT.

PCR cuantitativa.

Para cuantificar los niveles de transcrito de los genes de interés mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl empleando los siguientes componentes: 300 nM de los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos diseñados con el programa Primer Express para cada uno de los genes a analizar (ver tabla I), 10 µl de la sonda SYBR[®]Green PCR Master Mix de Applied Biosystems y 1 µl de las reacciones de retrotranscripción (RTs) de las muestras a analizar. Se utilizó el termociclador GeneAmp[®] PCR System 9600 de Applied Biosystems. En todos los casos se empleó el programa de temperaturas recomendado por el fabricante para los oligonucleótidos diseñados con el programa Primer Express. Inicialmente las reacciones se mantuvieron durante 2 minutos a 50° C y 10 minutos a 95° C. A continuación las reacciones se continuaron durante 15 segundos a 95° C y un minuto a 60° C; esta última fase se repite 40 ciclos. Para cada una de las muestras se realizaron 3 réplicas y se normalizaron los resultados con los oligos de la *ACTINA 2/8*. El resultado obtenido se analizó con el programa 7000 System Software de Applied Biosystems.

Gen	Directo (5'→3')	Reverso (5'→3')
<i>PCC1</i>	TATGGAGTGTATCTTCTGCTGCG	TCTGATGTACAGAGGCTGGAGC
<i>CCA1</i>	CAGCCTTCTGCAACACCTGA	TCCTGCTCCATCTGAACCCCTT
<i>SOC1</i>	CAACGATTGAGCAACAGCTTGAG	AGCTTCTCGTTTTCTGCAGCTAG
<i>FT</i>	CAACCCCTCACCTCCGAGAATAT	TGCCAAAGGTTGTTCCAGTTGT
<i>ACTINA 2/8</i>	TTGTTCCAGCCCTCGTTTGT	TGTCTCGTGGATCCAGCAG
At1g06560	GAGCCCAGGTCTATGTGCCA	TCTCAACATGGGCAGTGCAA
At1g44740	TCGGCTGGCCAAAAGAAATA	TCGACCTCTCCTTGGCCTAG
At1g45616	GGAGATATCCACGCGCCTAG	TGATGAATGAGGCAGTACGGC
At1g51190	CAACACAAGTGGAGGAGCCA	TCCAAAGTCCGTCTCGGTG
At1g68840	CACGCCGAGAAACACTTTC	TTTAGTCACTGCCGGTGACG
At1g80440	GATGCTGATTGTGATCGGCA	GCTTCACCGTATCCAGCCAA
At2g20670	CTCCGACGACGTTCTTTTCG	TCCGGTGACTGGTTTCCTTC
At2g26530	CTTCTCCGACCGTCTTACGG	GTGCCTGGAGTCTCTTCCCA
At2g40000	TCACCGTTCAAAATCGTCCC	AGGTGCTGAACATGAGATCGG
At2g44130	TTGGTCAGAGTCCGTTCCAA	ACGGCAAACGGATCTCATG
At3g09870	AGCGAGAGAGGAATTCGGGT	CATGGGATGGTCAGAGGTCC
At4g11280	ATCCGCGAGAGCAAATTGC	GGTGGTTATCTCAGCGTGCC
At5g21940	CGTCTCAGTCGCTTGGGT	CAGCCACCAGAAACGATCTC
At5g56550	TCTCCAAGAAACCAACAGAACA	TGGCTAGACAAGAGAGAACAGAGGA
At3g22235	GTT TCA GTT CCT CAC GCA TTG	GGG TAA CCC GTA ATC CAT TCA C
At3g22240	ATG GTT TTT GGA AAG GAT GTT	CAT CCA GGA CAC AAC AGC AGC

Tabla I. Oligonucleótidos específicos diseñados con el programa Primer Express para qRT-PCR.

Análisis Southern. PCR semicuantitativa.

Partiendo de las RT de cada una de las muestras a analizar, se realizaron las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen final de 20 µl empleando los componentes indicados anteriormente y repitiendo el mismo programa de tiempos y temperaturas indicado para cada pareja de cebadores específicos (ver tabla II) durante 25 ciclos. Para normalizar los valores obtenidos para cada gen, se utilizó el gen *UBIQUITINA 10*. La mezcla con los oligonucleótidos específicos para este gen se añadió al finalizar el quinto ciclo de la PCR anterior, evitando así su saturación. Antes de transferir el DNA a la membrana procedimos a desnaturalizarlo sumergiendo el gel en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente en una solución que contenía NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M. Seguidamente se neutralizó manteniendo el gel en agitación durante 20 minutos en una solución de NaCl 1,5 M y Tris-HCl 1 M, pH 8,0, a temperatura ambiente. Tras lavar y equilibrar el gel con una solución 20 x SSC se transfirió a la membrana por capilaridad.

Gen	Directo (5'→3')	Reverso (5'→3')
<i>ICS1</i>	GGTGTCTGCAGTGAAGC	CGTCCCGCATAATTCC
<i>FT</i>	ACTATAGGCATCATCACCCTTCGTTACTCG	ACAACCTGGAACAACCTTTGGCAATG
<i>UBQ10</i>	GATCCTTTGCCGAAACAATTGGAGGATGGT	CGACTTGTCAATTAGAAAAGAAAGATAACAGG
<i>PCC1</i>	CAGAATGAATCAATCCGCGC	ATACGCCGCAGCAGAAGATA
<i>CCA1</i>	CTTCCACGGGAAGAGGGAAGTCA	TCACTCTCAGGTGTTGCAGAAGGCT
CO	ACGCCATCAGCGAGTTCC	AAATGTATGCGTTATGGTTAATGG

Tabla II. Oligonucleótidos específicos empleados en RT-PCR semicuantitativa.

Análisis Northern.

Para el análisis Northern, a las muestras de RNA (10 µg) se les añadió 10 µl de formamida, 2,5 µl de tampón 10 x MEN (MOPS 200 mM, acetato sódico 50 mM y EDTA 20 mM, pH 7,0), 3 µl de formaldehído y bromuro de etidio (1 µl, de una solución de 10 mg/ml, por cada 10 muestras). Antes de cargarlas en el gel, las muestras se desnaturalizaron durante 10 minutos a 60° C. La separación de los RNAs se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (1,5 %) con formaldehído según se describe en Sambrook *et al.* (1989).

Transferencia de DNA y RNA a membrana.

Tanto el DNA como el RNA se transfirieron a membrana de nailon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech) por capilaridad utilizando 20 x SSC y se dejó transfiriendo entre 16 y 20 horas. Una vez finalizada la transferencia, los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana mediante entrecruzamiento con luz UV-C (200 mJ/cm²) utilizando una cámara de irradiación UV-C de Amersham Pharmacia Biotech (San Francisco, CA, USA).

Marcaje e hibridación de sondas radiactivas.

Las sondas de DNA se marcaron radiactivamente utilizando el sistema "Rediprime" con cebadores aleatorios, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Amersham Pharmacia Biotech) y utilizando α-(³²P) dCTP. Para marcar la sonda de *PCC1* se empleó su cDNA completo, un fragmento de 246 bp, mediante la digestión con *EcoRI/SalI* del clon U12683, obtenido del Arabidopsis Biological resource center (ABRC). La sonda de *JR2* se obtuvo a partir de un plásmido en pUC19 que contiene un fragmento de

1,3 kb clonado en *EcoRI* (procedente del laboratorio del Dr. J.J. Sánchez-Serrano). La sonda de *PR1* procede de un plásmido en pBS donde el cDNA de *PR1* está clonado en *EcoRI/XhoI* (donado por la Dra. L. Friedrich). El resto de sondas empleadas en esta tesis son fragmentos del cDNA de cada gen obtenidas mediante RT-PCR, empleando para cada una de ellas los oligonucleótidos específicos de cada gen (ver tabla III).

Antes de hibridar la membrana con la sonda radiactiva se prehibridó durante un tiempo mínimo de 3 horas a 42° C con una solución que contenía tampón fosfato 0,25 M pH 7,2, NaCl 0,25 M, SDS 7 % (p/v), EDTA 1 mM pH 8,0, 10 % PEG 6000, 100 µg/ml de DNA desnaturalizado de esperma de salmón y 50 % de formamida (Amasino, 1986). La hibridación de la membrana con la sonda radiactiva se realizó durante toda la noche a 42° C y con agitación continua en horno de hibridación. Tras la hibridación, las membranas se lavaron con 3 x SSC y 0,5 % de SDS a temperaturas crecientes de 42° C, 55° C y 62° C. Una vez lavadas, se envolvieron en membrana de plástico y se introdujeron en un casete al que se le colocó una película Hyperfilm (Amershan Pharmacia Biotech). Tras el tiempo de exposición oportuno a - 80° C, la autorradiografía se reveló mediante una procesadora automática (M-35-X-OMAT, de Kodak). Para cuantificar las señales marcadas radiactivamente, las membranas se colocaron en un casete Fujifilm con placa de imágenes Bas-IP, MP 2040S (20 x 40cm), analizándose con el equipo “Bio-imaging analyzer” BAS-1500 de Fujifilm y utilizando el software Image Reader v 1.3.

Gen	Fragmento cDNA
<i>ICS1</i>	374 bp
<i>FT</i>	364 bp
<i>UBQ10</i>	484 bp
<i>PCC1</i>	cDNA completo
<i>PR1</i>	cDNA completo
<i>JR2</i>	1,3 kb
<i>CCA1</i>	653 bp
<i>CO</i>	479 bp

Tabla III. Fragmentos de cDNA empleados en el marcaje de las distintas sondas.

5) Manipulación de microorganismos.

Obtención y transformación de células competentes de Escherichia coli.

Para la obtención de células competentes DH5 α de *Escherichia coli* para transformación por choque térmico, se inoculó una colonia de células DH5 α en 1 ml de medio LB incubándose durante toda la noche a 37° C en agitación. Para obtener mayor cantidad de solución bacteriana se incubaron 500 μ l del precultivo en 100 ml de LB durante 3 horas a 37° C en agitación. El cultivo resultante se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 minutos y a una temperatura de 4° C, resuspendiendo el sedimento obtenido en 20 ml de CaCl₂ 50 mM frío. Esta suspensión se mantuvo en hielo durante tres horas al cabo de las cuales se centrifugó durante 10 minutos a 5000 r.p.m. y 4° C. Por último, el sedimento bacteriano se resuspendió en 10 ml de una solución de CaCl₂ 50 mM-15 % de glicerol, para su almacenaje se repartió en tubos eppendorf (200 μ l por tubo), que se mantuvieron 5 minutos en N₂ líquido y se guardaron a - 80° C hasta el momento de su uso.

La transformación de células competentes DH5 α mediante choque térmico se llevó a cabo según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Las células competentes se descongelaron en hielo, donde permanecieron aproximadamente 20 minutos, al cabo de los cuales y tras añadir el plásmido de interés, se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se sometieron a choque térmico permaneciendo a 42° C durante 30 segundos, añadiendo después 0,8 ml de medio LB suplementado con 2 % (v/v) de glucosa 1 M y 1 % (v/v) de Cl₂Mg 1 M e incubándolo durante 1 hora a 37° C y en agitación a 1400 r.p.m. Finalmente, se sembraron en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados según el tipo de plásmido utilizado, e incorporando al medio el sustrato cromogénico X-Gal y el inductor IPTG en caso de ser necesario. Las placas se incubaron toda la noche a 37° C.

Para la obtención de células competentes DH5 α de *Escherichia coli* para transformación por electroporación se inoculó una colonia de células DH5 α en 1 ml de medio LB incubándose durante 3 horas a 37° C en agitación, tras las cuales se incubaron 10 μ l del precultivo en 5 ml de LB durante toda la noche en agitación a 37° C. A 500 ml de LB se añadió el precultivo y se mantuvo a 37° C en agitación hasta una A_{600nm} entre 0,5 y 0,7. Se enfriaron las células en hielo durante 30 minutos. El cultivo resultante se centrifugó a 5250 r.p.m. durante 15 minutos a una temperatura de 4° C y se resuspendió el sedimento

obtenido en 500 ml de glicerol al 10 % frío. Para concentrar el cultivo bacteriano, se volvió a centrifugar 3 veces en las condiciones anteriores resuspendiendo el sedimento obtenido cada vez en volúmenes decrecientes de glicerol al 10 % frío (250, 10 y 1,5 ml). Para su almacenaje se repartió en tubos eppendorf (40 µl por tubo), que se mantuvieron 5 minutos en N₂ líquido y se guardaron a - 80° C hasta el momento de su uso.

Para la transformación de células competentes DH5α por electroporación utilizando el electroporador 2510 de Eppendorf, una vez se descongelaron en hielo las células competentes, se añadió el plásmido de interés y se incubaron en hielo dentro de la cubeta de electroporación, seguidamente se da un pulso de corriente de 1800 V, se añade 1 ml de LB a la cubeta y se deja incubando 1 hora a 37° C en agitación. Por último, el cultivo se sembró en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados según el tipo de plásmido utilizado, e incorporando al medio el sustrato cromogénico X-Gal y el inductor IPTG en caso de ser necesario. Las placas se incubaron toda la noche a 37° C.

Obtención y transformación de células competentes de Agrobacterium tumefaciens.

Para la obtención de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* C58PMP90, se preparó un precultivo procedente de una colonia de una placa reciente en un matraz de 100 ml que contenía 5 ml de LB suplementado con el antibiótico rifampicina (50 mg/L), manteniéndolo en agitación (220 r.p.m.) durante toda la noche a 28° C. El precultivo se transfirió posteriormente a un matraz de 1 litro que contenía 200 ml de LB con rifampicina, manteniéndolo en agitación a 28° C durante aproximadamente 5 horas. El cultivo resultante se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 minutos y a 4° C, resuspendiéndolo posteriormente en 100 ml de tampón TE (Tris 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM). La suspensión bacteriana se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 minutos y a 4° C, resuspendiéndola en 10 ml de LB. Esta suspensión se repartió en partes alícuotas en tubos eppendorf (500 µl por tubo), que se congelaron en N₂ líquido y se mantuvieron almacenados a - 80° C hasta el momento de su uso.

Para transformar las células competentes de *Agrobacterium*, se descongeló una alícuota en hielo a la que se le añadió entre 0,1 y 1 µg del DNA plasmídico de interés. A continuación, las células se mantuvieron 5 minutos en hielo, al cabo de los cuales se pasaron a N₂ líquido donde estuvieron 5 minutos más, incubándolas finalmente a 37° C durante otros 5 minutos. Después, y tras añadir 1 ml de medio LB, las células se incubaron

a 28° C durante una hora en agitación, sembrándolas finalmente en medio LB con el antibiótico de selección adecuado. Estas placas se incubaron a 28° C durante dos días.

Aislamiento, purificación y digestión de plásmidos bacterianos.

Para la obtención de DNA plasmídico a media escala, se inoculó una colonia en 100 ml de medio LB con el antibiótico adecuado, cultivándose en agitación a 250 r.p.m. y 37° C durante toda la noche. Para aislar el DNA plasmídico se siguió el protocolo de purificación de plásmidos de QIAGEN, que se fundamenta en un procedimiento de lisis alcalina, seguido por la unión del DNA plasmídico a resinas de intercambio aniónico bajo condiciones de baja concentración de sales y pH adecuado. Mediante lavados con concentraciones medias de sal se elimina RNA, proteínas e impurezas de bajo peso molecular. El DNA plasmídico se recupera mediante un tampón con elevada concentración de sales y posteriormente, se concentra y eliminan las sales mediante una precipitación con isopropanol. Para el aislamiento de DNA plasmídico de cultivos de *A. tumefaciens*, el sedimento bacteriano se resuspendió en 100 µl de un tampón de lisis frío (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0, sacarosa al 20 % (p/v) y 4 mg/ml de lisozima), manteniéndolo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 200 µl de una solución compuesta por NaOH 0,2 M y 1 % de SDS que se mezclaron y se dejaron 10 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo se añadieron 150 µl de acetato sódico 3 M, pH 4,8, mezclándolo bien y dejándolo 30 minutos en hielo. Tras centrifugar durante 7 minutos, se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo al que se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1, se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 2 minutos. Una vez finalizada la centrifugación se separó la fase superior. Tras repetir la extracción fenólica 2 veces más, al extracto acuoso obtenido se le añadió 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M, pH 4,8 y dos volúmenes de etanol 100 % para precipitar el DNA. Se mantuvo 30 minutos a - 20° C, se centrifugó durante 15 minutos, se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70 % (v/v) y se centrifugó 3 minutos más. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, se secó el precipitado a temperatura ambiente entre 20 y 30 minutos y se resuspendió en 20 µl de agua.

La digestión del DNA con enzimas de restricción se hizo atendiendo las especificaciones del proveedor (MBI Fermentas), durante un tiempo mínimo de 2 horas y

máximo de 24, y a la temperatura adecuada para cada enzima. Las reacciones se detuvieron mediante inactivación térmica de las enzimas a 70° C durante 10 minutos.

6) Generación de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

Generación de las construcciones.

Las construcciones que se realizaron fueron: **a) 35S:PCCI**, en la que el cDNA completo de *PCCI* (246 bp) en orientación sentido se clonó en el vector binario BinA7, bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador de la octopina sintasa, que contiene el gen que confiere resistencia a kanamicina para la selección en planta; **b) RNAi PCCI**, en la que se realizó la construcción aislando el casete que contenía la región donde se insertaron las 2 copias de cDNA y la horquilla de separación mediante digestión con *XhoI/HindIII* del vector pGSA1285 y se clonó en el vector pBluescript SK+. Tras subclonar 2 copias del cDNA completo de *PCCI* en orientación sentido y antisentido en el vector pBluescript SK+ modificado, se aisló la construcción completa digiriendo con *KpnI/XbaI* y se clonó en el vector BinA7, bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador de la octopina sintasa, que contiene el gen que confiere resistencia a kanamicina para la selección en planta. En la amplificación del cDNA completo de *PCCI* se utilizaron oligos degenerados que introducían sitios de corte en la secuencia amplificada para clonar en el vector pBluescript SK+ dirigiendo la orientación del inserto.

SpeAscPCC1F → 5' gga cta gtg gcg cgc cat gaa tca atc cgc gc 3'

BamSwaPCC1R → 5' ggg gat cca ttt aaa tct ctg atg tac aga gg 3'

Transformación de *Arabidopsis thaliana*.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo silvestre Columbia (Col-0), y los mutantes *fve-3* y *co-1* se transformaron mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*, transformado con cada una de las construcciones 35S:PCCI y RNAi PCCI. El protocolo de transformación que se siguió fue el de infiltración a vacío de las inflorescencias (Bechtold y Pelletier, 1998).

Análisis genético para la identificación de plantas homocigotas.

Las semillas obtenidas de las plantas infiltradas con *Agrobacterium*, transformado con las construcciones *35S:PCC1* y *RNAi PCC1*, se sembraron en placas Petri conteniendo medio MS suplementado con 50 mg/L de kanamicina. El proceso de selección es muy sencillo ya que las plantas que no poseen el gen *NPTII* de detoxificación para la kanamicina sufren un retraso en el crecimiento, con escaso desarrollo radicular y cotiledones que no adquieren la coloración verde característica, muriendo finalmente sin haber desarrollado las primeras hojas verdaderas. Los transformantes (T1), resistentes a kanamicina, se transplantaron a tierra, se autofecundaron y cinco semanas después se recogieron las semillas que se sembraron de nuevo en placas Petri con medio MS suplementado con kanamicina, a fin de analizar la segregación en la generación T2. La selección de las líneas con una sola integración del transgen se fundamenta en la elección de la descendencia (T2) que se ajuste a una segregación 3(Kan+):1(Kan-), según las leyes mendelianas para un solo gen dominante, constituyendo cada uno de los transformantes y su descendencia una línea. Aquellas de las que se obtuvo una descendencia (T3) con el 100 % de plantas resistentes a kanamicina, constituyeron las líneas homocigotas y fueron seleccionadas para realizar estudios fenotípicos y moleculares. Con objeto de identificar la presencia del transgén y del gen endógeno, y cuantificar la cantidad aproximada de los mismos en las diferentes líneas generadas, se llevaron a cabo análisis qRT-PCR. Para ello, se emplearon los oligos qPCC1-1R y qPCC1-1F que detectan el transgén en las líneas de sobreexpresión y los oligos qPCC1-2R y qPCC1-2F en las líneas de *RNAi PCC1* que sólo detectan el transcrito endógeno.

qPCC1-1F → 5' tat gga gtg tat ctt ctg ctg cg 3'

qPCC1-1R → 5' tct gat gta cag agg ctg gag c 3'

qPCC1-2F → 5' tgc tcc agc ctc tgt aca tca 3'

qPCC1-2R → 5' cga ctt ctg tct cat cat gct ga 3'

7) Análisis fenotípico de las líneas transgénicas generadas.

Una vez identificadas las líneas que mostraban niveles reducidos del transcrito endógeno, en el caso de las líneas *RNAi PCC1*, y una fuerte acumulación del transgén, en el caso de las líneas de sobreexpresión, se procedió a realizar un estudio fenotípico de las

mismas, comparadas con plantas silvestres no transformadas como control. Se analizaron los tres parámetros siguientes: el tiempo de floración en presencia y ausencia de estrés por luz UV-C, la senescencia inducida por oscuridad y la resistencia frente a bacterias fitopatógenas biotrofas *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

El tiempo de floración se calculó mediante el recuento del número total de hojas, las de la roseta más las caulinares, a la subida a flor de la planta, parámetro que en *Arabidopsis* se ha demostrado que es proporcional al tiempo de floración (Koornneef *et al.*, 1991). Esto se hizo tanto en ausencia como en presencia de estrés.

Para analizar la senescencia de las líneas transgénicas se realizaron experimentos de senescencia inducida por oscuridad, con hojas de roseta escindidas de plantas con aproximadamente entre 3 y 4 semanas, que se mantenían en condiciones de alta humedad en placas Petri, en oscuridad total. Las hojas correspondientes a las diferentes líneas transgénicas comparadas con las plantas control no transformadas, se fotografiaron a los 0, 3, 5, 7 y 11 días de iniciar el experimento.

Con objeto de cuantificar la resistencia de las líneas generadas frente a *Pseudomonas syringae*, se inocularon las plantas mediante inmersión en una suspensión bacteriana y posterior cuantificación del crecimiento bacteriano por comparación del contenido en bacterias inmediatamente después de la inoculación y a las 72 horas de la inoculación.

8) Cuantificación de los niveles de ácido salicílico.

La determinación de los niveles de SA (Yalpani *et al.*, 1994) se hizo a partir de muestras de 0,5 g de hojas de roseta (3 réplicas) en cada una de las muestras a analizar. Para obtener los extractos de SA, las muestras se trituraron en N₂ líquido y tras hacer una extracción metanólica se secaron a vacío. Una vez secas se resuspendió el residuo en 1 ml de ácido tricloroacético al 5 %, se decantó el sobrenadante y seguidamente se realizó una doble extracción orgánica añadiendo 1 ml de una mezcla de disolventes orgánicos (etilacetato:ciclopentano:isopropanol en una proporción 100:99:1). La fase acuosa se secó a vacío en Speed Vac SPD121P de Thermo Savant y el residuo se resuspendió en metanol al 55 %.

En el análisis por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) en fase reversa, se utilizó como eluyente un gradiente de concentraciones de ácido acético (HAc)-metanol (MeOH) durante los primeros 20 minutos con un porcentaje de concentración decreciente de 100 % a 0 % en HAc y un porcentaje creciente de 0 % al 100 % en MeOH, seguidos de 10 minutos de MeOH al 100 %. El sistema tenía acoplado un detector de fluorescencia funcionando a $\lambda_{\text{excitación SA}} = 313\text{nm}$ y $\lambda_{\text{emisión SA}} = 405\text{nm}$. Para determinar el contenido en SA de las muestras se utilizó una curva patrón que estableció una relación entre área de pico al tiempo de retención del SA y su concentración. El rango de concentraciones de SA en la curva patrón va de 0,02 a 1 μg . Obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,9969.

9) Detección de la actividad β -glucuronidasa.

Para la detección *in situ* de la actividad β -glucuronidasa se infiltraron a vacío los tejidos frescos durante 20 minutos en una solución que contenía 0,5 mg/ml de X-glucA (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido), Tritón X-100 (0,01 %, v/v) y ferrocianuro y ferricianuro de potasio 0,5 mM, todo ello en tampón fosfato 80 mM a pH 7,2 e incubándolo a 37° C entre 10 y 16 horas. Posteriormente, los tejidos se destiñeron mediante lavados sucesivos con etanol al 70 % (v/v). Una vez destiñidos, se observaban con una lupa SMZ 800 (Nikon) registrando las imágenes mediante una cámara Colorview 12 (SIS) y procesando las imágenes mediante el programa Analysis (SIS).

10) Análisis transcriptómico mediante micromatrices de oligonucleótidos.

Se extrajo el RNA total procedente de cuatro experimentos independientes de plántulas deficientes en SA (*nahG*, *sid2-1* y *eds5-3*) y el ecotipo silvestre Col-0, cultivadas *in vitro* en condiciones axénicas durante 10 D.L. y recogidas a las 5 horas de luz del décimo día. El RNA total se aisló y purificó utilizando el sistema de Purificación Micro-to-Midi de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Los RNAs se amplificaron y se marcaron con Cy3 y Cy5.

Para el análisis de micromatrices, se utilizó la colección de oligonucleótidos 70-meros proveniente de Qiagen-Operon impresa en cristales Telechem tratados con superamina aminosilano como se describe en (<http://ag.arizona.edu/microarray/methods.html>). Las micromatrices se hibridaron en el Servicio de Transcriptómica de la Unidad de Genómica del C.N.B. (Centro Nacional de Biotecnología); (<http://www.cnb.uam.es/%7Egenomica/>) y se analizó con el programa GenePix Pro (http://www.axon.com/GN_GenePixSoftware.html). El análisis estadístico se realizó mediante el programa Solar System de Bioalma (Madrid; <http://www.almabioinfo.com/>).

11) Aplicaciones bioinformáticas.

Las herramientas bioinformáticas que se han utilizado en la presente Tesis han sido:

- TAIR (Arabidopsis Information Resource; <http://www.Arabidopsis.org>): búsqueda de toda aquella información relacionada con el genoma de Arabidopsis.
- Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>): para realizar alineamientos entre varias secuencias.
- Nucleotide Blast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): para comparación de secuencias de nucleótidos en el NCBI.
- Protein Blast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): para comparación de secuencias de aminoácidos en el NCBI.
- Genevestigator (<http://genevestigator.ethz.ch/>): para la búsqueda de información de patrones de expresión de los genes de interés. Contiene datos de experimentos realizados con micromatrices de oligonucleótidos.
- Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align>): Para comparar 2 secuencias entre sí.

Resultados

Resultados

1) Correlación entre niveles endógenos de Ácido Salicílico y transición floral.

SA ha sido caracterizado como una molécula con actividad reguladora en procesos de defensa de plantas frente a patógenos biotrofos. En concreto, SA es un componente esencial en la ruta de señalización que conduce a la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR), por la cual una planta, tras una infección patogénica primaria, se hace más resistente a siguientes ataques de patógenos (Malamy *et al.*, 1990; Delaney *et al.*, 1994; Reymond y Farmer, 1998; Glazebrook *et al.*, 2001). Además de esta función reguladora de defensa, también se propuso que SA podría regular la floración en plantas (Cleland, 1974; Cleland y Ajami, 1974; Goto, 1981). Sin embargo los mecanismos por los que SA actuaría como inductor de la floración no se conocen. En los últimos años, se ha propuesto que SA es un regulador de la transición a la floración en plantas de *Arabidopsis thaliana*, ya que mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes tanto en la síntesis como en la acumulación de SA florecen más tarde que plantas silvestres en condiciones fotoperiódicas de días largos inductoras de la floración (Martínez *et al.*, 2004). El fenotipo de floración tardía de los mutantes deficientes en SA sugiere que pudieran ser cambios en los niveles endógenos de SA los que regulen la transición a la floración. Por otro lado, la irradiación con luz UV-C de plántulas da lugar a floración acelerada en plantas Col-0 pero no en plantas nahG incapaces de acumular SA, lo que indica que la floración acelerada en respuesta a estrés causado por la irradiación con luz UV-C se correlaciona directamente con el aumento en los niveles endógenos de SA (Martínez *et al.*, 2004).

Con el objeto de establecer una relación entre los niveles endógenos de SA y el tiempo de floración, exploramos la conexión entre cambios en los niveles endógenos de SA o de algún evento relacionado con esta molécula en plántulas durante el periodo en que se da la transición de la fase vegetativa a reproductiva. El cambio de fase de desarrollo ocurre en un grupo de células que constituyen el meristemo apical del tallo. De ser este tejido la diana donde el SA regularía dicha transición deberíamos determinar cambios en el contenido de SA específicamente en el meristemo apical. La determinación de SA en una localización tan específica utilizando los métodos analíticos tradicionales resulta

impracticable. Para detectar pequeños y localizados cambios en los niveles endógenos de SA hemos utilizado plantas transgénicas (*pBGL2:GUS*) en las que el gen testigo *GUS* que codifica la β -glucuronidasa se encuentra bajo el control del promotor del gen *β -glucanasa 2* (*BGL2*) inducible por SA (Dong *et al.*, 2001). Se recogieron muestras cada día durante dos semanas de plantas *pBGL2:GUS* cultivadas en condiciones de días largos (dieciséis horas de luz y ocho horas de oscuridad) para analizar la expresión del gen *GUS*. En los ocho primeros días tras la siembra no se detectó el transcrito de *GUS*. El noveno día empezó a detectarse acumulación del transcrito *GUS* y se observó una fuerte inducción del transgen al día diez para luego decaer (Fig. 1 a). Se realizó un segundo análisis acotando el intervalo temporal que corroboró el décimo día tras la siembra como el día en que se da una mayor inducción del transgen *GUS*. La inducción máxima se alcanzó entre las cuatro y las ocho horas desde el comienzo de la fase de luz del décimo día (Fig. 1 a). Para analizar si los cambios en los niveles observados del transgen *GUS* ocurren en los tiempos indicados sólo en condiciones inductoras de la floración, se cultivaron plantas *pBGL2:GUS* en condiciones fotoperiódicas de días cortos no inductoras de la floración. Una vez las plantas tuvieron alrededor de 15 hojas de roseta se transfirieron a condiciones fotoperiódicas de día largo inductoras de la floración. Se recogieron muestras a distintos tiempos después de la transferencia a días largos y se analizó la actividad *GUS*, mediante tinción con el sustrato cromogénico X-gluc, de los ápices de las plantas. Se detectó un incremento en la actividad *GUS* alrededor del día diez desde la transferencia de las plantas a condiciones inductoras (Fig. 1 b). Este incremento se vió acompañado de la inducción de la expresión del gen *ICS1/SID2* (Fig. 1 b), que codifica la isocorismato sintasa 1 encargada de sintetizar SA en *Arabidopsis* (Wildermuth *et al.*, 2001), así como de la expresión del gen activador de la floración *FT* (Fig. 1 b). En estas plantas, el tejido vascular y las células situadas inmediatamente por debajo del meristemo apical mostraron una fuerte tinción constitutiva en todos los tiempos analizados que se incrementó al décimo día tras el cambio de condiciones fotoperiódicas (Fig. 2). Un incremento en los niveles de SA en el meristemo apical y en el tejido vascular puede ser indicativo de un incremento de su síntesis en dicha localización o bien de un incremento de la síntesis en las hojas y de su posterior transporte a través del tejido vascular hasta el ápice. Al analizar los niveles endógenos de SA en las hojas antes y después de la transferencia de las plantas cultivadas en días cortos a días largos, se detectó que el contenido basal de SA libre en plantas cultivadas en días cortos es muy bajo y se duplica en los 10 primeros días después de la transferencia a condiciones

inductoras (Fig. 1 c). A partir de entonces el contenido en SA de las hojas tiende a estabilizarse en torno a 130 ng/g de peso fresco de hojas (Fig. 1 c).

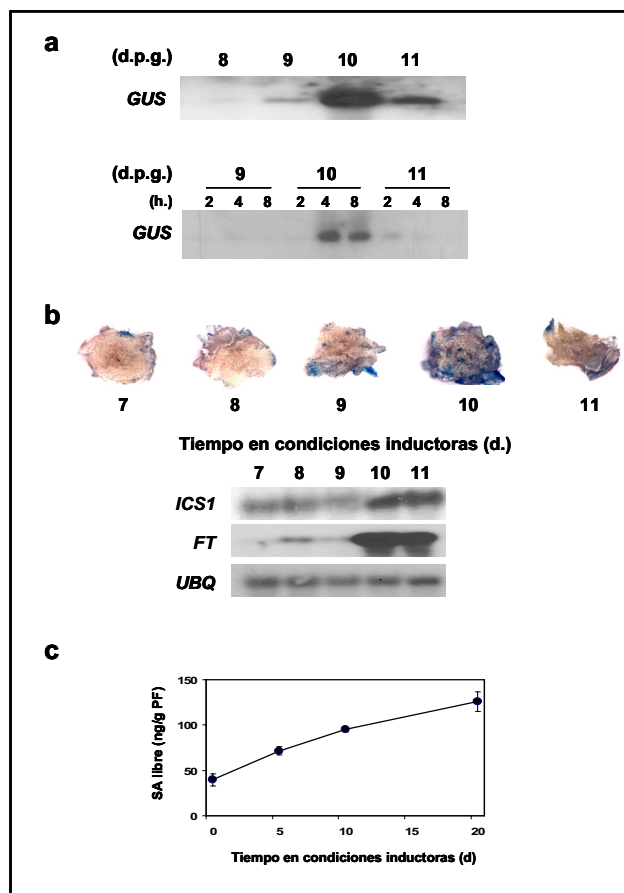


Figura 1. Cambios en el contenido basal de SA se correlacionan temporalmente con la transición del estado vegetativo a reproductivo.

(a) Los niveles del transcrito *GUS* fueron analizados por RT-PCR utilizando un oligo reverso específico de *GUS* para la retrotranscripción del RNA. El RNA se aisló de plantas *pBGL2:GUS* cultivadas en condiciones de día largo. Cuando se indica, las muestras se recogieron a distintos días tras la germinación (d.p.g.) o a distintas horas desde el amanecer (h) en condiciones de D. L. (b) Plantas *pBGL2:GUS* se cultivaron en condiciones de días cortos y con 15 hojas de roseta se transfirieron a condiciones de días largos. A distintos tiempos en condiciones inductoras se cortaron los ápices y se tiñeron para medir la actividad GUS. Los niveles de transcrito de *ICS1* y *FT* se analizaron por RT-PCR a partir de RNA total aislado de ápices a los distintos tiempos que se indican. Los niveles de transcrito del gen *ubiquitina 10 (UBQ)* se incluyeron para normalizar los resultados. (c) Cuantificación de SA libre en hojas de plantas a distintos días tras transferir las plantas a condiciones inductoras de la floración. SA se analizó por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una curva patrón para estimar la concentración en cada muestra. Los puntos representan el contenido medio de SA en nanogramos por gramo de peso fresco de cuatro réplicas. Las barras de error representan el error estándar.

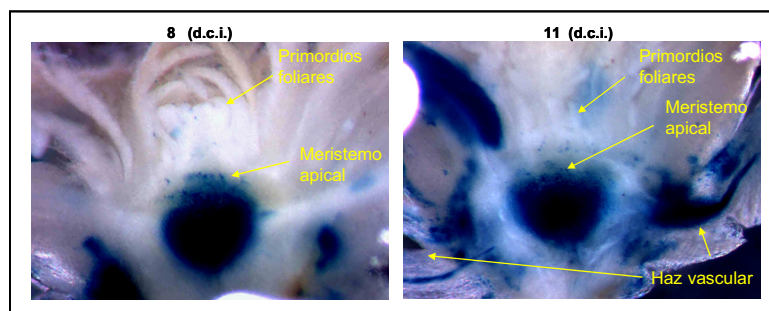


Figura 2. Análisis de la expresión GUS en plantas cultivadas en día corto.

Plantas *pBGL2:GUS* se cultivaron en condiciones de días cortos y con 15 hojas de roseta se transfirieron a condiciones de días largos. A distintos tiempos en condiciones inductoras se cortaron los ápices y se tiñeron para medir la actividad GUS. Una vez teñidos, se realizó un corte longitudinal para ver su expresión en los diferentes tejidos.

2) Análisis transcriptómico comparado de plantas deficientes en Ácido Salicílico y plantas silvestres durante la transición floral.

Partiendo de que mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en SA poseen fenotipo de floración tardía (Martínez *et al.*, 2004) y en base al cambio en la expresión del gen *BGL2* inducible por SA que se detecta el día décimo tras la siembra (Fig. 1), se compararon los transcriptomas de plantas *sid2-1*, *eds5-3* y *nahG* deficientes en SA con plantas silvestres Col-0 cultivadas durante diez días largos. Con esta estrategia se pretendía identificar genes cuya expresión esté regulada por SA y que muestren una expresión diferencial en la ventana temporal en la que se produce la transición del estado vegetativo a reproductivo. Se trataría de identificar potenciales activadores de la floración inducidos por SA (genes que en la ventana temporal descrita estén menos expresados en plantas deficientes en SA) o potenciales represores de la floración reprimidos por SA (genes más expresados en plantas deficientes en SA).

La estrategia para el experimento de comparación de los transcriptomas está basada en la comparación de plantas Col-0 frente a *nahG*, Col-0 frente a *sid2-1* y Col-0 frente a *eds5-3*, consideradas como réplicas biológicas de una comparación Col-0 frente a plantas deficientes en SA. De esta manera se identificarían genes diferencialmente expresados en

todos los genotipos deficientes en SA en las condiciones ensayadas, por lo tanto, se descartaron genes diferencialmente expresados sólo en algunos de los mutantes y se seleccionaron aquellos que están relacionados con el problema biológico de estudio. Este análisis se realizó con muestras recogidas al tiempo en que previamente identificamos que se daban los cambios en los niveles endógenos de SA en nuestras condiciones experimentales, es decir a las 5 horas de luz del décimo día tras la siembra.

El transcriptoma de cada genotipo deficiente en SA fue comparado con el silvestre Col-0 por hibridación de cada micromatriz de oligonucleotidos con las correspondientes sondas complejas marcadas con Cy3 y Cy5, respectivamente. Los datos obtenidos se filtraron con un criterio de inducción o represión $> |2|$, intensidad de señal > 100 , valor de $p < 0.005$ y z score $> |2|$ dando como resultado 15 genes diferencialmente expresados de los que 13 genes mostraron mayor expresión en los genotipos deficientes en SA y 2 genes mostraron menor expresión en los genotipos deficientes en SA cuando se compararon con plantas Col-0 (Tabla 1). El grupo de 13 genes más expresados en plantas deficientes en SA estuvo compuesto por dos genes que codifican proteínas con dominio AP2, dos genes que codifican proteínas tipo F-box con repeticiones de motivos Kelch, tres genes que codifican componentes relacionados con la señalización de defensa frente a patógenos, el gen *AtACS6* que codifica una enzima de la síntesis de etileno, un gen de respuesta a auxinas, y cuatro genes que codifican proteínas de función desconocida. Los dos genes menos expresados en plantas deficientes en SA codifican proteínas relacionadas con defensa frente a patógenos, un gen de resistencia del tipo LRR y el gen *Pathogen and Circadian Controlled 1 (PCC1)*, que se activa por patógenos y muestra una expresión basal regulada por el reloj circadiano (Sauerbrunn y Schlaich, 2004).

Tabla 1. Genes reprimidos e inducidos en el análisis transcriptómico de plantas deficientes en SA frente a plantas silvestres.

Ratio	log(2)r	D.E.	p	z	Código AGI	Anotación
-2.32	-1.22	0.17	0.00069	-7.42	At3g22231	PCC1
-2.24	-1.16	0.52	0.02142	-3.61	At1g45616	Proteína resistencia RPW8.
2.03	1.02	0.19	0.00163	7.21	At5g21940	Prot. expresada desconocida.
2.06	1.04	0.15	0.00076	7.22	At4g11280	ACC sintasa AtACS-6.
2.07	1.05	0.17	0.00120	7.48	At5g56550	Prot. expresada desconocida.
2.11	1.08	0.14	0.00055	7.04	At1g80440	Proteína F-box.
2.16	1.11	0.25	0.00298	5.97	At1g06560	NOL1/NOP2/prot. fam. SUN.
2.19	1.13	0.56	0.02771	8.02	At1g68840	RAV2 proteína unión a DNA.
2.20	1.14	0.18	0.00112	7.05	At2g44130	Proteína F-box.
2.30	1.20	0.37	0.00733	7.44	At1g44740	Proteína desconocida.
2.34	1.23	0.24	0.00209	8.63	At2g20670	Prot. expresada desconocida.
2.44	1.29	0.27	0.00246	8.97	At2g40000	Prot. resistencia nematodos.
2.53	1.34	0.58	0.01876	6.32	At2g26530	Receptor feromonas AR781.
2.59	1.37	0.23	0.00132	6.08	At3g09870	Proteína respuesta Auxinas.
2.71	1.44	0.87	0.04596	3.89	At1g51190	P. desarrollo óvulo dom AP2.

Los genotipos deficientes en SA están representados por cuatro réplicas biológicas independientes que contenían dos mezclas de plántulas nahG, una mezcla de plántulas *sid2-1* y otra mezcla de plántulas *eds5-3*. El genotipo Silvestre corresponde a cuatro mezclas independientes de plántulas Col-0 crecidas y recogidas como se describe en el procedimiento experimental. Los datos estadísticos se obtuvieron considerando cuatro réplicas de plantas deficientes en SA frente a cuatro réplicas de plántulas silvestres.

La aplicación de un factor de estrés como la irradiación con luz UV-C, además de activar la síntesis de SA, produce un adelanto del tiempo de floración en plantas silvestres pero no en plantas nahG ya que no acumulan el SA sintetizado porque lo metabolizan a catecol (Martínez *et al.*, 2004). Con el objeto de seleccionar un candidato a activador o represor de la floración de entre los 15 genes diferencialmente expresados en plantas deficientes en SA comparadas con plantas silvestres, se utilizó como criterio de selección que un gen que codificase un activador de la floración regulable por SA debería inducirse por luz UV-C en plantas Col-0 pero no en plantas nahG, mientras que un gen que codificase un potencial represor de la floración regulable por SA debería responder a la irradiación con luz UV-C reprimiendo su expresión en plantas silvestres y no en las plantas nahG. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del análisis de la expresión de dichos genes mediante RT-PCR cuantitativa en plantas Col-0 y nahG irradiadas o no con luz UV-C. De todos ellos sólo dos de los regulados al alza en plantas deficientes en SA, At1g44740 y At1g51190, se encuentran reprimidos por luz UV-C en plantas silvestres Col-0 pero no en nahG y uno de los regulados a la baja en plantas deficientes en SA, *PCCI*, activa fuertemente su expresión por irradiación con luz UV-C en plantas Col-0 pero no en plantas nahG (Tabla 2). Seleccionamos el gen *PCCI* como un candidato a codificar un activador de la floración dependiente de SA para una posterior caracterización molecular y funcional. Además, *PCCI* parecía un buen candidato a ser un regulador de la transición floral ya que relaciona defensa frente a patógenos, evento que requiere la síntesis de SA, con el reloj circadiano, un componente regulador básico de la transición floral a través de la vía de fotoperiodo.

Resultados

Tabla 2. Análisis RT-PCR cuantitativo de la expresión de genes en plantas Col-0 y nahG irradiadas con luz UV-C frente a plantas no irradiadas.

Código AGI	Expresión en plantas deficientes en SA	Col-0 Fold (UV /Control)	nahG Fold (UV /Control)
At1g06560	Inducida	2.28	0.72
At1g44740	Inducida	0.62	2.30
At1g45616	Reprimida	1.33	1.58
At1g51190	Inducida	0.54	2.29
At1g68840	Inducida	2.06	1.29
At1g80440	Inducida	1.25	1.40
At2g20670	Inducida	1.13	1.27
At2g26530	Inducida	5.11	1.22
At2g40000	Inducida	1.22	1.33
At2g44130	Inducida	0.96	1.00
At3g09870	Inducida	2.36	1.73
At3g22231	Reprimida	41.74	2.48
At4g11280	Inducida	2.23	2.74
At5g21940	Inducida	1.52	1.02
At5g56550	Inducida	0.91	1.53

Plantas Col-0 y nahG, cultivadas en condiciones de día largo durante 9 días, fueron irradiadas con luz UV-C a las 5 horas de luz o no irradiadas como control. El RNA total fue aislado de las muestras correspondientes 24 horas después de la irradiación. Las muestras irradiadas frente a las no irradiadas se analizaron por RT-PCR cuantitativa utilizando para cada gen los oligos específicos descritos en la Tabla II de Materiales y Métodos. Los niveles de los diferentes transcritos se normalizaron utilizando los niveles endógenos del transcrito *ACTINA 2/8*. El número AGI At3g22231 corresponde al gen *PCCI*.

3) Caracterización molecular de *PCCI*.

Antes de abordar la caracterización funcional de *PCCI*, procedimos a confirmar si su expresión es dependiente de SA. Se analizó la expresión de *PCCI* en respuesta a luz UV-C

y al tratamiento con SA en diferentes mutantes deficientes en SA. Los datos obtenidos muestran que la expresión de *PCC1* es estrictamente dependiente de la síntesis, acumulación y señalización de SA. La figura 3 a muestra que no se detectó acumulación del transcrito tras irradiación con UV-C ni en plantas mutantes en la síntesis de SA como *sid2-1* ó *eds5-3* (Nawrath y Métraux 1999; Wildermuth *et al.*, 2001), ni en plantas transgénicas *nahG* que no acumulan SA (Delaney *et al.*, 1995), ni tampoco en el mutante de señalización mediada por SA *npr1-1* (Dong *et al.*, 1991; Cao *et al.*, 1994). En cambio, tras aplicar SA exógeno los mutantes en la síntesis de SA *sid2-1* ó *eds5-3* tienen una acumulación normal del transcrito de *PCC1* y sólo en los mutantes en señalización de SA *npr1-1* y en las plantas transgénicas *nahG* que no acumulan SA no se detectó acumulación del transcrito (Fig. 3 b).

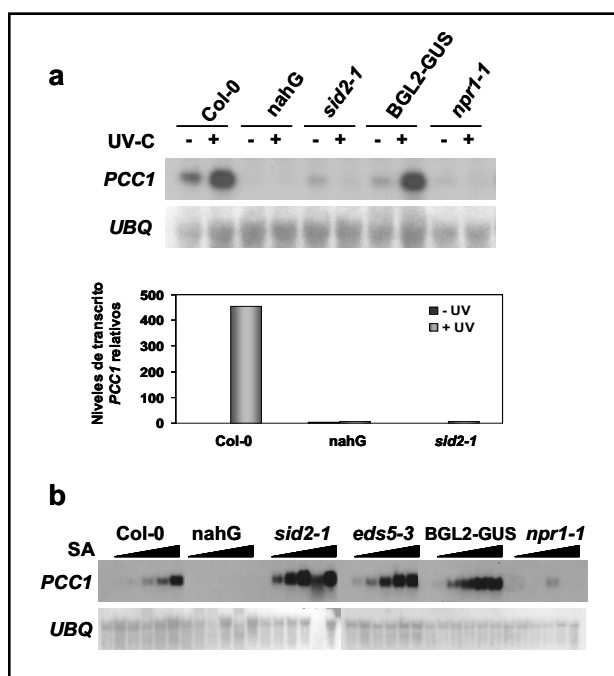


Figura 3. La expresión del gen *PCC1* se activa por irradiación con luz UV-C o aplicación exógena de SA.

(a) Plantas Col-0, *nahG* y las plantas mutantes que se indican fueron irradiadas (+) con 200 mJ cm⁻² de luz UV-C. En el panel superior, los niveles de transcrito se detectaron mediante Northern blot a partir de 10 µg de RNA total aislado, a partir de plantas irradiadas y sus correspondientes controles no irradiados (-), 24 horas después de la irradiación. El control de carga se realizó hibridando con una sonda de *ubiquitina 10* (*UBQ*). En el panel inferior los niveles de transcrito se detectaron mediante RT-PCR cuantitativa con oligos específicos para *PCC1* y *ACTINA 2/8* para normalizar los valores. (b) Northern blot a partir de 10 µg de RNA total aislado a partir de plantas tratadas con un gradiente de concentraciones de SA entre 0-250 µM. El control de carga se realizó hibridando con una sonda de *ubiquitina 10* (*UBQ*).

4) Conexión funcional entre PCCI y las diferentes vías de transición floral.

En *Arabidopsis* se han descrito distintas rutas que regulan la transición floral por diferentes factores. Se han identificado plantas mutantes afectadas en todas esas rutas y caracterizado algunos de los correspondientes genes. Para explorar la posible interacción entre *PCCI* y las rutas de floración descritas se analizó la expresión de *PCCI* en plantas Col-0 y mutantes en diferentes genes implicados tanto en la vía dependiente de fotoperiodo (*GI*, Park *et al.*, 1999; *CO*, Putterill *et al.*, 1995) como en la vía autónoma (*LD*, Lee *et al.*, 1994; *FCA*, Macknight *et al.*, 1997; *FVE*, Koornneef *et al.*, 1991), en genes integradores (*FT*, Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; y *SOCI*, Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000), ó en el gen *FLC*, caracterizado como un represor universal de la floración (Levy y Dean, 1998; Michaels y Amasino, 1999). La figura 4 muestra los niveles del transcrito de *PCCI* en plantas no irradiadas o 24 horas después de ser irradiadas con luz UV-C. En la figura 4 a, los mutantes en genes de la vía de fotoperiodo e integradores analizados excepto *co-1* acumularon transcrito de *PCCI* a niveles comparables a los detectados en plantas silvestres. Estos datos sugieren que tanto la expresión basal como inducida por luz UV-C requiere la función del gen *CO*, y además, que *PCCI* actuaría por debajo de *CO* en la ruta de señalización que conduciría a la floración dependiente de fotoperiodo. En la figura 4 b, todos los mutantes de la vía autónoma analizados acumularon transcrito de *PCCI* y los niveles basales de transcrito eran significativamente más elevados que en las plantas control. Se analizó también si la inducción de la expresión de *PCCI* podría ser dependiente de la función del represor de la floración *FLC*. La figura 4 c muestra que para activar *PCCI* mediante el tratamiento con SA no se requiere la función de *FLC* ya que se detecta acumulación del transcrito de *PCCI* en plantas mutantes *flc-3* (Michaels y Amasino, 2001) 24 horas después de ser tratadas con SA 100 μ M.

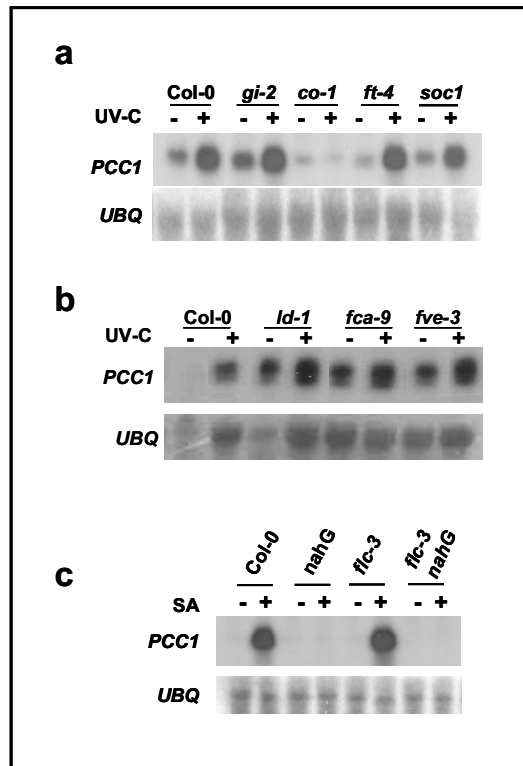


Figura 4. La activación de la expresión de *PCC1* requiere la función del gen de tiempo de floración *CO*.

Plantas Col-0 y los mutantes de la vía de fotoperiodo (a) y de la vía autónoma (b) fueron irradiados (+) con 200 mJ cm^{-2} de luz UV-C. (c) Plantas Col-0, *nahG*, el mutante *flc-3* y el doble *flc-3 nahG* se trataron con SA $100 \mu\text{M}$. Los niveles de transcrito de *PCC1* se detectaron mediante Northern blot a partir de $10 \mu\text{g}$ de RNA total aislado a partir de plantas irradiadas o tratadas y sus correspondientes controles no irradiados o tratados (-) 24 horas después de la irradiación o tratamiento. El control de carga se realizó hibridando con una sonda de *ubiquitina 10 (UBQ)*.

Puesto que la activación de la expresión de *PCC1* requiere la función del gen de tiempo de floración *CO*, y que al irradiar plantas con luz UV-C se activa la síntesis y señalización de SA y JA (Yalpani *et al.*, 1994; Agrawal *et al.*, 2003), se comprobó si la activación de *PCC1* por luz UV-C es específica de SA o si algún componente de la vía de JA puede estar también implicado. Se analizó la expresión de *PCC1* en plantas silvestres Col-0 y en el mutante *co-1* al tratar con SA, JA o ambos. Para comprobar la eficiencia de los tratamientos se utilizaron como controles el gen *PR-1* marcador inducible por SA y el gen *JR2* marcador de respuesta a JA. Los datos obtenidos se muestran en la figura 5, donde se observa que

Resultados

sólo SA es capaz de activar la expresión del transcrito de *PCC1* en plantas silvestres Col-0. En plantas mutantes *co-1*, donde no se activaba *PCC1* al irradiar con luz UV-C, tampoco se activa por aplicación de SA exógeno, mientras que la activación de *PR1* es normal. La aplicación simultánea de SA y JA reduce los niveles de transcrito de *PCC1* cuando se comparan con los detectados en plantas tratadas con SA, lo que representa una manifestación más del antagonismo funcional entre SA y JA ampliamente caracterizado en numerosos procesos (Maleck *et al.*, 2000; Reymond *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2004; Cipollini *et al.*, 2004).

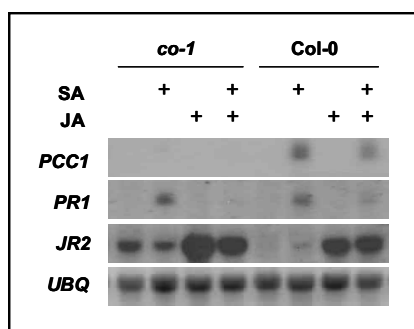


Figura 5. La activación de la expresión de *PCC1* por aplicación exógena de SA requiere la función de *CO* y se modula negativamente por JA.

Plantas Col-0 y el mutante *co-1* se trataron (+) con SA y JA según se indica a una concentración de 100 μ M. Los niveles de transcrito de *PCC1*, *PR1* y *JR2* se detectaron mediante Northern blot a partir de 10 μ g de RNA total aislado 24 horas después del tratamiento a partir de plantas tratadas y sus correspondientes controles no tratados. El control de carga se realizó hibridando con una sonda de ubiquitina 10 (*UBQ*).

Para confirmar si la inducción del gen *PCC1* era específica de SA o si podría estar regulada por otras fitohormonas o moléculas reguladoras que se generen en respuesta a estrés o que puedan estar implicadas en la transición del estado vegetativo a reproductivo, se analizó su expresión al tratar plantas Col-0 con JA, ABA, el precursor de etileno ácido aminociclopropano 1-carboxílico (ACC), giberelinas y brasinólido, así como con los reguladores redox H_2O_2 y nitroprusiato de sodio (SNP). Se ha descrito que ABA modula la periodicidad circadiana (Hanano *et al.*, 2006) y se conoce que la proteína FCA, componente de la vía autónoma, es un receptor de ABA (Razem *et al.*, 2006). El ACC es el precursor inmediato de etileno, que juega un papel importante en la regulación de un amplio espectro de procesos tales como la maduración del fruto, senescencia de las hojas, desarrollo de las

semillas, y la respuesta a una serie de agentes estresantes ambientales como el frío, herida y el ataque por patógenos (Abeles *et al.*, 1992). El ácido giberélico está descrito que promueve la floración activando el promotor de *LFY* (Blázquez *et al.*, 1998). Los brasinoesteroides están reconocidos como importantes hormonas de plantas indispensables para el crecimiento y diferenciación celular (Clouse y Sasse, 1998) y que modulan la periodicidad circadiana (Hanano *et al.*, 2006). El H_2O_2 se ha visto que participa en múltiples factores de estrés como la irradiación con luz UV-C o la inoculación con bacterias biotróficas, que producen en la planta estrés oxidativo, que conduce finalmente a la generación de H_2O_2 . El SNP es un donador de NO, que es una de las especies reactivas de nitrógeno que participa como molécula señalizadora en varios procesos relacionados con la respuesta defensiva, pero que en los últimos años se ha caracterizado como represor de la transición floral (He *et al.*, 2004). La figura 6 muestra que, a excepción del SA, ninguno de los tratamientos aplicados activa la expresión de *PCCI*, luego todo parece indicar que la inducción de la expresión de *PCCI* en respuesta a la irradiación por UV-C es debida únicamente al aumento de los niveles endógenos de SA y que los tratamientos con hormonas que actúan en diferentes vías de transición floral no aumentan su expresión.

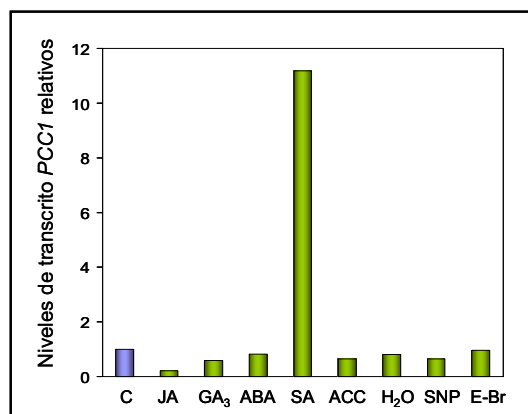


Figura 6. Niveles de transcrito de *PCCI* en plantas tratadas con diferentes fitohormonas o especies reactivas donadoras de oxígeno y nitrógeno.

Las semillas se germinaron y cultivaron *in vitro* y se pasaron a medio líquido para aplicar los distintos tratamientos como se indica en Materiales y Métodos. El medio se suplementó con los diferentes compuestos a las concentraciones finales que se indican: 50 μ M de SA, JA, ABA o GA_3 ; 1 mM de ACC; 5 mM peróxido de hidrógeno (H_2O_2); 0.5 mM nitroprusiato de sodio (SNP); 1 μ M epi-brasinolido (E-Br). El RNA se aisló a partir de plántulas a las seis horas tras realizar el tratamiento, los niveles de transcrito relativos se detectaron mediante RT-PCR cuantitativa con oligos específicos para *PCCI*. Se utilizaron los niveles de transcrito de *ACTINA 2/8* para normalizar los valores.

5) Patrón de expresión de *PCC1* a lo largo del desarrollo.

El patrón de expresión de *PCC1* en plantas no sometidas a estrés depende del estado de desarrollo. En la parte superior de la figura 7, se muestra que en plantas cultivadas en días largos, *PCC1* presenta niveles de expresión muy bajos en los primeros días tras la germinación, aumenta tanto en hojas de roseta como caulinares de plantas adultas y alcanza la máxima expresión en hojas de roseta senescentes. En la parte inferior de la figura 7 se analiza mediante RT-PCR cuantitativa los niveles del transcrito de *PCC1* en los primeros días tras la germinación en condiciones de día largo. Se detectó una acumulación creciente del transcrito de *PCC1* a partir del día ocho tras la siembra.

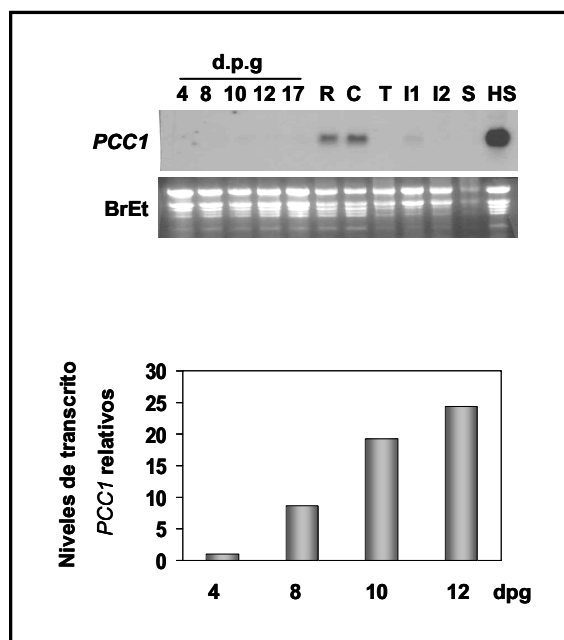


Figura 7. Patrón de expresión espacio-temporal de *PCC1*.

En el panel superior, el RNA total de plántulas en diferentes estado de desarrollo y de distintos órganos de planta adulta fueron analizados mediante Northern blot con una sonda específica para *PCC1*. R, hoja de roseta; C, hoja caulinar; T, tallo; I1, inflorescencia principal; I2, inflorescencia secundaria; S, silicua; HS, hoja de roseta senescente. La tinción del rRNA con Bromuro de Etidio se incluye como control de carga. En el panel inferior, se aisló el RNA total de muestras recogidas de plántulas a distintos días tras la germinación y se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa con oligos específicos de *PCC1* utilizando los niveles de transcrito de *ACTINA 2/8* para normalizar los valores.

PCCI se caracterizó inicialmente como un gen de respuesta a estrés que muestra una expresión basal regulada por el reloj circadiano (Sauerbrunn y Schlaich, 2004). Hemos analizado mediante RT-PCR cuantitativa la expresión de *PCCI* a lo largo del fotoperiodo en plantas de *Arabidopsis* cultivadas en condiciones fotoperiódicas de días largos (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) durante nueve días tras los cuales se mantuvieron durante dos días en condiciones de luz continua. Se recogieron muestras cada 4 horas durante los dos últimos días bajo condiciones fotoperiódicas y los dos días bajo iluminación continua. La figura 8 muestra que los niveles más bajos de transcrito de *PCCI* se detectan en las primeras horas de la fase de luz, alcanzando el máximo nivel hacia el final del día. Además, los niveles de transcrito se mantienen a niveles muy bajos hasta el día 9 tras la siembra. Durante el día 10, los niveles de transcrito aumentan progresivamente durante el periodo de luz para alcanzar el máximo al final del mismo. Los niveles detectados son alrededor de 20 veces superiores al promedio detectado a lo largo del día 9. Estos niveles comienzan a decaer durante la noche subjetiva del día 10 y hasta las 8 horas de luz del día 11, momento a partir del cual vuelven a incrementarse para volver a decaer cuando comienza la noche subjetiva del día 11. Como control de regulación circadiana, se analizaron los niveles de transcrito del componente del reloj *CIRCADIAN CONTROLLED ASSOCIATED 1* (*CCA1*) (Wang y Tobin, 1998) que alcanza el nivel máximo al inicio del día para decaer su expresión después de las 4 primeras horas de luz y permanecer así el resto del ciclo hasta que sube de nuevo en las 4 últimas horas del periodo de oscuridad. Estos datos apoyan la propuesta de que *PCCI* es regulado por el reloj circadiano (Sauerbrunn y Schlaich, 2004) pero indican también que la expresión regulada por el reloj circadiano se incrementa notablemente en los tiempos previamente identificados en este trabajo (figura 1), en los que se producen cambios en los niveles endógenos de SA compatibles con la transición floral.

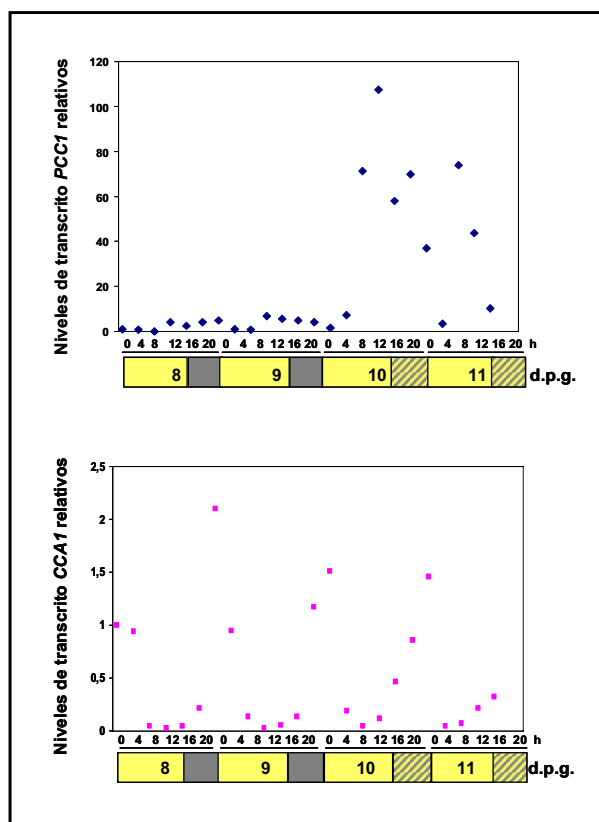


Figura 8. La expresión de *PCC1* está regulada por el reloj circadiano.

El RNA total, aislado de plántulas cultivadas en condiciones de día largo, se utilizó para análisis mediante RT-PCR cuantitativa con oligos específicos para *PCC1* (gráfica en la parte superior) y *CCA1* (gráfica en la parte inferior). Los niveles de transcrito relativos de *PCC1* y *CCA1* se normalizaron con los niveles de transcrito de *ACTINA 2/8*. Las muestras se recogieron cada 4 horas. Durante los días 8 y 9 tras la germinación, las barras horizontales amarillas representan el día y las barras horizontales grises la noche. Durante el décimo y onceavo día, las plantas permanecieron en condiciones de luz continua, las noches subjetivas están representadas en las barras horizontales con líneas oblicuas grises.

6) Conexión entre ácido salicílico y el reloj circadiano.

Para determinar si existe una relación entre los niveles endógenos de SA y procesos regulados por el reloj circadiano se analizaron los niveles de transcrito de dos genes cuya expresión está regulada por el reloj circadiano, *CCA1* y *CO*, en el mutante *sid2-1* y en plantas silvestres Col-0 a lo largo del día 9 tras la siembra. En la figura 9 a se muestra que *CCA1* mantiene un patrón de expresión similar a lo largo del ciclo en ambos genotipos,

pero los niveles de transcrito detectados en el momento de máxima expresión en las plantas deficientes en SA son superiores a los detectados en plantas silvestres. En cuanto a *CO*, observamos que los niveles de transcrito que detectamos en el momento de máxima expresión en plantas deficientes en SA son muy bajos y que no mantiene su patrón de expresión a lo largo del ciclo. Mediante RT-PCR semi-cuantitativa se analizaron los niveles de transcrito de *CCA1* y *CO* al amanecer en diferentes mutantes deficientes en SA (Fig. 9 b). Los resultados muestran un aumento de 2, 4 y 10 veces en los niveles de transcrito de *CCA1* en plantas *nahG*, *sid2-1* y *eds5-3*, respectivamente, comparados con el nivel detectado en plantas Col-0 (Fig. 9 b). Concomitantemente, se detectó una reducción en la expresión de *CO* del 40 % en *nahG* y del 98 % en los mutantes deficientes en la síntesis de SA respecto de la detectada en plantas silvestres (Fig. 9 b). Por tanto, las plantas deficientes en SA, además de no expresar *PCC1* muestran sobreexpresión del componente del reloj *CCA1* y expresión reducida y pérdida de regulación circadiana de *CO*.

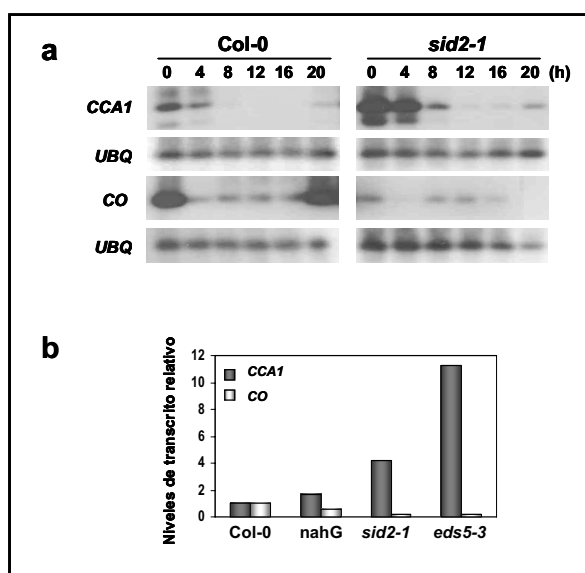


Figura 9. Niveles de transcrito de *CCA1* y *CO* a lo largo del fotoperiodo en condiciones de día largo en plantas silvestres Col-0 y deficientes en SA.

(a) El RNA total se aisló de muestras recogidas cada 4 horas durante el noveno día después de la siembra de plantas silvestres Col-0 y plantas mutantes deficientes en SA *sid2-1* cultivadas en condiciones de día largo (16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad). (b) Los niveles de transcrito relativos de los genotipos deficientes en SA *nahG*, *sid2-1* y *eds5-3* se compararon con plantas silvestres Col-0 al amanecer. Los niveles de transcrito relativo fueron analizados por RT-PCR semi-cuantitativa seguido de análisis Southern. La cuantificación se normalizó con los niveles de transcrito de *ubiquitina 10 (UBQ)* según se describe en Materiales y Métodos.

Dada la interacción entre los niveles endógenos de SA y los patrones de expresión de *CCA1* y *CO*, decidimos explorar si también *CCA1* es necesario como *CO* para la expresión inducida por SA de *PCC1*. En la figura 10 se analizó la expresión de *PCC1* en plantas mutantes y transgénicas sobreexpresoras de *CCA1* al irradiar las plantas con UV-C o aplicar SA exógenamente. Se observa que tanto al aplicar exógenamente SA como al irradiar las plantas con UV-C las plantas sobreexpresoras de *CCA1* alcanzan niveles de *PCC1* similares a los de plantas control Col-0 (Fig. 10). Sin embargo, el mutante *cca1-1* no consigue activar los niveles de transcrito de *PCC1* al irradiar las plantas con UV-C (Fig. 10a) pero lo activa de forma similar a la planta control Ws al aplicar SA (Fig. 10 b). Estos datos sugieren que *CCA1* participa en algún punto por encima de SA en la ruta de señalización que conduce a la expresión de *PCC1* inducida mediante luz UV-C que podría estar relacionada con su biosíntesis.

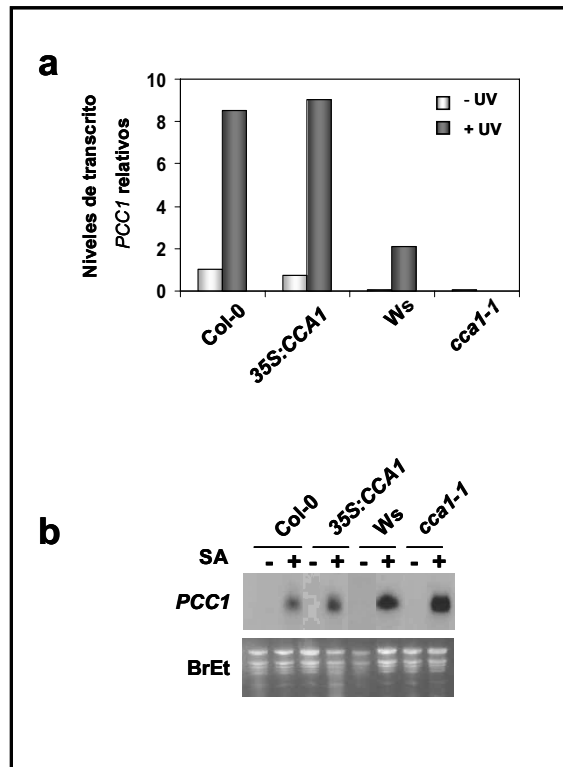


Figura 10. Expresión de *PCC1* en respuesta a UV y tratamiento con SA en plantas mutantes y sobreexpresoras del componente *CCA1* del reloj circadiano. Se analizaron los niveles relativos del transcrito de *PCC1* en plantas que sobreexpresan *CCA1* (*35S:CCA1*) y mutantes *cca1-1* así como en los correspondientes fondos silvestres: Col-0 y Ws,

respectivamente. **(a)** Las muestras se recogieron a 0 y 24 horas después de irradiar las plantas con luz UV-C (200 mJ cm^{-2}) (que corresponden a las 5 horas del comienzo del periodo de luz) y se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa con oligos específicos de *PCCI* utilizando los niveles de transcrito de *ACTINA 2/8* para normalizar los valores. **(b)** Las muestras se recogieron a 0 y 24 horas después de tratar exógenamente las plantas con SA $250 \mu\text{M}$ (corresponden a las 5 horas del comienzo del periodo de luz) y fueron analizadas mediante Northern blot a partir de $10 \mu\text{g}$ de RNA total aislado. La tinción del rRNA con bromuro de etidio se incluye como control de carga.

7) Caracterización funcional de *PCCI*.

Se ha identificado el gen *PCCI* como un candidato a codificar un activador de la floración que responde a cambios en los niveles endógenos de SA y que requiere la función de *CCA1* y *CO* para su expresión inducida en respuesta a estrés. Para conocer la conexión funcional entre SA y *PCCI* como reguladores de la transición a la floración se generaron plantas transgénicas con expresión reducida y aumentada de *PCCI* en distintos fondos genéticos silvestres y mutantes de Arabidopsis. Se prepararon construcciones de sobreexpresión de *PCCI* en la que se clonó el cDNA completo de *PCCI* (246 bp) en orientación sentido en el vector binario BinA7, bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador de la octopina sintasa, y construcciones de interferencia de RNA en las que se clonaron dos copias de cDNA, en orientación sentido y antisentido, y la horquilla de separación bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador de la octopina sintasa. En el caso de la construcción de RNAi, para la amplificación del cDNA completo de *PCCI* se utilizaron oligos degenerados que introducían sitios de corte en la secuencia amplificada para clonar en el vector pBluescript SK+ dirigiendo la orientación del inserto, como se indica en Materiales y Métodos. La transformación de Arabidopsis se realizó mediante agroinfiltración y el análisis genético para la identificación de plantas homocigotas se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos del análisis de tres líneas seleccionadas de cada construcción en fondo silvestre Col-0 que tienen una sola integración del transgen en homocigosis. Primero se analizaron los niveles de transcrito de *PCCI* en las diferentes líneas transgénicas (fig. 11 a). Las líneas de sobreexpresión acumulan 2000 veces más transcrito de *PCCI* que las plantas Col-0 no transformadas, mientras que en las líneas

de RNAi los niveles de transcrito fueron prácticamente indetectables, acumulando menos del 1 % del transcrito endógeno de *PCCI* en plantas silvestres no transformadas. Se procedió entonces a analizar el tiempo de floración de cada una de las líneas transgénicas junto a las correspondientes plantas Col-0 como control. El análisis del tiempo de floración se llevó a cabo mediante la cuantificación del número total de hojas de roseta más caulinares a la subida a flor tanto en plantas no irradiadas como en plantas irradiadas con luz UV-C el quinto día tras la siembra. La figura 11 b muestra que en ausencia de estrés, las líneas de RNAi 25.4, 33.9 y 19.9 presentan un fenotipo de floración tardía respecto al control no transformado ($p < 0,001$ para las dos primeras y $p < 0,01$ para la tercera). Por otro lado, las líneas que sobreexpresan *PCCI* muestran un ligero adelanto en la floración, pero sólo en una de las líneas el adelanto es estadísticamente significativo ($p < 0,01$). Cuando analizamos el tiempo de floración en plantas irradiadas con luz UV-C se observó que las plantas que sobreexpresan *PCCI* eran similares a las plantas silvestres en el adelanto de la floración por irradiación con luz UV-C, mientras que las plantas de RNAi irradiadas con luz UV-C aunque muestran valores promedios algo más tempranos que las plantas no irradiadas, no resultaron ser estadísticamente diferentes de las no irradiadas. Estos datos muestran a *PCCI* como un regulador positivo del tiempo de floración en plantas cultivadas en días largos y sugieren que *PCCI* es necesario para la aceleración de la floración en plantas irradiadas con luz UV-C. La figura 11 c muestra que en plantas cultivadas en días cortos la sobreexpresión de *PCCI* adelantó significativamente la floración. En la figura 11 d se muestra el análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de transcrito de los genes integradores *FT* y *SOC1* en las líneas generadas. Mientras que los niveles de *SOC1* parecen ser independientes del nivel de transcrito de *PCCI* que contenga la planta, la pérdida de función de *PCCI* va acompañada de una reducción en la expresión de *FT*. Estos datos sugieren que *PCCI* interactuaría con la vía de fotoperiodo entre *CO* y *FT*.

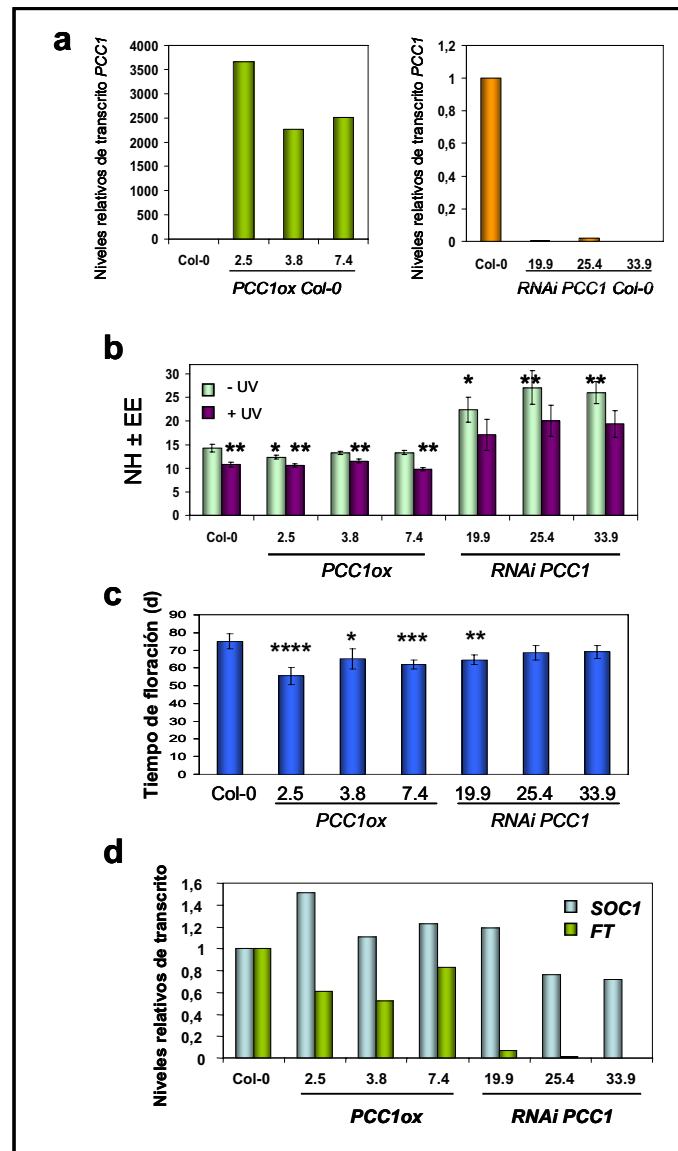


Figura 11. Tiempo de floración, respuesta a luz UV-C y expresión de *FT* y *SOC1* en líneas transgénicas que sobreexpresan *PCC1* o con expresión reducida por RNAi en fondo silvestre Col-0.

(a) Los niveles de transcrito de *PCC1* de tres líneas transgénicas independientes que sobreexpresan *PCC1* (panel de la izquierda, *PCC1ox*) o con expresión reducida (panel de la derecha, *RNAi PCC1*), se compararon con los de plantas silvestres Col-0 mediante RT-PCR cuantitativa con oligos específicos de *PCC1* utilizando los niveles de transcrito de *ACTINA 2/8* para normalizar los valores. (b) El tiempo de floración de las distintas líneas que sobreexpresan el gen *PCC1* (*PCC1ox*) o con expresión reducida de *PCC1* (*RNAi PCC1*) en día largo, se cuantificó como el número total de hojas (NH) a la subida a flor. Las barras verdes y moradas corresponden a la media de los valores obtenidos para cada población (n=9) de plantas irradiadas y no irradiadas con luz UV-C (200 mJ cm⁻²) el quinto día tras la germinación. Las barras de error representan el error estándar (EE). Los asteriscos

Resultados

representan el grado de significancia estadística de los resultados, * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$ (c) El tiempo de floración de las distintas líneas que sobreexpresan el gen *PCCI* (*PCCIox*) o con expresión reducida de *PCCI* (*RNAi PCCI*) en día corto, se cuantificó como días cultivados en condiciones de día corto a la subida a flor. Las barras azules corresponden a la media de los valores obtenidos para cada población (n=9). Las barras de error representan el error estándar (EE). Los asteriscos representan el grado de significancia estadística de los resultados, * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ **** $p < 0,00001$ (d) Los niveles de transcrito relativos de *SOCl* y *FT* fueron analizados mediante RT-PCR cuantitativa con oligos específicos de *SOCl* y *FT* y utilizando los niveles de transcrito de *ACTINA 2/8* para normalizar los valores en muestras de plantas silvestres Col-0 y las distintas líneas transgénicas que sobreexpresan el gen *PCCI* (*PCCIox*) o con expresión reducida de *PCCI* (*RNAi PCCI*) cultivadas en condiciones de día largo durante 5 días.

PCCI forma parte de una familia de 6 miembros de pequeños polipéptidos que mantienen cierta homología en la secuencia de aminoácidos, At1g05340, At1g56000, At2g32190, At2g32200, At2g32210 y At3g22231 (*PCCI*). Se han encontrado también dos loci (At3g22235 y At3g22240) que muestran una alta homología de secuencia de nucleótidos con *PCCI*, At3g22240 presenta un 44 % de similaridad y At3g22235 un 70 % (Fig. 12 a). La estructura de los genes, con los tamaños y posiciones relativas de exones e intrones está conservada, lo que sugiere que estos genes se generaron por duplicación génica. Ninguno de ellos excepto *PCCI* estaba diferencialmente regulado en plantas deficientes en SA cuando comparamos sus transcriptomas con el de plantas silvestres Col-0 (ver tabla 1). *PCCI* consta de 82 amino ácidos, siendo el polipéptido más largo, mientras que el resto de miembros codifican sólo entre 68 y 72 amino ácidos y sus funciones se desconocen. Para descartar que el retraso en el tiempo de floración que muestran las líneas generadas de RNAi sea debido a la reducción no sólo del transcrito de *PCCI* sino también al de At3g22235 y/o At3g22240, en la figura 12 b se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de transcrito de estos dos genes y *PCCI* en las líneas RNAi en fondo silvestre Col-0. No se detectó reducción de los niveles de transcrito de ninguno de los dos genes (At3g22235 y At3g22240) en ninguna de las líneas generadas, y sólo la expresión de *PCCI* se encuentra muy reducida (Fig. 12 b). Por tanto, el fenotipo de floración tardía detectado en las líneas RNAi de *PCCI*, es debido específicamente a la reducción del transcrito de este gen.

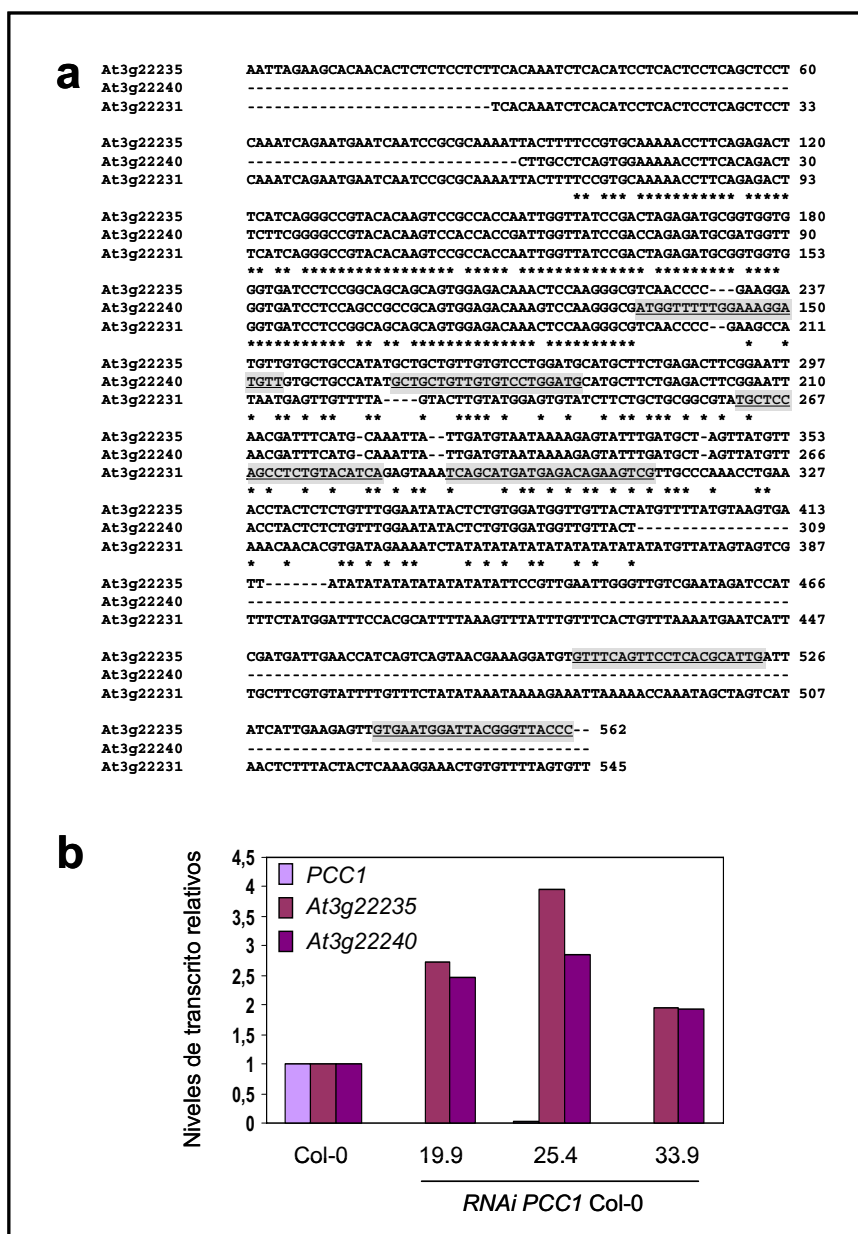


Figura 12. Homología de secuencia entre At3g22235, At3g22240 y *PCC1*. Niveles de transcritos relativo en las líneas de RNAi de *PCC1* en fondo Col-0.

(a) Alineamiento múltiple de secuencia de cDNA entre At3g22235, At3g22240 y *PCC1*. (b) Niveles de transcritos relativos de At3g22235, At3g22240 y *PCC1* analizados mediante RT-PCR cuantitativa con los oligos específicos correspondientes a las secuencias resaltadas en el panel (a) para At3g22235, At3g22240 y *PCC1* utilizando los niveles de transcritos de *ACTINA 2/8* para normalizar los valores en muestras de plantas silvestres Col-0 y las distintas líneas transgénicas con expresión reducida de *PCC1* (*RNAi PCC1*) cultivadas en condiciones de día largo durante 5 días.

Los niveles endógenos de SA controlan la expresión de *PCC1* como se ha mostrado en anteriores apartados. Para determinar si *PCC1* afecta a la acumulación de SA, se decidió analizar los niveles de SA en las líneas de sobreexpresión y RNAi de *PCC1* en fondo Col-0. Ni los niveles basales de SA ni los inducidos al irradiar las plantas con UV-C mostraron cambios significativos respecto del control Col-0 (Fig. 13). Estos resultados sugieren que *PCC1* actúa por debajo de SA en la ruta de señalización y que no ejerce un control por retroalimentación de su biosíntesis.

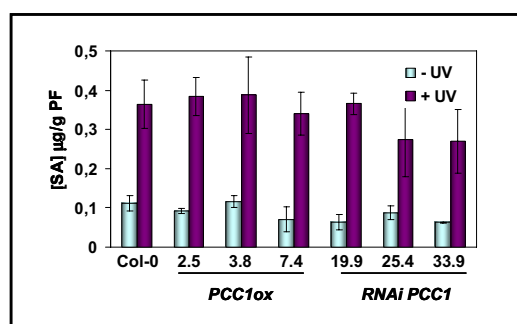


Figura 13. Niveles de SA en líneas transgénicas de sobreexpresión y RNAi de *PCC1* en fondo Col-0. Las plantas se cultivaron en condiciones de día corto y con 15 hojas de roseta se analizó su contenido en SA libre mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Las barras verdes representan el contenido de SA en microgramos por gramo de peso fresco medio de plantas no irradiadas (-) y las barras moradas representan el contenido medio de SA en plantas irradiadas con 200 mJcm^{-2} de luz UV-C (+) 24 horas después de la irradiación. Las barras de error representan el error estándar.

En ausencia de cambios en los niveles endógenos de SA libre en las diferentes líneas transgénicas, las alteraciones en la expresión de *PCC1* confieren una serie de características fenotípicas que procedimos a analizar. En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos del análisis del fenotipo de las líneas de sobreexpresión y RNAi de *PCC1* en fondo Col-0 cultivadas en condiciones de día largo. Se aprecia que las plantas RNAi florecen más tarde y presentan una roseta más compacta y con hojas más grandes (Fig. 14 a, b y c). En cuanto a la longitud de las silicuas y el diámetro de los tallos, los valores que se muestran corresponden a la media de las tres líneas de cada construcción, utilizando en cada línea unas 25 silicuas y 9 tallos. Las medidas se obtuvieron utilizando el programa ImageJ. Las líneas de RNAi presentan un diámetro de tallo y una longitud de silicua mayores que el control Col-0, mientras que no se detectaron diferencias entre las líneas de sobreexpresión y

las plantas silvestres (Fig. 14 d y e). Las imágenes que se muestran en la figura 14 e y f corresponden a las líneas transgénicas *PCC1ox Col-0 2.5* y *RNAi PCC1 Col-0 33.9* pero son similares para las otras líneas transgénicas con las que se ha trabajado. En cuanto a la disposición de las silicuas en el tallo, en plantas silvestres *Col-0* estas están dispuestas de manera que forman con el tallo un ángulo de aproximadamente 60°, en plantas que sobreexpresan *PCC1* este ángulo aumenta hasta llegar casi a 80° y disminuye aproximadamente a 50° en plantas de *RNAi* (Fig. 14 f). Las inflorescencias principales también se ven alteradas. En plantas silvestres *Col-0* están formadas por entre seis y siete flores muy juntas entre sí, en las plantas que sobreexpresan *PCC1* la inflorescencia principal está formada por no más de cuatro flores que crecen más separadas, mientras que en las plantas con la construcción de *RNAi* la inflorescencia principal está formada por un ramillete muy compacto de unas 10 flores (Fig. 14 f).

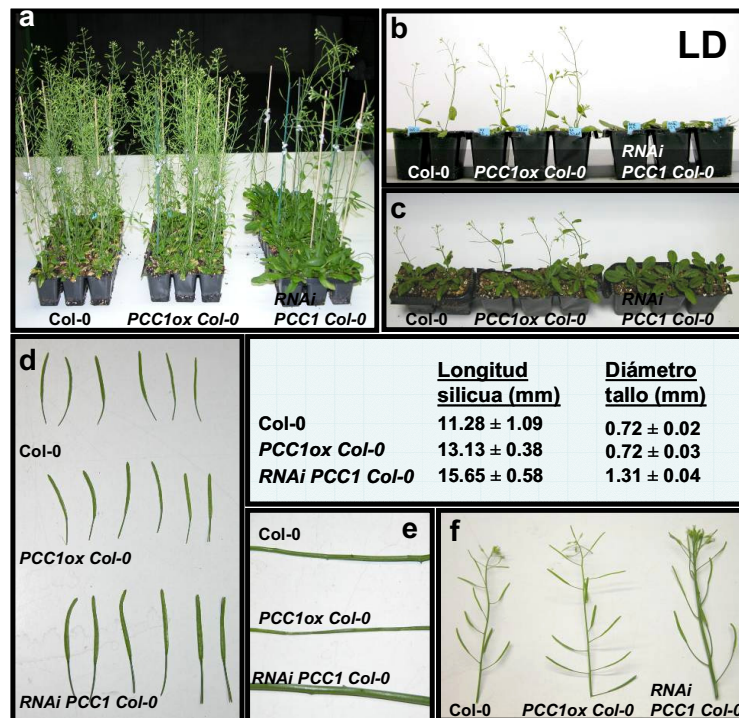


Figura 14. Análisis fenotípico en día largo de líneas transgénicas que sobreexpresan *PCC1* o con expresión reducida por *RNAi* en fondo silvestre *Col-0*.

Comparación fenotípica entre las distintas líneas generadas y el silvestre *Col-0* en plantas cultivadas en condiciones fotoperiódicas de días largos. Tiempo de floración (a, b y c), longitud de silicua (d), grosor de tallo (e) y disposición de silicuas y flores (f). Los datos numéricos mostrados representan la media ± error estándar de los valores obtenidos para las 3 líneas independientes de sobreexpresión o *RNAi* (n=25). Las mediciones se realizaron con el programa ImageJ.

Un análisis más detallado de las flores comparando las líneas de expresión reducida de *PCC1* por RNAi y las de la planta silvestre Col-0 se muestra en la figura 15. Claramente se aprecia que el tamaño de la flor tanto abierta como cerrada (Fig. 15 a y c) y de sus correspondientes órganos: pistilo, sépalos, estambres y pétalos (Fig. 15 b, f, g y h respectivamente) es mayor en las líneas de RNAi. Aunque las silicuas alcanzan mayor longitud en las líneas de RNAi, no hay diferencias en el grosor (Fig. 15 e) y las semillas no se ven afectadas, ya que su tamaño es similar al de plantas silvestres Col-0 (Fig. 15 d).

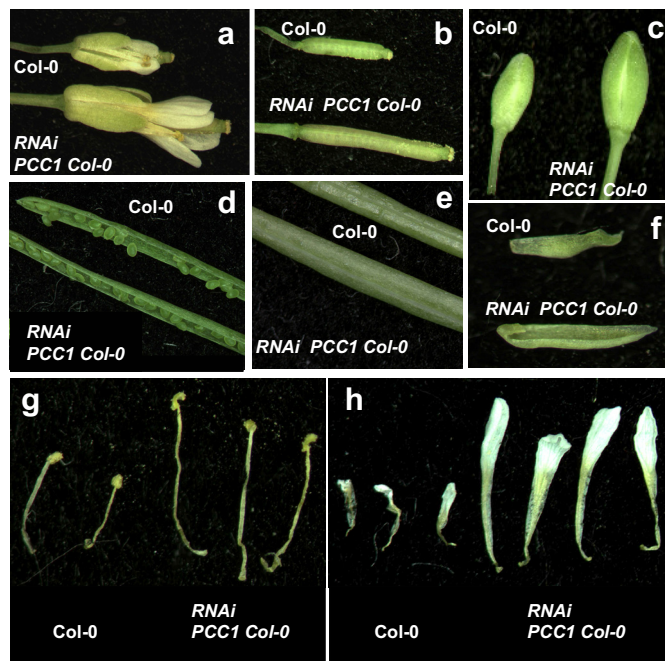


Figura 15. Análisis morfológico de los órganos reproductivos de líneas transgénicas con expresión reducida de *PCC1* por RNAi en fondo silvestre Col-0 en día largo. Imágenes de flor abierta (a) y cerrada (c) y distintos órganos florales: pistilo (b), silicuas (d y e), sépalos (f), estambres (g) y pétalos (h) obtenidas con la lupa.

Se procedió también a analizar el fenotipo de plantas de las diferentes líneas transgénicas cultivadas en condiciones fotoperiodicas de días cortos no inductoras de la floración. La figura 16 muestra los resultados obtenidos del análisis del fenotipo vegetativo de las líneas de sobreexpresión y RNAi de *PCC1* en fondo Col-0. En las líneas de sobreexpresión las hojas son más pequeñas y los peciols más cortos que en las plantas silvestres (Fig. 16 b) lo

que da lugar a una roseta más pequeña y compacta (Fig. 16 a), mientras que en las líneas de RNAi las hojas son algo más grandes y con los peciolo más largos que en las plantas silvestres Col-0 (Fig. 16 b), lo que da lugar a una roseta más grande y menos organizada (Fig. 16 a).

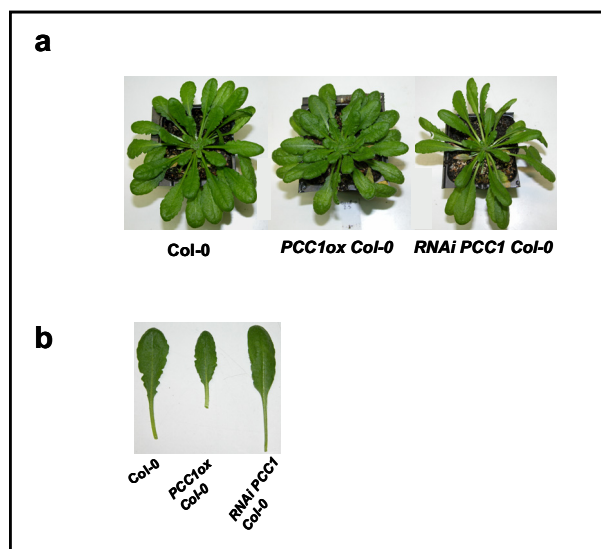


Figura 16. Análisis fenotípico de plantas cultivadas en días cortos de líneas transgénicas que sobreexpresan *PCC1* o con expresión reducida por RNAi en fondo silvestre Col-0. Comparación fenotípica del desarrollo vegetativo de plantas transgénicas y silvestres cultivadas en condiciones de días cortos. (a) Roseta principal, (b) detalle de las hojas de roseta y longitud del peciolo.

Los resultados mostrados hasta aquí sugieren que *PCC1* regula tanto el desarrollo vegetativo como reproductivo de Arabidopsis. En concreto, *PCC1* parece tener una función como regulador de la transición a la floración. Para profundizar en el análisis de la función de *PCC1* en el control del tiempo de floración se generaron líneas transgénicas de sobreexpresión y RNAi en fondos mutantes en genes de tiempo de floración de la ruta de fotoperiodo (*co-1*) y de la vía autónoma (*five-3*). Los resultados obtenidos del análisis de las dos líneas seleccionadas de cada construcción en fondo mutante *co-1* que tienen una sola integración del transgen en homocigosis, se muestran en la figura 17. Primero se analizaron los niveles de transcrito de *PCC1* en las diferentes líneas transgénicas (Fig. 17 a). Las líneas de sobreexpresión mostraron altos niveles de acumulación del transgen mientras que en las líneas de RNAi los niveles de transcrito se redujeron a la mitad de los niveles detectados en

plantas *co-1*. Se procedió a analizar el tiempo de floración de cada una de las líneas transgénicas junto a las correspondientes plantas mutantes *co-1* como control. El análisis del tiempo de floración se llevó a cabo mediante el conteo del número total de hojas, de roseta más caulinares a la subida a flor tanto en plantas no irradiadas como en plantas irradiadas con luz UV-C el quinto día tras la siembra. Cuando analizamos el tiempo de floración en plantas no irradiadas (Fig. 17 b), los resultados obtenidos son similares independientemente del nivel de *PCCI*, en ambos casos son más tempranas que el mutante *co-1*. En plantas irradiadas con luz UV-C se observó que las plantas mutantes *co-1* adelantan el tiempo de floración (como ya había sido descrito por Martínez y colaboradores en 2004), sin embargo en las líneas de sobreexpresión y RNAi generadas en este fondo mutante, en ambos casos se retrasa el tiempo de floración, independientemente del nivel de transcrito de *PCCI* que contenga. La figura 17 c muestra que en plantas cultivadas en días cortos tampoco se ven cambios en el tiempo de floración independientemente de cuales sean los niveles de transcrito de *PCCI*. Estos datos apuntan que los cambios en la expresión de *PCCI* no tienen efecto en el fondo mutante *co-1*, lo que sugiere que *CO* no es sólo necesario para la expresión de *PCCI* sino que además, se requiere para que *PCCI* funcione como regulador del tiempo de floración. Por tanto, la función reguladora del tiempo de floración de *PCCI* en plantas cultivadas en días largos requiere la participación activa de *CO*, presumiblemente a través de la vía de fotoperiodo.

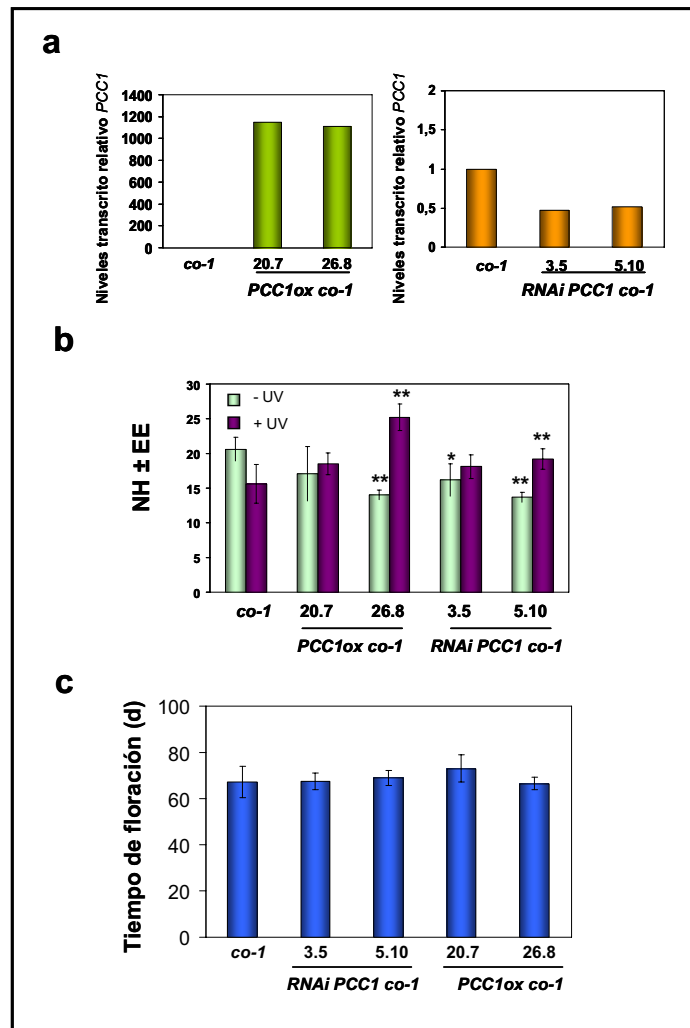


Figura 17. Tiempo de floración y respuesta a luz UV-C en líneas transgénicas que sobreexpresan *PCC1* o con expresión reducida por RNAi en fondo mutante *co-1*.

(a) Los niveles de transcrito de *PCC1* de dos líneas transgénicas independientes que sobreexpresan *PCC1* (panel de la izquierda) o con expresión reducida (panel de la derecha), se compararon con los de plantas control *co-1* mediante RT-PCR cuantitativa con oligos específicos de *PCC1* utilizando los niveles de transcrito de *ACTINA 2/8* para normalizar los valores. (b) El tiempo de floración de las distintas líneas que sobreexpresan el gen *PCC1* (*PCC1ox*) o con expresión reducida de *PCC1* (*RNAi PCC1*) se cuantificó como el número total de hojas (NH) a la subida a flor. Las barras verdes y moradas corresponden a la media de los valores obtenidos para cada población (n=9) de plantas irradiadas y no irradiadas con luz UV-C (200 mJ cm⁻²) el quinto día tras la germinación. Las barras de error representan el error estándar (EE). Los asteriscos representan el grado de significancia estadística de los resultados, ** p < 0,001. (c) El tiempo de floración de las distintas líneas que sobreexpresan el gen *PCC1* (*PCC1ox*) o con expresión reducida de *PCC1* (*RNAi PCC1*) en día corto, se cuantificó como días cultivados en condiciones de día corto a la subida a flor. Las barras azules corresponden a la media de los valores obtenidos para cada población (n=9). Las barras de error representan el error estándar (EE).

En cuanto a la interacción de *PCCI* con la vía autónoma, la figura 18 muestra los resultados obtenidos del análisis de las dos líneas seleccionadas de cada construcción en fondo mutante *fve-3* que tienen una sola integración del transgen en homocigosis. Primero se analizaron los niveles de transcrito de *PCCI* en las diferentes líneas transgénicas (Fig. 18 a). Las líneas de sobreexpresión mostraron niveles bajos del transgen nunca superiores a 10 veces los niveles de transcrito del control *fve-3*, mientras que en las líneas de RNAi los niveles de transcrito se redujeron entre un 40 y un 60 %. Se procedió a analizar el tiempo de floración de cada una de las líneas transgénicas junto a las correspondientes plantas mutantes *fve-3* como control. La figura 18 b muestra que en ausencia de estrés, las líneas de RNAi presentan un ligero retraso en la floración, mientras que las líneas que sobreexpresan *PCCI* muestran un adelanto estadísticamente significativo. Cuando analizamos el tiempo de floración en plantas sometidas a irradiación, los resultados obtenidos indican que en ninguna de las líneas ni en el mutante *fve-3* no transformado se produce un adelanto en la floración por efecto de la irradiación con luz UV-C. Que UV-C no promueva adelanto en el tiempo de floración en fondo *fve-3* independientemente del nivel de expresión de *PCCI*, indica que la floración acelerada por estrés requiere la funcionalidad de la vía autónoma además de la función de *PCCI*. La figura 18 c muestra el tiempo de floración en día corto para las diferentes líneas en fondo *fve-3*. Se aprecia una floración mucho más temprana en las plantas que sobreexpresan el transcrito de *PCCI* de las dos líneas analizadas ($p < 0,00001$). En cambio, las líneas de RNAi presentan un ligero retraso en el tiempo de floración.

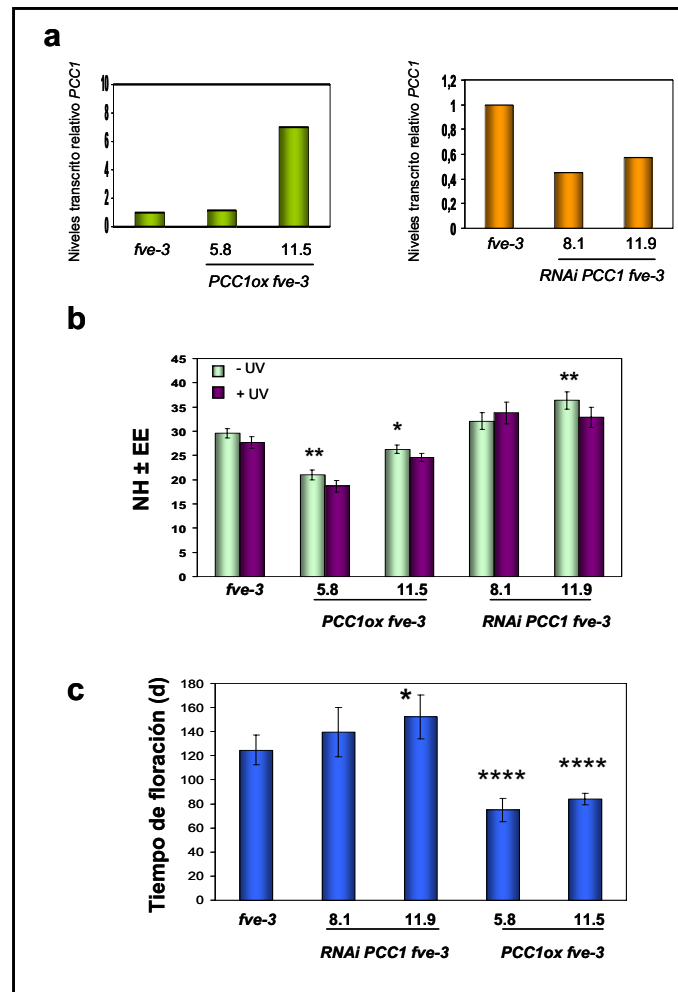


Figura 18. Tiempo de floración y respuesta a luz UV-C en líneas transgénicas que sobreexpresan *PCC1* o con expresión reducida por RNAi en fondo mutante *fve-3*.

Los niveles de transcrito de *PCC1* de tres líneas transgénicas independientes que sobreexpresan *PCC1* (panel de la izquierda) o con expresión reducida (panel de la derecha), se compararon con los de plantas control *fve-3* mediante RT-PCR cuantitativa con oligos específicos de *PCC1* utilizando los niveles de transcrito de *ACTINA 2/8* para normalizar los valores. **(b)** El tiempo de floración de las distintas líneas que sobreexpresan el gen *PCC1* (*PCC1ox*) o con expresión reducida de *PCC1* (*RNAi PCC1*) se cuantificó como el número total de hojas (NH) a la subida a flor. Las barras verdes y moradas corresponden a la media de los valores obtenidos para cada población (n=9) de plantas irradiadas y no irradiadas con luz UV-C (200 mJ cm⁻²) el quinto día tras la germinación. Las barras de error representan el error estándar (EE). Los asteriscos representan el grado de significancia estadística de los resultados, * p < 0,01 ** p < 0,001 **(c)** El tiempo de floración de las distintas líneas que sobreexpresan el gen *PCC1* (*PCC1ox*) o con expresión reducida de *PCC1* (*RNAi PCC1*) en día corto, se cuantificó como días cultivados en condiciones de día corto a la subida a flor. Las barras azules corresponden a la media de los valores obtenidos para cada población (n=9). Las barras de error representan el error estándar (EE). Los asteriscos representan el grado de significancia estadística de los resultados, * p < 0,01 **** p < 0,00001.

8) Funciones de *PCCI* no relacionadas con la regulación de la transición floral.

Una vez caracterizado el papel de *PCCI* como regulador dependiente de SA del tiempo de floración, y con objeto de analizar otras posibles funciones dependientes de SA para *PCCI*, se estudió el comportamiento de las líneas transgénicas de sobreexpresión y de RNAi, en los diferentes fondos genéticos Col-0, *co-1* y *fve-3*, en otros procesos que cursan con un aumento de los niveles endógenos de SA, como son la defensa frente a patógenos biotrofos (Malamy *et al.*, 1990; Métraux. *et al.*, 1990; Reymond y Farmer, 1998) y la senescencia (Morris *et al.*, 2000).

Se ha caracterizado que SA tiene una función importante en la respuesta de defensa frente a patógenos (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). SA activa la expresión de genes cuyos productos tienen actividad antipatogénica, potenciando así la resistencia de la planta sometida al ataque patogénico (Linthorst, 1991; Ward *et al.*, 1991). Se ha comprobado que mutantes afectados en la síntesis, acumulación, percepción o señalización de SA son deficientes en la activación de genes de defensa (Delaney *et al.*, 1994; Howe *et al.*, 1996) y más susceptibles al ataque de patógenos (Vijayan *et al.*, 1998; Dong, 2001). En cambio, mutantes con elevados niveles o señalización constitutivamente activada de SA son más resistentes (Heil y Baldwin, 2002). Como *PCCI* está descrito que se induce en respuesta a patógenos (Sauerbrunn y Schlaich, 2004), se estudió la respuesta de las líneas transgénicas de sobreexpresión y de RNAi en los diferentes fondos genéticos Col-0, *co-1* y *fve-3*, en defensa frente a la bacteria fitopatogénica de tipo biotrofo *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst*). En la tabla 3 se observa que todas las líneas generadas en fondo silvestre Col-0, muestran un crecimiento bacteriano de la misma magnitud al que presentan las plantas silvestres Col-0, a excepción de una de las líneas de sobreexpresión, que se muestra más resistente ($p < 0,001$). Aunque trabajos anteriores apuntan que la sobreexpresión de *PCCI* confiere resistencia a patógenos fúngicos biotrofos como *Hyaloperonospora parasitica* (Sauerbrunn y Schlaich, 2004), nuestros datos no sugieren que la sobreexpresión de *PCCI* confiera consistentemente a la planta mayor resistencia frente a *Pst*.

Cuando se analiza el comportamiento de las líneas generadas en el fondo mutante *co-1* (Tabla 3 b), se observa que la línea de sobreexpresión analizada muestra mayor resistencia frente a *Pseudomonas syringae* a las 72 horas de la inoculación con la bacteria

($p < 0,01$). Al analizar el comportamiento de las líneas generadas en el fondo mutante *fve-3*, se observa (tabla 3 c) que en general todas las líneas en fondo genético *fve-3* son más resistentes que el silvestre Col-0, y cuando se comparan tanto la línea de sobreexpresión como la de RNAi con el control mutante *fve-3*, al contrario de lo que se esperaba, es la línea de RNAi la que muestra mayor resistencia frente a *Pseudomonas syringae* a las 72 horas de la inoculación con la bacteria ($p < 0,001$).

Tabla 3. Resistencia frente a *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 de las líneas transgénicas que sobreexpresan *PCC1* o con expresión reducida por RNAi en los diferentes fondos genéticos transformados.

Línea	Log cfu/ mg PF	
	0 horas	72 horas
a) Col-0	3.63 ± 0.10	5.24 ± 0.17
<i>PCC1ox</i> Col-0 2.5	3.76 ± 0.08	5.09 ± 0.14
<i>PCC1ox</i> Col-0 3.8	4.10 ± 0.07	5.12 ± 0.36
<i>PCC1ox</i> Col-0 7.4	3.85 ± 0.24	4.60 ± 0.11 **
<i>RNAi PCC1</i> Col-0 19.9	3.89 ± 0.23	5.14 ± 0.07
<i>RNAi PCC1</i> Col-0 25.4	3.93 ± 0.25	5.21 ± 0.42
<i>RNAi PCC1</i> Col-0 33.9	3.64 ± 0.25	5.02 ± 0.15
b) Col-0	3.63 ± 0.10	5.24 ± 0.17
<i>co-1</i>	4.08 ± 0.19	5.43 ± 0.21
<i>PCC1ox co-1</i> 20.7	4.10 ± 0.20	4.83 ± 0.34 *
<i>RNAi PCC1 co-1</i> 5.1	4.04 ± 0.16	5.11 ± 0.4
c) Col-0	3.57 ± 0.11	5.09 ± 0.38
<i>fve-3</i>	3.62 ± 0.07	4.31 ± 0.16
<i>PCC1ox fve-3</i> 11.5	3.78 ± 0.18	4.29 ± 0.23
<i>RNAi PCC1 fve-3</i> 11.9	3.72 ± 0.21	3.88 ± 0.11 **

La resistencia frente a *Pseudomonas syringae* de las líneas transgénicas generadas en fondo silvestre Col-0 (a) y en los fondos mutantes mutante *co-1* (b) y *fve-3* (c), se analizó mediante la cuantificación del crecimiento bacteriano a las 72 horas de inocular las plantas como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados mostrados corresponden a la media de cuatro réplicas del logaritmo de unidades formadoras de colonias por miligramo de peso fresco (Log cfu/mg PF). Las barras de error representan los valores de los correspondientes errores estándar. Los asteriscos representan el grado de significancia estadística de los resultados, * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$.

Otro proceso relacionado con el desarrollo que se regula por SA es la senescencia foliar. Morris *et al.* (2000) pusieron de manifiesto que la ruta señalizadora de SA juega un papel importante en el control de la expresión de algunos genes durante el desarrollo de la senescencia y puesto que *PCCI* alcanza la máxima expresión a lo largo del desarrollo en hojas de roseta senescentes (figura 7), se estudió el comportamiento de las líneas transgénicas de sobreexpresión o de interferencia de RNAi de *PCCI* (figuras 19 y 20). En la figura 19 a se observa que en condiciones de senescencia natural, las líneas generadas en fondo silvestre Col-0, no presentan diferencias respecto a las plantas silvestres Col-0. Sin embargo, en la figura 19 b se observa que en condiciones de senescencia forzada en hojas escindidas incubadas en oscuridad, las líneas de RNAi presentan signos de senescencia al tercer día de comenzar el experimento y antes que el control silvestre Col-0. Estos datos sugieren que *PCCI* podría tener una función antisenescente en el proceso de senescencia forzada por oscuridad.

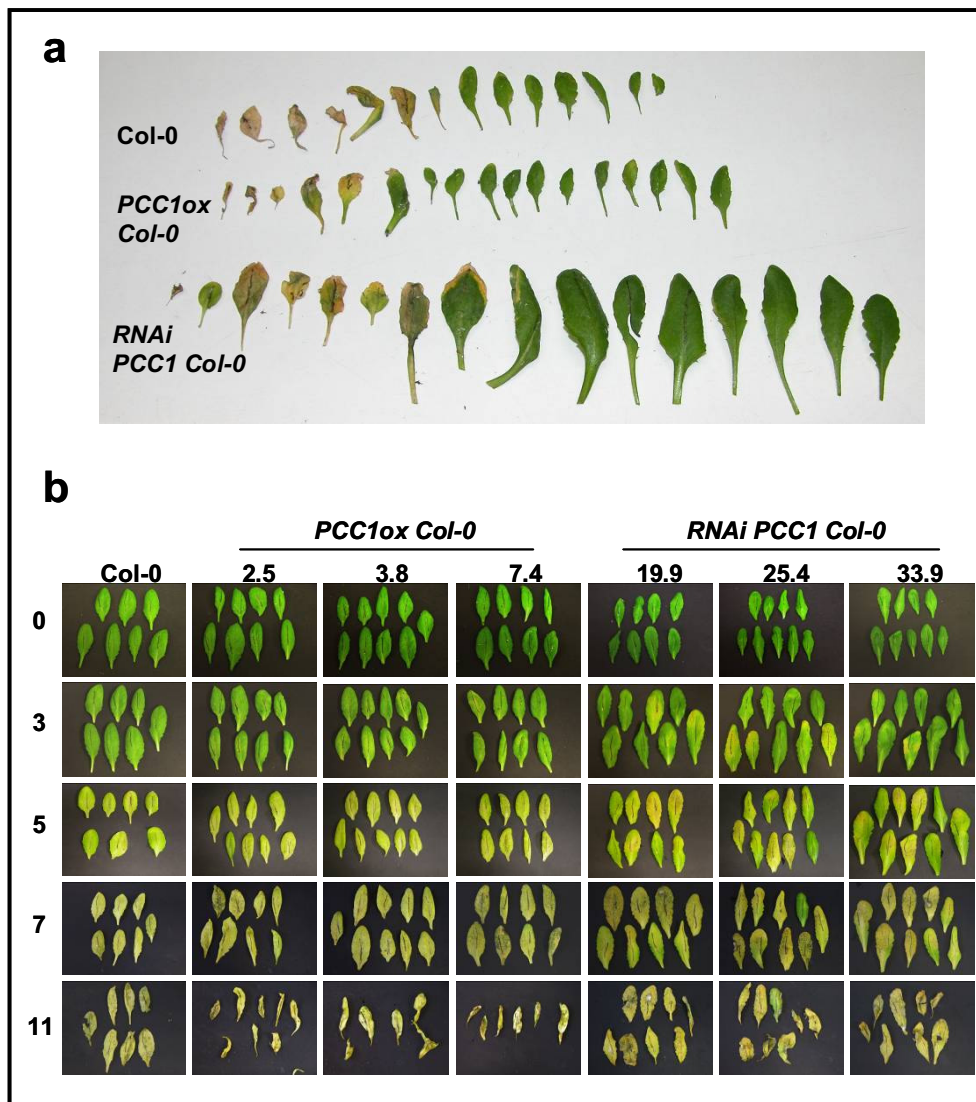


Figura 19. Estudio de la senescencia natural y forzada por oscuridad en las líneas transgénicas que sobreexpresan *PCC1* o con expresión reducida por RNAi en fondo silvestre Col-0.

(a) Para comparar la senescencia natural, se escindieron las hojas de 1a roseta de las líneas transgénicas y del control Col-0 y se dispusieron por orden desde las inferiores más viejas y con claros síntomas de senescencia hasta las más jóvenes. (b) Para comparar la senescencia forzada, se escindieron hojas de roseta de plantas adultas cultivadas en condiciones de día largo durante dos semanas y se colocaron en placas Petri sobre papel húmedo manteniéndolas en oscuridad, las imágenes se tomaron a los 0, 3, 5, 7 y 11 días.

Cuando se analiza el comportamiento de las líneas de sobreexpresión y RNAi de *PCC1* en los fondos mutantes *co-1* y *fve-3* en condiciones de senescencia forzada, no se observan cambios respecto de los controles *co-1* y *fve-3* (Fig. 20 a y b, respectivamente).

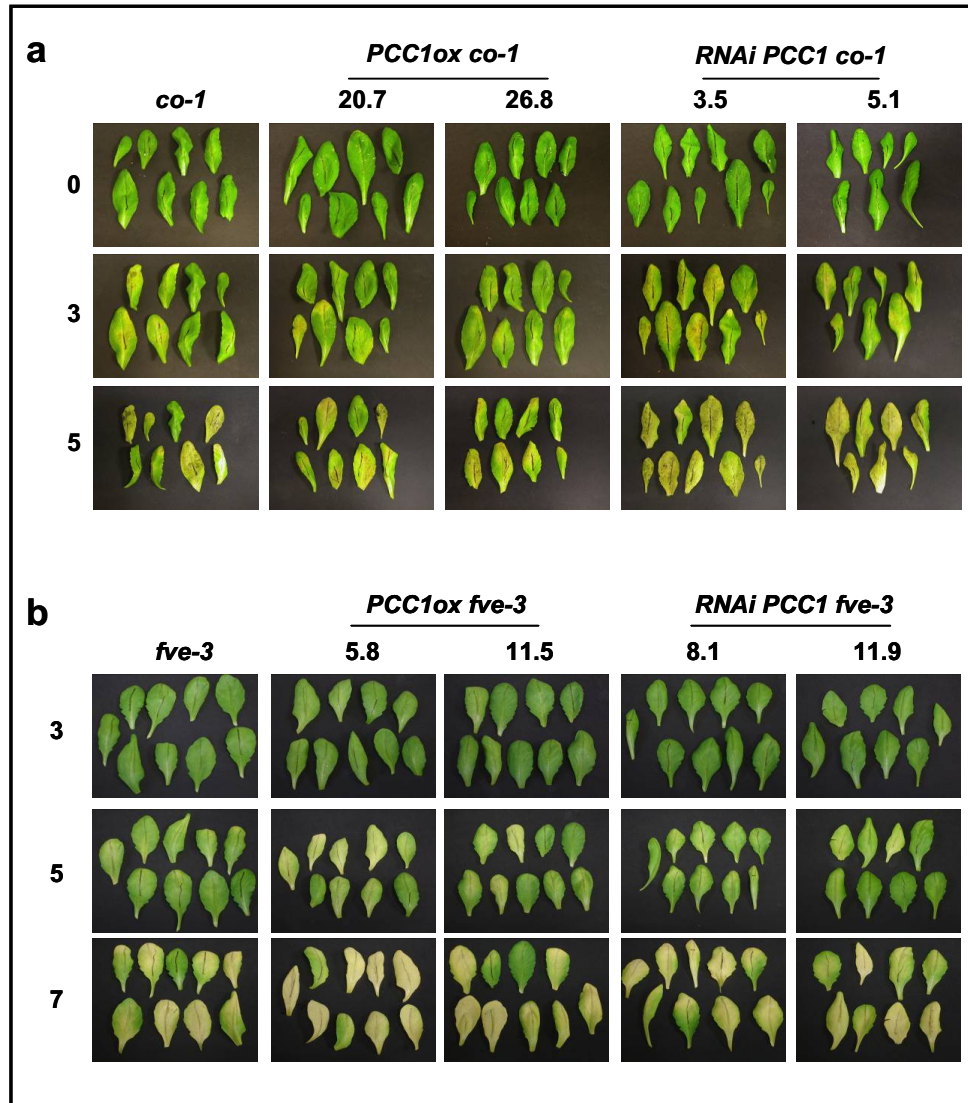


Figura 20. Estudio de la senescencia en las líneas transgénicas que sobreexpresan *PCC1* o con expresión reducida por RNAi en los fondos genéticos mutantes *co-1* y *fve-3*. Para comparar la senescencia forzada en las líneas generadas en los diferentes fondos mutantes *co-1* (a) y *fve-3* (b), se recogieron hojas de roseta de plantas adultas cultivadas en condiciones de día largo durante dos semanas, se escindieron y se colocaron en placas Petri sobre papel húmedo manteniéndolas en oscuridad, las imágenes se tomaron a los 0, 3, 5 y 7 días según se indica.

9) Caracterización de los mutantes de la vía de fotoperiodo en eventos que requieren la síntesis de ácido salicílico.

Los datos mostrados hasta aquí indican que un gen como *PCCI* que se caracterizó inicialmente como relacionado con la defensa de plantas frente a patógenos está también implicado en la regulación del tiempo de floración. Hemos comprobado si además de la regulación del desarrollo desde la defensa se pueden detectar también alteraciones dependientes de SA en la defensa de mutantes de tiempo de floración. Así pues se analizaron los mutantes en diferentes genes implicados en la vía dependiente de fotoperiodo como *GI* ó *CO* o en genes integradores como *FT* ó *SOCI* al ser sometidos a inoculación con bacterias o irradiación con luz UV-C (figura 21), procesos que van acompañados de un incremento en los niveles de SA. Como al irradiar plantas con luz UV-C se aumentan los niveles endógenos tanto de SA como de JA (Beckers *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2004; Cipollini *et al.*, 2004; Miao y Zentgraf, 2007), también se estudió cuál era la respuesta de los distintos mutantes al tratamiento con SA y/o JA (figura 22). En la figura 21 a, todos los mutantes analizados muestran un crecimiento bacteriano de la misma magnitud al que presentan las plantas silvestres Col-0, a excepción de *co-1*, que se muestra algo más resistente frente a *Pseudomonas syringae*. Los niveles basales de SA que presentan los distintos mutantes son muy similares a los cuantificados en plantas silvestres (Fig. 21 b). Además, todos los mutantes menos *co-1* acumularon SA en respuesta a la irradiación con luz UV-C con niveles similares a los detectados en plantas silvestres irradiadas (Fig. 21 b). Estos datos sugieren que la mutación en *CO* además de afectar a la transición floral dependiente de fotoperiodo conduce a alteraciones en el patrón de defensa dependiente de SA.

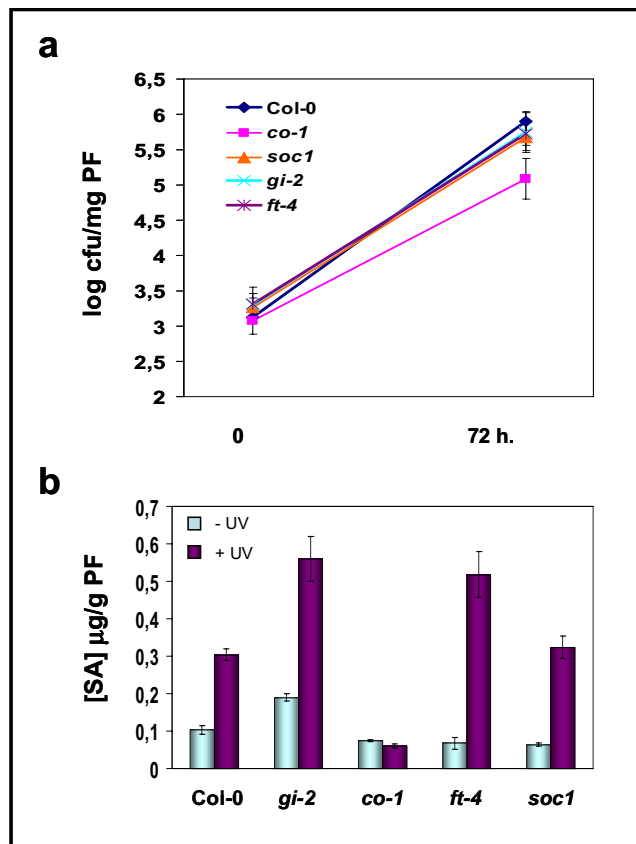


Figura 21. El mutante *co-1* muestra diferencias con el resto de mutantes de la vía de fotoperiodo en cuanto a resistencia frente a patógenos biotrofos y en la activación de la síntesis de SA.

(a) Para estimar la resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 de los mutantes de la vía de fotoperiodo, se cuantificó el crecimiento bacteriano a las 72 horas de inocular las plantas como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se representan como la media de cuatro réplicas del logaritmo de unidades formadoras de colonias por miligramo de peso fresco (Log cfu/mg PF). Las barras de error representan los valores de error estándar para cada grupo de medidas. (b) Las plantas se cultivaron en condiciones de día corto y con 15 hojas de roseta se irradiaron con luz UV-C. Su contenido en SA se analizó por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Las barras verdes representan el contenido medio de SA en microgramos por gramo de peso fresco medio de plantas no irradiadas (-) y las barras moradas representan el contenido medio de SA en plantas irradiadas con 200 mJ cm^{-2} de luz UV-C (+) 24 horas después de la irradiación. Las determinaciones se hicieron de cuatro réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar.

En la figura 22 se analizó la activación de la expresión de genes que se han utilizado como marcadores de respuestas dependientes de SA (*PR1*) o de JA (*JR2*) junto con *PCCI* en los mutantes de tiempo de floración al tratar con SA, JA o ambos, utilizando como control plantas silvestres Col-0. Los datos obtenidos muestran una respuesta equivalente en todos

los mutantes analizados, tanto en los niveles de *PR1* al tratar con SA como niveles de *JR2* en respuesta al tratamiento con JA. También se observa que SA induce la acumulación del transcrito de *PCC1* en todos los genotipos analizados excepto en el mutante *co-1*, como observamos previamente al irradiar con luz UV-C (figura 4). El mutante *co-1* activa la expresión por SA de *PR1* pero no de *PCC1* lo que sugiere que la función de *CO* no es necesaria para la activación general de respuestas dependientes de SA pero si específicamente para la activación de *PCC1*.

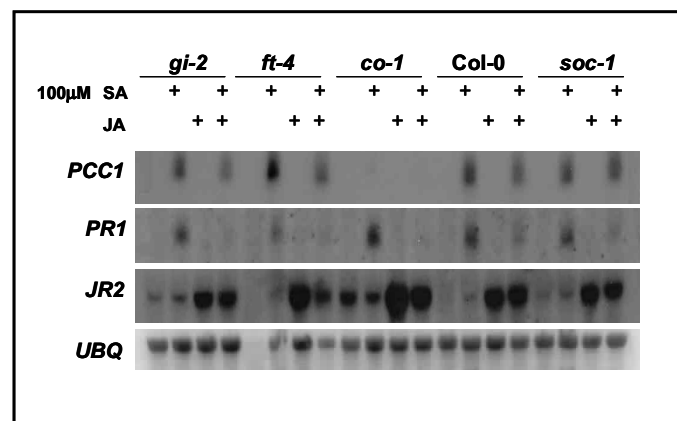


Figura 22. Respuesta al tratamiento con SA y JA en mutantes de la vía de fotoperiodo. Plantas mutantes de la vía de fotoperiodo se trataron con SA y JA según se indica (+) a una concentración de 100 µM. Los niveles de transcrito de *PCC1*, *PR1* y *JR2* se detectaron mediante Northern blot a partir de 10 µg de RNA total aislado, de plantas tratadas y sus correspondientes controles no tratados, 24 horas después del tratamiento. El control de carga se realizó hibridando con una sonda de *ubiquitina 10 (UBQ)*.

También se estudió la respuesta de los mutantes de la vía de fotoperiodo en ensayos de senescencia forzada en oscuridad. La figura 23 muestra que las hojas de todos los mutantes senescen más tarde que las de plantas Col-0. Mientras los primeros síntomas de senescencia pueden detectarse en hojas Col-0 al tercer día en oscuridad, los mutantes no empiezan a mostrar dichos síntomas hasta el quinto día o incluso hasta el séptimo en el caso de *gi-2*.

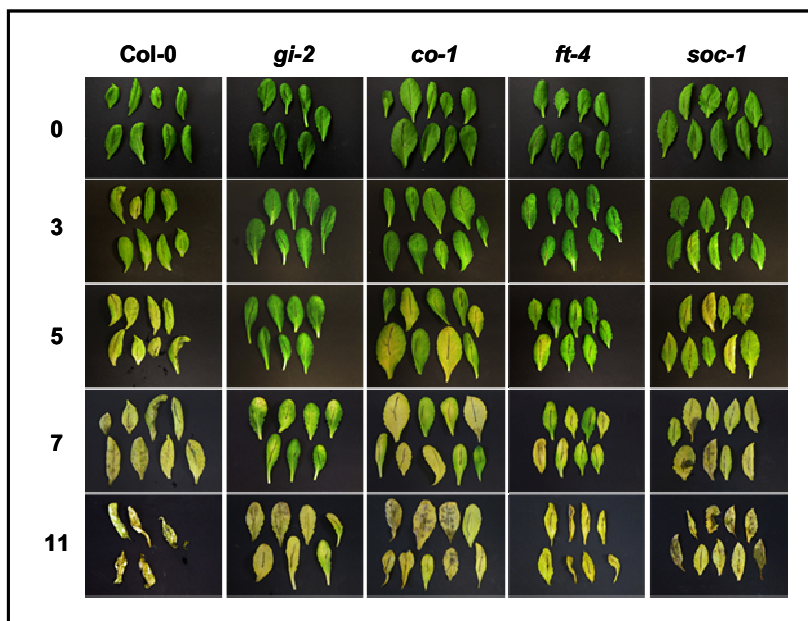


Figura 23. Estudio de la senescencia forzada en mutantes de la vía de fotoperiodo. Se escindieron hojas de roseta de plantas adultas del silvestre Col-0 y de plantas mutantes de la vía de fotoperiodo cultivadas en condiciones de día largo durante dos semanas y se colocaron en placas Petri sobre papel húmedo manteniéndolas en oscuridad, las imágenes se tomaron a los 0, 3, 5, 7 y 11 días.

10) Variación genética natural en la transición floral activada por luz UV-C en Arabidopsis thaliana.

Arabidopsis está considerada como una especie facultativa de día largo, el momento en que se da la transición a la floración está perfectamente regulado por la interacción entre la competencia de la planta para su desarrollo interno y las señales medioambientales que determinan las condiciones favorables para que se dé el cambio de fase vegetativa a reproductiva. Sin embargo, algunos factores pueden adelantar o retrasar la transición a la floración. Entre ellos, la longitud del fotoperiodo y las bajas temperaturas pueden acelerar la floración, y tanto la calidad como la cantidad de luz son también factores importantes en el control de este proceso. Otras condiciones medioambientales como son la disponibilidad de nutrientes y la temperatura también tienen efecto sobre la transición floral (Martínez-

Zapater *et al.*, 1994). La adaptación al medio hace que variedades naturales de *Arabidopsis* presenten diferencias en cuanto al tiempo de floración. En esta parte del trabajo se pretende establecer una relación entre SA y tiempo de floración desde otra aproximación, aprovechando la variación genética natural. El objetivo es estudiar qué loci dentro de un contexto genético determinado son los responsables de las diferencias detectadas en la aceleración de la floración en respuesta a la irradiación con luz UV-C entre unos ecotipos o accesiones silvestres y otros. Para ello, empezamos por seleccionar un panel de ecotipos o accesiones silvestres de amplia distribución geográfica, y adaptados a vivir en condiciones diferentes en cuanto a periodos de luz/oscuridad, cantidad y calidad de la luz y temperaturas ambientales. Se trataba primero de analizar si algunos de los 40 ecotipos seleccionados responden de manera diferente en cuanto al tiempo de floración en plantas irradiadas con luz UV-C. En la tabla 4 se muestran los parámetros geográficos así como los datos de tiempo de floración para cada uno de los ecotipos en plantas irradiadas (+UV) o no (-UV) con luz UV-C al quinto día tras la siembra. El tiempo de floración se cuantificó como el número total de hojas (NH) a la subida a flor \pm el error estándar (EE) de una población de 9 individuos por ecotipo. La tabla 4 recoge además la proporción entre los valores obtenidos en plantas irradiadas /no irradiadas y la diferencia en el número de hojas entre ambos tratamientos. Al analizar los datos obtenidos se observa que el 50 % de los ecotipos responden a la irradiación con UV-C. Doce de los ecotipos testados sufren un adelanto en el tiempo de floración al irradiar con luz UV-C y tan sólo en cinco ecotipos se retrasa el tiempo de floración, mientras que en los ecotipos 17 restantes no se aprecian cambios. Los retrasos en la floración son más moderados que los adelantos. El máximo retraso observado es de alrededor de 2 hojas, que corresponde a los ecotipos Alc-0, Kas-1, Ms-0 y Nd-0. Los ecotipos que más adelantan (Col-5, Ll-0 y Tsu-0) lo hacen con entre 3 y 5 hojas menos que el control no irradiado. De todos estos datos puede concluirse que hay una amplia variabilidad genética en la respuesta de aceleración de la floración por irradiación con luz UV-C entre los ecotipos analizados y también que no puede establecerse una correlación entre adelanto o retraso de la floración en respuesta al factor de estrés y el tiempo de floración en ausencia de estrés.

Resultados

Tabla 4. Tiempo de floración de plantas irradiadas con luz UV-C y plantas control no irradiadas de una colección de ecotipos silvestres de *Arabidopsis thaliana*.

Ecotipo	Latitud/ Longitud	Altitud (m)	Tiempo floración (NH ± EE)		Ratio	Δ LN
			- UV	+ UV		
Alc-0	N40°/W3°		12.0 ± 0.5	14.0 ± 0.7	1.17	+ 2.0
Bay-0	N50°/E11°	300-400	10.0 ± 0.3	8.1 ± 0.2	0.81	- 1.9
Blh-1	N48°/E16	100-200	10.6 ± 0.4	11.1 ± 0.3	1.05	+ 0.5
C24	n.r.	n.r.	9.3 ± 0.2	10.0 ± 0.3	1.08	+ 0.7
Can-0	N28°/W15°	1260	38.7 ± 1.5	40.2 ± 1.2	1.04	+ 1.5
Col-0	N52°/E15°	1-100	10.2 ± 0.4	8.9 ± 0.3	0.85	- 1.3
Col-4	N52°/E15°	1-100	11.6 ± 0.2	10.7 ± 0.3	0.92	- 0.9
Col-5	N52°/E15°	1-100	12.5 ± 0.4	8.6 ± 0.3	0.69	- 3.9
Cvi-0	N16°/W24°	1200	10.0 ± 0.2	9.1 ± 0.4	0.91	- 0.9
Edi-0	N56°/W3°	100-200	14.3 ± 0.4	15.0 ± 0.5	1.05	+ 0.7
Fei-0	N40°/W8°	100-300	10.7 ± 0.2	8.7 ± 0.5	0.81	- 2.0
FI-3	N60°/E22°	1-100	> 40	> 40	-	-
Gr-1	N47°/E16°	300-400	10.7 ± 0.4	9.2 ± 0.2	0.86	- 1.5
Ita-0	N35°/W4°	2000	9.0 ± 0.3	8.0 ± 0.2	0.89	- 1.0
Kas-1	N35°/E77°	1580	10.9 ± 0.7	13.0 ± 0.9	1.19	+ 2.1
KZ-9	N48°/E65°	n.r.	9.3 ± 0.7	8.3 ± 0.4	0.89	- 1.0
Ler-0	N52°/E15°	1-100	8.9 ± 0.2	9.0 ± 0.3	1.01	+ 0.1
Li-2	N50°/E8°	100-200	27.4 ± 0.7	27.0 ± 1.9	0.97	- 0.4
Li-5	N50°/E8°	100-200	7.9 ± 0.4	8.1 ± 0.3	1.03	+ 0.2
Ll-0	N42°/E3°	100-300	21.2 ± 1.6	16.1 ± 1.1	0.76	- 5.1
Ms-0	N56°/E38°	100-200	6.0 ± 0.0	8.3 ± 0.5	1.39	+ 2.3
Mt-0	N53°/E23°	100-200	10.0 ± 0.3	7.9 ± 0.2	0.79	- 2.1
N1	N61°/E35°	n.r.	> 40	> 40	-	-
Nd-0	N53°/E9°	200-300	10.0 ± 0.3	12.2 ± 0.3	1.22	+ 2.2
Nd-1	N53°/E9°	200-300	11.0 ± 0.3	11.3 ± 0.4	1.03	+ 0.3
No-0	N51°/E14°	200-300	9.3 ± 0.2	7.2 ± 0.3	0.77	- 2.1
Ost-0	N61°/E14°	1-100	> 40	> 40	-	-
Oy-0	N61°/E5°	1-100	10.3 ± 0.6	9.8 ± 0.5	1.09	- 0.5
Rsch-4	N56°/E34°	100-200	9.0 ± 0.0	9.8 ± 0.5	1.09	+ 0.8
Sah-0	N38°/E3°	1300	7.7 ± 0.3	8.3 ± 0.4	1.08	+ 0.6
Sei-0	N47°/E12°	1000-1500	8.1 ± 0.3	8.0 ± 0.2	0.98	- 0.1
Sha	N39°/E70°	3400	10.4 ± 1.3	11.1 ± 1.8	1.07	+ 0.7
Sf-2	N42°/E3°	1-100	8.1 ± 0.2	7.6 ± 0.3	0.94	- 0.5
Tsu-0	N34°/E136°	1-100	16.6 ± 1.2	13.2 ± 1.3	0.80	- 3.4
Ws-0	N52°/E30°	100-200	42.6 ± 1.6	35.5 ± 2.0	0.83	- 7.1
Ws-4	N52°/E30°	100-200	8.2 ± 0.4	8.3 ± 0.2	1.00	+ 0.1
Wt-1	N52°/E9°	1-100	9.0 ± 0.4	8.2 ± 0.3	0.91	- 0.8

El tiempo de floración se calcula contando el número total de hojas (NH) al subir a flor ± error estándar (EE) para n=9 en plantas irradiadas con luz UV-C (+UV) o plantas no irradiadas (-UV) como control. Los datos geográficos se obtuvieron a través del INRA servicio web VNAT (<http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat>).

Con el objeto de determinar si podía establecerse alguna correlación entre la respuesta a estrés en el tiempo de floración y los parámetros geográficos de los ecotipos, se representaron los datos obtenidos de ratio entre el número de hojas a la subida a flor en plantas irradiadas/ no irradiadas versus las coordenadas geográficas. En la figura 24 se muestra la correlación obtenida para cada parámetro geográfico: altitud, latitud y longitud.

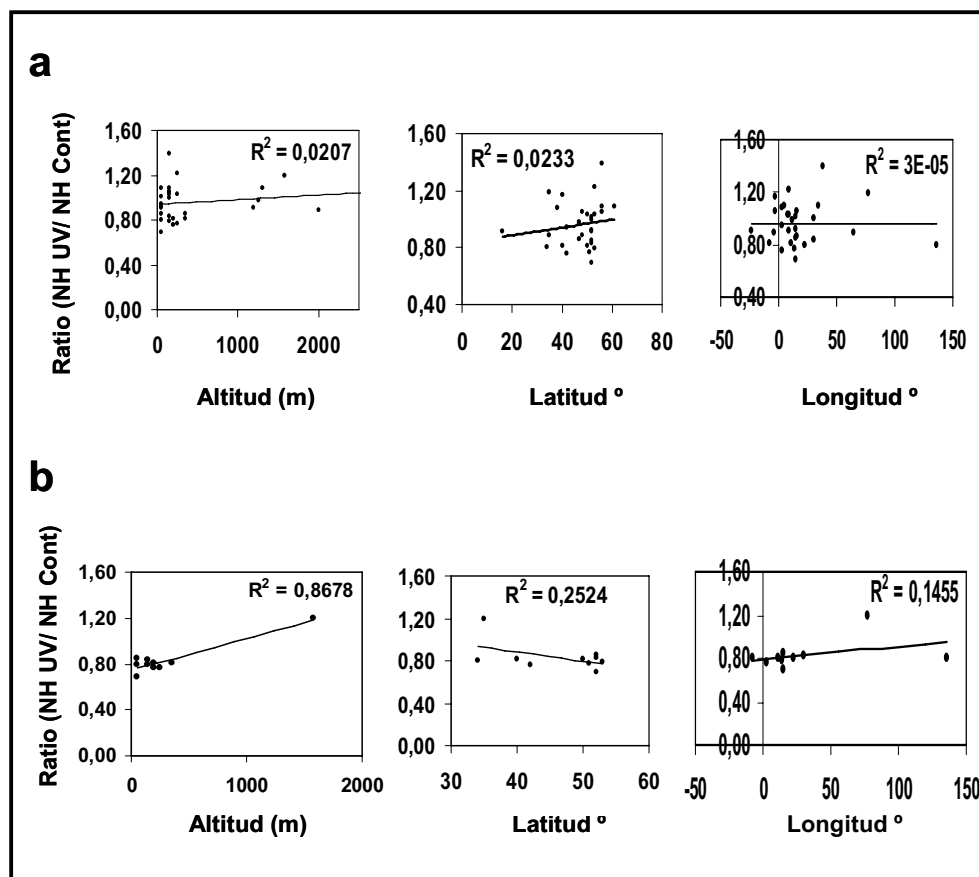


Figura 24. Correlación entre la respuesta a estrés en tiempo de floración y distintas coordenadas geográficas en accesiones silvestres de *Arabidopsis thaliana*.

Se muestra la correlación entre el valor medio de la proporción entre el tiempo de floración, expresado como número de hojas totales, de plantas irradiadas / no irradiadas (NH UV/ NH Cont). Se muestran las representaciones y análisis de regresión lineal para todo el panel de accesiones silvestres (a) o para el subgrupo de ecotipos que responden a la irradiación con luz UV-C (b). Para las medidas de altitud, latitud o longitud que en la tabla 1 se muestra como un rango, se representaron los valores intermedios.

De todas las accesiones analizadas se procedió a seleccionar aleatoriamente un subgrupo que incluyese ecotipos que responden o no a luz UV-C y se analizaron sus contenidos en SA para determinar si podía establecerse una correlación entre respuesta a estrés y niveles endógenos de SA. En la figura 25 se muestra que existe una variación relativamente amplia en los contenidos basales de SA libre en diferentes ecotipos, oscilando desde 0,9 a 0,045 μg por gramo de peso fresco. El ecotipo que contiene una mayor concentración de SA endógeno es Can-0 con 0,91 $\mu\text{g/gPF}$, sin embargo no presenta apenas cambios en el tiempo de floración en respuesta a la irradiación con luz UV-C. El resto de ecotipos se pueden agrupar en tres grandes bloques según su contenido de SA basal libre, en el primero los ecotipos tienen unos valores entre 0,45 y 0,25 $\mu\text{g/gPF}$ que corresponden a los ecotipos Cvi-0 y WS-0 (que presenta el mayor adelanto en tiempo de floración al irradiar con UV-C, mientras que Cvi-0 no presenta diferencias), entre 0,2 y 0,1 $\mu\text{g/gPF}$ donde se encuentran los ecotipos de Gr-1 a N1 y el último grupo que presenta un contenido basal por debajo de 0,1 $\mu\text{g/gPF}$ en el que podemos encontrar los ecotipos que van desde Col-6 hasta Wt-1. De todos estos datos obtenidos entre los ecotipos analizados no podemos establecer una correlación entre la respuesta al factor de estrés y los niveles endógenos de SA que contienen.

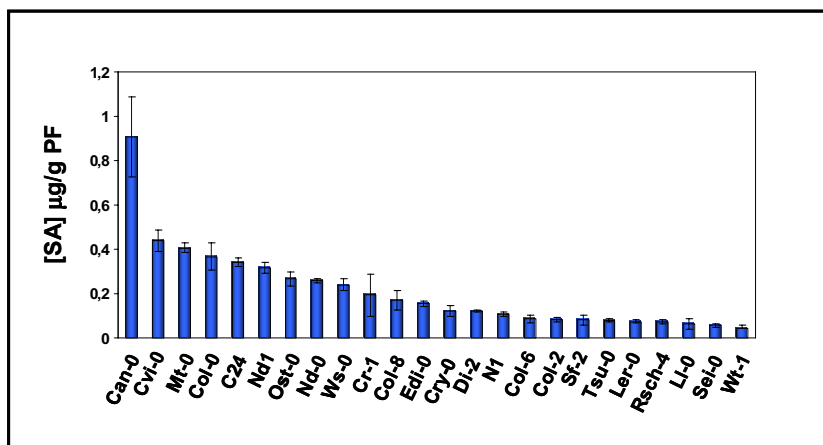


Figura 25. Medida de los niveles basales de SA en accesiones silvestres de *Arabidopsis thaliana*. Cuantificación de SA libre basal en hojas de plantas cultivadas hasta tener 15 hojas de roseta en condiciones no inductoras de la floración (D.C.). El SA se analizó por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Las barras verticales representan el contenido medio de SA en microgramos por gramo de peso fresco. Las barras de error representan el error estándar.

Para profundizar en el análisis de la variación genética natural en la floración acelerada por estrés en *Arabidopsis*, se escogieron dos accesiones (Col-5 y Fei-0) que responden adelantando la floración y dos (Nd-1 y Ler-0) que no responden a la irradiación con luz UV-C. Se irradiaron plantas Col-5, Fei-0, Nd-1 y Ler-0 con dosis crecientes de luz UV-C (0, 50, 100, 200 y 500 mJ cm⁻²) el quinto día tras la siembra para ver su respuesta en tiempo de floración (Fig. 26 a). En plantas Col-5 y Fei-0, la aceleración es dependiente de la dosis de irradiación, mientras que plantas Nd-1 y Ler-0 no responden a ningún nivel de irradiación. Estas accesiones son los parentales de sendas colecciones Col-5 x Nd-1 y Fei-0 x Ler-0 de líneas híbridas recombinantes (RILs). De la colección Col-5 x Nd-1, que es de uso público, seleccionamos una representación aleatoria de 30 líneas que analizamos en términos de tiempo de floración en plantas irradiadas o no con luz UV-C al quinto día tras la siembra. La figura 26 b muestra el tiempo de floración cuantificado como el número total de hojas (NH) a la subida a flor \pm el error estándar (EE) de una población de nueve individuos por línea y tratamiento, así como el ratio entre los valores obtenidos y la diferencia en el número de hojas. De los resultados obtenidos se deduce que para el carácter de floración acelerada por estrés puede detectarse transgresión siendo alguna de las RILs analizadas más extremas en fenotipo que sus correspondientes plantas parentales.

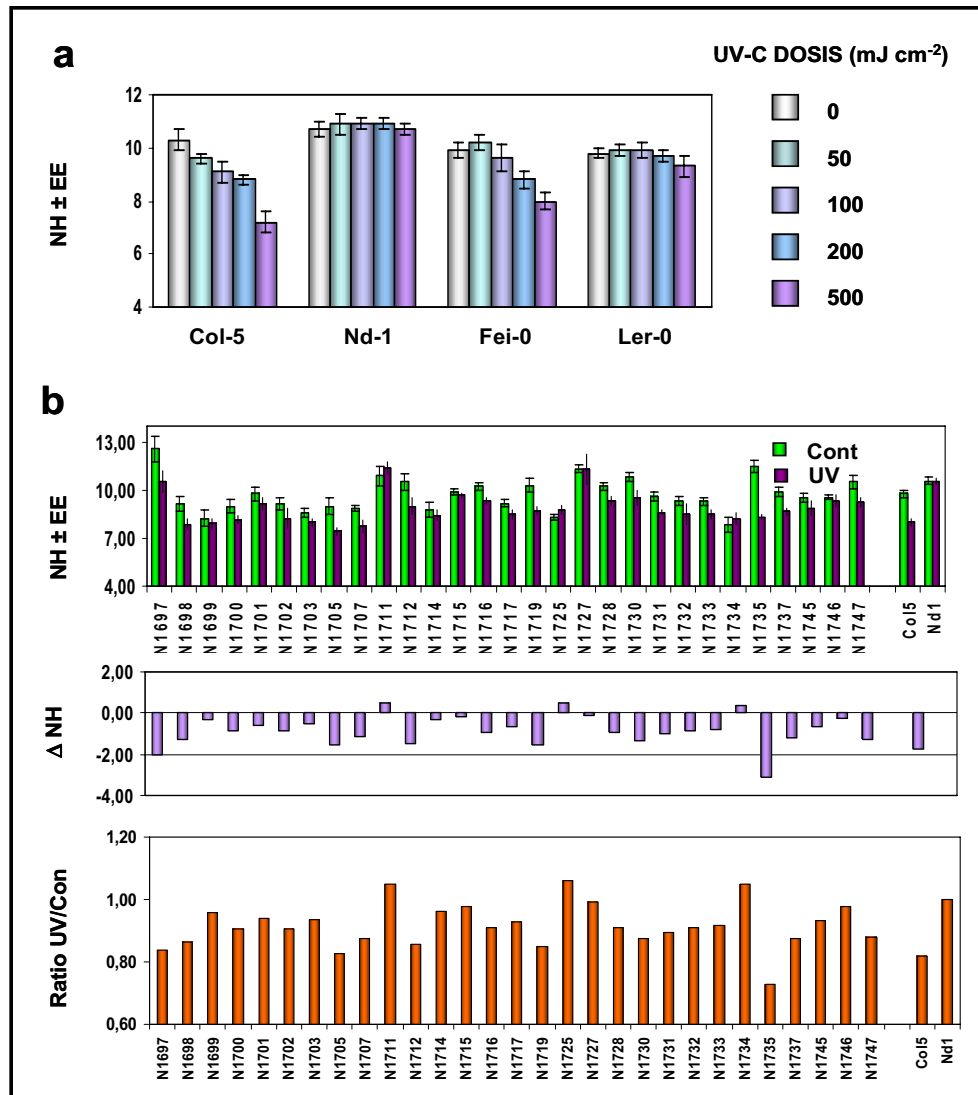


Figura 26. Análisis del tiempo de floración en respuesta a estrés en ecotipos sensibles e insensibles a la irradiación con luz UV-C y en líneas híbridas recombinantes (RILs) Col-5 x Nd-1.

(a) El tiempo de floración de los distintos ecotipos se cuantificó como el número total de hojas (NH) a la subida a flor. Las barras corresponden a la media de los valores obtenidos para cada población (n=9) de plantas no irradiadas o irradiadas con luz UV-C a distintas dosis (0, 50, 100, 200 y 500 mJ cm⁻²) el quinto día tras la germinación. Las barras de error representan el error estándar (EE). (b) En el panel superior, el tiempo de floración de las distintas RILs se cuantificó como el número total de hojas (NH) a la subida a flor. Las barras verdes y moradas corresponden, respectivamente, a la media de los valores obtenidos para cada población (n=9) de plantas irradiadas (UV) y no irradiadas (Cont) con luz UV-C (200 mJ cm⁻²) el quinto día tras la germinación. Se incluyen los valores correspondientes a los parentales Col-5 y Nd-1. Las barras de error representan el error estándar (EE). En los paneles inferiores se representa la diferencia en el número de hojas (Δ NH) y la proporción (Ratio UV/Con) al irradiar o no las plantas de las diferentes RILs.

Discusión

Discusión

Cambios en los niveles endógenos de ácido salicílico correlacionan con el tiempo de floración.

En *Arabidopsis*, el momento en que se produce la transición a la floración está finamente regulado y viene determinado por la interacción entre la competencia de la planta para su desarrollo interno y las señales medioambientales que determinan las condiciones favorables para que se dé el suceso reproductivo. Sin embargo, bajo condiciones medioambientales que causan estrés se hace necesario activar el programa de floración prematuramente con el objeto de aumentar las posibilidades de pervivencia de las plantas produciendo semillas que puedan encontrar condiciones más favorables para la germinación y posterior crecimiento. Aunque el proceso de transición a la floración en *Arabidopsis* ha sido ampliamente caracterizado, nada se sabe hasta el momento del mecanismo capaz de activar la floración en respuesta a factores de estrés. Algunos factores de estrés capaces de alterar el tiempo de floración, como la infección por patógenos, temperaturas extremas o altas irradiaciones, conllevan un incremento en los niveles de algunos metabolitos como etileno, ácido abscísico y SA (Blee, 2002; Dempsey *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 1996; Pastori y Foyer, 2002; Raskin, 1992).

Estudios recientes apuntan la posibilidad de que SA sea un regulador de la transición a la floración en plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés (Martínez *et al.*, 2004). Para que se produzca un adelanto en el tiempo de floración en plantas sometidas a irradiación con luz UV-C es necesaria tanto la síntesis como la acumulación de SA, ya que en plantas transgénicas nahG, que no acumulan SA ya que lo degradan rápidamente a catecol, no se produce adelanto en la floración. Sin embargo, se desconoce en gran medida el mecanismo mediante el cual SA regula el tiempo de floración. Con el objeto de abordar esta cuestión, al inicio del presente trabajo se determinó el espacio temporal en el que se correlacionan cambios en los niveles endógenos de SA con la activación de la expresión de genes que inducen la transición floral. Los cambios en los niveles endógenos de SA fueron monitorizados mediante plantas transgénicas en las que el promotor de *BGL2*, gen *PR* inducible por SA, está fusionado al gen reportador GUS, el uso de esta construcción permite no sólo ver si se producen cambios, si no además ver donde están localizados.

En trabajos anteriores se ha establecido la ventana de transición floral entre el cuarto y sexto día tras la siembra, monitorizando la expresión del gen de identidad del

meristemo *LEAFY* (*LFY*) en plantas transgénicas *LFY:GUS* (Blázquez *et al.*, 1997). En nuestras condiciones de cultivo los cambios detectados en los niveles endógenos de SA se dan el décimo día tras la siembra. Esta diferencia viene determinada probablemente por las distintas condiciones de cultivo: cantidad y calidad de la luz y temperatura de crecimiento. Cerdán y Chory (2003) demostraron que cambios en las condiciones de iluminación durante el cultivo de las plantas afectan al tiempo de floración. De hecho, un enriquecimiento de la luz en rojo lejano y rojo, conlleva un ligero retraso en el tiempo de floración. Bajo nuestras condiciones de cultivo, el décimo día tras la siembra se da un aumento tanto de los niveles de tinción GUS, asociados al tejido vascular, como de la expresión del gen *ICS1/SID2* que codifica la isocorismato sintasa 1 encargada de sintetizar SA en *Arabidopsis* (Wildermuth *et al.*, 2001). Este incremento va acompañado de la inducción de la expresión del gen activador de la floración *FT*, cuya proteína actúa como señal encargada de activar la transición floral, sintetizándose en las hojas y traslocándose a través de los haces vasculares hasta el meristemo apical del tallo donde se induce el cambio de fase vegetativa a reproductiva (Jaeger y Wigge, 2007; Lin *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2007; Corbesier *et al.*, 2007).

PCC1 relaciona ácido salicílico con el reloj circadiano y la vía de fotoperiodo.

Una vez localizada la ventana temporal donde se observan cambios en los niveles endógenos de SA en nuestras condiciones de cultivo, se intentó identificar componentes que participasen en la regulación de la transición floral por SA. Del análisis comparado de los transcriptomas de plantas Col-0 *versus* plantas deficientes en SA durante la ventana temporal en la que cambios en los niveles endógenos de SA pueden correlacionarse con la transición floral, pueden identificarse genes diferencialmente regulados por SA y potenciales reguladores del tiempo de floración. El análisis transcriptómico se hizo tomando las plantas *nahG*, *sid2-1* y *eds5-3* como diferentes réplicas de una muestra única, correspondiente a la categoría deficiente en SA, frente a plantas silvestres, con metabolismo y señalización de SA normales. Este tipo de análisis es muy restrictivo ya que sólo se validan como genes diferencialmente expresados aquellos que lo estén en los tres genotipos deficientes en SA. De esta manera se evitan aquellos genes cuya expresión diferencial sea específica de un determinado genotipo mutante pero que no se comparte en otros mutantes cuyo fenotipo de tiempo de floración es similar. Del resultado del análisis transcriptómico, se obtuvieron 15 genes diferencialmente expresados de los que 13 genes están

sobreexpresados y 2 genes están subexpresados en plantas deficientes en SA. A este nivel, un filtro adicional permitiría hacer una selección aún mayor de los genes candidatos a regulador dependiente de SA de la transición floral. Puesto que la irradiación con luz UV-C conduce a la floración temprana en plantas silvestres pero no en plantas nahG, los candidatos a activadores deberían ser genes activados por luz UV-C en plantas Col-0 y no en nahG y los candidatos a represores deberían ser reprimidos por luz UV-C sólo en las plantas silvestres. De los 15 genes, sólo *PCCI* (At3g22231) se induce en respuesta a luz UV-C en plantas silvestres pero no en nahG, lo que lo convierte en un posible activador de la floración, y dos genes, At1g44740 y *PLETHORA 2* (*PLT2*, At1g51190), se encuentran reprimidos por luz UV-C en Col-0 pero no en nahG, y podrían, por tanto, actuar como represores de la floración. Según los datos publicados en Genevestigator, At1g44740 alcanza la máxima expresión cuando en la planta comienza a crecer el tallo principal y se encuentra reprimido en respuesta a SA y ozono, mientras que para *PLT2* el máximo de expresión se alcanza al inicio de la fase juvenil y en silicuas y se encuentra ligeramente reprimido en respuesta a ozono y *Pseudomonas syringae*. En cuanto a *PCCI*, *Pathogen and Circadian Controlled 1*, está descrito que responde al ataque por patógenos, evento caracterizado por la síntesis de SA, y muestra una expresión basal regulada por el reloj circadiano que aumenta su expresión al principio de la fase de luz alcanzando el máximo a las 8 horas para decaer en la fase de oscuridad. (Sauerbrunn y Schlaich, 2004). El hecho de que en la regulación de *PCCI* confluyan SA y un mecanismo como el reloj circadiano, funcionalmente relacionado con la regulación de la floración, le convertía en un potencial candidato para mediar entre SA y la regulación del tiempo de floración. Así pues, centramos el trabajo en su caracterización molecular y funcional.

Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran que la expresión de *PCCI* está regulada por el reloj circadiano. Bajo nuestras condiciones de cultivo su expresión cicla a lo largo del día alcanzando el máximo de expresión al final de la fase de luz. El retraso en el pico de expresión a lo largo del fotoperiodo comparado con los resultados obtenidos por Sauerbrunn y Schlaich (2004) es debido a las condiciones de iluminación (fotoperiodos de 12 horas en su caso y días largos de 16 horas en el nuestro) y temperatura durante el cultivo de las plantas. La expresión de *PCCI* es estrictamente dependiente de la síntesis, acumulación y señalización de SA y su activación requiere la función del gen de tiempo de floración *CO*. La reducida expresión de *PCCI* en las plantas deficientes en SA puede ser debido a la incapacidad de estas plantas para alcanzar la máxima expresión de *CO* al final

del periodo de luz. En el presente trabajo, se pone de manifiesto que las plantas deficientes en SA además de no mostrar expresión de *PCCI* muestran sobreexpresión constitutiva del componente del reloj *CCA1*. La sobreexpresión de *CCA1* conlleva la pérdida de regulación circadiana de *CO*, trabajos anteriores ya apuntan que la sobreexpresión de genes que codifican proteínas del reloj circadiano (*LHY* y *CCA1*) causa la pérdida de ritmo de los genes de salida del reloj circadiano (Schaffer *et al.*, 1998; Wang y Tobin, 1998), entre los que se encuentra *CO*. Estos datos sugieren un papel de SA como regulador del reloj circadiano o de las rutas de salida del reloj. Al irradiar plantas transgénicas de pérdida y ganancia de función de *CCA1* con luz UV-C se observa que el mutante de pérdida de función *cca1-1* no consigue activar los niveles de transcrito de *PCCI*. Esto puede ser debido a que la pérdida de función de *CCA1* cause la desregulación de los niveles de transcrito de *CO*, cuya expresión está modulada por el reloj circadiano (Suárez-López *et al.*, 2001), y *PCCI* requiere la función de *CO* para inducirse.

PCCI participa en la regulación del tiempo de floración.

Analizando el patrón de expresión temporal de *PCCI* encontramos que en plantas no sometidas a estrés cultivadas en condiciones de días largos, su expresión depende del estado de desarrollo de la planta, lo que le convierte en un candidato a regulador de las transiciones de fase durante el desarrollo. *PCCI* presenta niveles de expresión muy bajos en plántula y se incrementan tanto en hojas de roseta como caulinares de plantas adultas, alcanzando la máxima expresión en hojas de roseta senescentes, proceso en el que está descrito que se activa la síntesis de SA (Morris *et al.*, 2000). Estos resultados relacionan niveles de SA con desarrollo ya que *PCCI* se induce únicamente por SA (ver figura 6). Los datos obtenidos, corroboran los incluidos en la base de datos del Genevestigator, donde se muestra que *PCCI* se expresa mayoritariamente en fase adulta, en hojas de roseta y peciolo.

Mediante la generación de plantas transgénicas de pérdida y ganancia de función de *PCCI* en distintos fondos genéticos de *Arabidopsis*, se ha demostrado que la alteración de la expresión del gen *PCCI* conlleva cambios en el fenotipo de tiempo de floración de las correspondientes plantas transgénicas. La reducción de la expresión de *PCCI* mediante técnicas de interferencia de RNA en fondo genético silvestre y en fondo mutante *fve-3*, conlleva un retraso del tiempo de floración, y la sobreexpresión del gen un adelanto del mismo. En cambio, en el fondo mutante *co-1* el tiempo de floración es independiente del nivel de transcrito de *PCCI*, lo que sugiere que el adelanto en la floración promovido por

PCCI, requiere la funcionalidad de *CO*. El retraso en el tiempo de floración de las líneas RNAi de *PCCI* en fondo silvestre, conlleva niveles de expresión más bajos del gen integrador *FT*, mientras que los niveles de *SOCI* permanecen constantes. Estos datos sugieren que *PCCI* interaccionaría con la vía de fotoperiodo en algún punto entre *CO* y *FT*. Además, el fenotipo de las líneas de sobreexpresión en fondo Col-0 cultivadas en condiciones de día largo es muy parecido al silvestre, mientras que las líneas de RNAi, poseen un fenotipo parecido al del mutante *ft-4*. Son claramente más tardías y presentan una roseta más compacta y con hojas más grandes y tallos más gruesos. Las líneas de RNAi presentan un diámetro de tallo y una longitud de silicua mayor y la disposición de las silicuas alrededor del tallo también se ven alteradas. El tamaño de la flor es mayor en las líneas de RNAi, así como los órganos que la integran: pistilo, estambres, pétalos y sépalos. Todas estas características fenotípicas están presentes también en plantas *ft-4*, lo que sugiere que el fenotipo de las plantas RNAi para *PCCI* podría ser mayoritariamente debido a la función reducida de *FT*.

Se han encontrado también dos loci (At3g22235 y At3g22240) que parecen ser duplicaciones génicas de *PCCI* y que muestran una alta homología de secuencia de nucleótidos. Según los datos publicados en Genevestigator, At3g22240 se reprime en respuesta a SA y *Pseudomonas syringae*, mientras que no hay datos de At3g22235. Mediante RT-PCR no se detectó reducción de los niveles de transcrito de ninguno de los dos genes (At3g22235 y At3g22240) en ninguna de las líneas generadas, y sólo la expresión de *PCCI* se encuentra muy reducida. Esto indica que el fenotipo de floración tardía detectado en las líneas RNAi de *PCCI*, es debido específicamente a la reducción del transcrito de *PCCI*.

Los niveles de SA de las líneas de sobreexpresión y RNAi de *PCCI* en fondo Col-0 no presentaron alteraciones ni en los niveles basales ni al ser sometidas a irradiación con UV-C respecto del control Col-0 no transformado, lo que indica que *PCCI* no interfiere en la síntesis de SA.

Otras funciones para *PCCI*.

Se estudió el comportamiento de las líneas transgénicas de sobreexpresión y de RNAi, en los diferentes fondos genéticos Col-0, *co-1* y *fve-3*, en otros procesos que requieren la síntesis de SA, como son la defensa frente a patógenos biotrofos (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990; Reymond y Farmer, 1998) y la senescencia (Morris *et al.*,

2000). Aunque Sauerbrunn y Schlaich (2004) proponen que la sobreexpresión de *PCCI* confiere resistencia a patógenos como *Hyaloperonospora parasitica*, nuestros datos no son determinantes, sólo una de las líneas de sobreexpresión de *PCCI* en fondo Col-0 y otra en fondo *co-1* presentan mayor resistencia frente a *Pseudomonas syringae*. En cambio, la línea *RNAi* de *PCCI* en el fondo mutante *fve-3* muestra mayor resistencia que el mutante *fve-3* que es ya más resistente que la planta silvestre.

A pesar de lo publicado por Buchanan-Wollaston y colaboradores (2005) donde se sugiere que SA tendría un papel en la senescencia natural y no en la senescencia forzada por oscuridad en hojas cortadas, *PCCI* no parece tener ningún efecto en condiciones de senescencia natural. Sin embargo, en condiciones de senescencia forzada por oscuridad *PCCI* podría tener una función antisenescente ya que las líneas de *RNAi* en fondo silvestre presentan síntomas de senescencia anteriores a los observados en el control silvestre Col-0.

El análisis de los mutantes de la vía de fotoperiodo frente a *Pseudomonas syringae* revela que de todos ellos sólo *co-1* se muestra más resistente, lo que sugiere que CO pueda tener un papel como modulador negativo en la activación de resistencia. Aunque el mutante *co-1* puede activar la expresión de *PR-1* en plantas irradiadas con luz UV-C, la activación de la síntesis de SA y la concomitante expresión de *PCCI* están significativamente afectadas. Estos datos sugieren que CO podría jugar una doble función en la activación de resistencia en *Arabidopsis*, una dependiente y otra independiente de SA. Alternativamente, la activación de la síntesis de SA en respuesta a luz UV-C podría implicar la participación de dos vías de señalización. Una de las vías, independiente de CO, participaría en la activación de resistencia frente a patógenos, y la otra, dependiente de CO, regularía procesos del desarrollo como la transición floral.

¿Qué confiere a PCCI su función reguladora?

PCCI es una pequeña proteína de 8,5 kDa y un punto isoelectrico de 3,99 que no contiene ningún dominio característico y que podría tener localización cloroplástica. La proteína tiene 7 residuos de cisteína en su extremo carboxilo terminal lo que le hace próxima a péptidos antimicrobianos ricos en cisteína de plantas como las tioninas y las defensinas. En este dominio rico en cisteínas la proteína *PCCI* contiene una secuencia conservada en el péptido antimicrobiano hepcidina presente en numerosos organismos y que parece participar en la homeostasis del hierro en el hígado de animales. Sin embargo, la sobreexpresión de *PCCI* no conduce a un aumento en la resistencia de la planta frente a la

bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae*. Se requerirá más experimentación para analizar hasta que punto la proteína PCC1 podría tener actividad antimicrobiana. Por otra parte, el dominio rico en cisteína presenta también una alta similitud de secuencia con el correspondiente dominio de algunas tioredoxinas, lo que podría ser indicativo de una función redox para PCC1. Finalmente, el dominio rico en cisteínas de PCC1 es también bastante similar al presente en inhibidores de la familia de factores MyoD que regulan la miogénesis en animales. Esta similitud resulta interesante para la función que se propone en este trabajo para PCC1. Al igual que los inhibidores de MyoD modularían negativamente la diferenciación de mioblastos a células diferenciadas del músculo, PCC1 podría funcionar interaccionando con un factor de transcripción implicado en el mantenimiento del desarrollo vegetativo y resultando en la inhibición de este proceso y permitiendo la transición del meristemo apical vegetativo en reproductivo. Esta posible función resulta extremadamente interesante pero requiere más experimentación que está en curso. La proteína completa no presenta similitud de secuencia de aminoácidos con proteínas de otros organismos pero en *Arabidopsis PCCI* forma parte de una familia de 6 miembros de pequeños polipéptidos que mantienen cierta homología en la secuencia de aminoácidos, At1g05340, At1g56000, At2g32190, At2g32200, At2g32210 y At3g22231 (*PCCI*). Todos estos genes excepto At1g56000 codifican proteínas con dominios carboxilo terminales ricos en cisteínas pero ninguno de ellos a excepción de PCC1 conserva las secuencias típicas de las hepcidinas, de las tioredoxinas o de los inhibidores de MyoD mencionados anteriormente. Por otra parte, ninguno de ellos excepto *PCCI* estaba diferencialmente regulado en plantas deficientes en SA cuando comparamos sus transcriptomas con el de plantas silvestres Col-0. En cambio, los datos obtenidos de la base de datos Genevestigator, indica que los miembros de esta familia están fuertemente inducidos en plantas irradiadas con luz UV-B o tratadas con ozono. Estos datos sugieren que PCC1 podría ser uno de los componentes de una familia de pequeñas proteínas cuya expresión está regulada por SA, pero PCC1 contiene elementos diferenciales en su secuencia que le podrían permitir ejecutar funciones específicas y diferenciadas del resto de miembros de la familia.

Variación natural. Otra aproximación.

Aunque con los datos obtenidos entre los ecotipos analizados no podemos establecer una correlación entre la respuesta al factor de estrés y los niveles endógenos de SA que contienen, el estudio de la variación genética natural en *Arabidopsis thaliana* se

confirma como una alternativa válida para el estudio de la transición floral activada por luz UV-C, ya que para el carácter de floración acelerada por estrés puede detectarse trasgresión, siendo el fenotipo de alguna de las RILs analizada más extremo que el de sus correspondientes parentales. En nuestro caso se analizaron 30 líneas de los parentales Col5 Nd1, pero también se podían haber empleado líneas de los parentales Fei0 Ler0. Sin embargo, para poder identificar QTLs implicados en el carácter de estudio sería necesario analizar un número mayor de líneas recombinantes.

Conclusiones

Conclusiones

1. La correlación entre los cambios detectados en los niveles endógenos de ácido salicílico asociados al tejido vascular y la concomitante expresión de genes de tiempo de floración nos ha permitido acotar alrededor del décimo día tras la siembra los eventos regulados por ácido salicílico que participan potencialmente en el control del tiempo de floración.
2. El análisis transcriptómico comparado de plantas deficientes en ácido salicílico y de floración tardía frente a plantas silvestres ha permitido identificar 15 genes diferencialmente expresados. De los candidatos identificados, se seleccionaron posteriormente tres genes mediante un filtro resultante de aplicar el criterio de inducción o represión por luz UV sólo en plantas silvestres, que responden a luz UV adelantando la floración, y no en plantas incapaces de acumular ácido salicílico, que no responden a dicho estímulo. Sólo el gen *PCCI*, que codifica la proteína denominada Pathogen and Circadian Controlled1, funcionaría como un potencial activador de la transición floral dependiente de ácido salicílico y se ha seleccionado para su posterior caracterización molecular y funcional.
3. La expresión del gen *PCCI* está regulada a lo largo del desarrollo de la planta y requiere de la síntesis, acumulación y señalización de ácido salicílico, así como de la correcta función del reloj circadiano y del gen *CONSTANS* regulado por el reloj.
4. La generación y caracterización de plantas transgénicas, con expresión reducida o aumentada del gen *PCCI*, ha permitido comprobar que *PCCI* participa tanto en la regulación del tiempo de floración en plantas de *Arabidopsis* como en la floración acelerada que causa la irradiación con luz UV, un factor de estrés que induce la síntesis de ácido salicílico en plantas.
5. Este trabajo recoge la identificación y caracterización del primer componente descrito que participa en la regulación dependiente de ácido salicílico del tiempo de floración. Sin embargo, la floración acelerada por estrés y dependiente de ácido salicílico es un

Conclusiones

proceso complejo y, muy probablemente, resulte de la interacción de múltiples factores endógenos y exógenos. El análisis de la variación genética natural de dicho carácter en diferentes accesiones silvestres y líneas híbridas recombinantes de *Arabidopsis* sugiere que el análisis de la variación genética natural puede ser, junto con las técnicas moleculares, una herramienta útil para la identificación de otros componentes que participen junto con PCC1 en la regulación de la floración acelerada por estrés.

Bibliografia

Bibliografía

Abeles, F.B., Morgan, P.W., Salveit, M.E. (1992). Ethylene in plant Biology. Academic Press, San Diego, Vol.2

Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Iwahashi, H., Rakwal, R. (2003). Importance of ascorbate peroxidases OsAPX1 and OsAPX2 in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. *Gene* **322**: 93-103.

Agrios, G.N. (1988). Plant Pathology. London: Academic Press.

Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P., Kay, S.A. (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science* **293**: 880-883.

Alabadí, D., Yanovsky, M.J., Mas, P., Harmer, S.L., Kay, S.A. (2002). Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in Arabidopsis. *Current Biology* **12**: 757-761.

Allada, R., Emery, P., Takahashi, J.S., Rosbash, M. (2001). Stopping time: The genetics of fly and mouse circadian clocks. *Annual Review of Neuroscience* **24**:1091-1119.

Alonso-Blanco, C., El-Assal, S.E.D., Coupland, G., Koornneef, M. (1998). Analysis of natural allelic variation at flowering time loci in the Landsberg erecta and Cape Verde islands ecotypes of Arabidopsis thaliana. *Genetics* **149** (2): 749-764.

Amasino, R.M. (1986). Acceleration of nucleic acid hybridisation rate by polyethylene glycol. *Analytical Biochemistry* **152**: 304-307.

Ausín, I., Alonso-Blanco, C., Jarillo, J.A., Ruiz, L., Martínez-Zapater, J.M. (2004). Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nature Genetics* **36**: 162-166.

Ausín, I., Alonso-Blanco, C., Martínez-Zapater, J.M. (2005). Environmental regulation of flowering. *International Journal of Developmental Biology* **49**: 689-705.

Barak, S., Tobin, E.M., Andronis, C., Sugano, S., Green, R.M. (2000). All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends in Plant Science* **5**: 517-522.

Bechtold, N., Pelletier, G. (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology* **82**: 259-266.

Beckers, G.J.M., Spoel, S.H. (2006). Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* **8**: 1-10.

Bi, Y-M., Kenton, P., Mur, L., Darby, R., Draper, J. (1995). Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant Journal* **8**: 235-245.

Blázquez, M.A., Soowal, L.N., Lee, I., Weigel, D. (1997). LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* **124** (19): 3835-3844.

Blázquez, M.A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R., Weigel, D. (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* **10**: 791-800.

Blázquez, M.A., Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* **404**: 889-892.

Blázquez, M.A., Trenor, M., Weigel, D. (2002). Independent control of gibberellin biosynthesis and flowering time by the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **130**: 1770-1775.

Blee, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* **7** (7): 315-321.

Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleissner, R., Wisman, E., Apel, K., Melzer, S. (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **24**: 591-599.

Bowman, J.L. (1994). *Arabidopsis*. An atlas of morphology and development. Springer-Verlag.

Brederode, F.T., Linthorst, H.J.M., Bol, J.F. (1991). Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Molecular Biology* **17**: 1117-1125.

Briggs, W.R., Christie, J.M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7** (5): 204-210.

Brown, S.A., Schibler, U. (1999). The ins and outs of circadian timekeeping. *Current Opinion in Genetics & Development* **9**: 588-594.

Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V.A., Todo, T., Tainer, J.A., Getzoff, E.D. (2003). Identification of a new cryptochrome class: Structure, function, and evolution. *Molecular Cell* **11**: 59-67.

Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.F., Wu, S.H., Swidzinski, J., Ishizaki, K., Leaver, C.J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **42**: 567-585.

Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., Dong, X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* **6** (11): 1583-1592.

Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., Liu, D.M. (1999). Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**: 760-765.

Cerdán, P.D., Chory, J. (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature* **423** (6942): 881-885.

Chen, H.H., Li, P.H., Brenner, M.L. (1983). Involvement of abscisic-acid in potato cold-acclimation. *Plant Physiology* **71** (2): 362-365.

Cho, H.Y., Tseng, T.S., Kaiserli, E., Sullivan, S., Christie, J.M., Briggs, W.R. (2007). Physiological roles of the light, oxygen, or voltage domains of phototropin 1 and phototropin 2 in Arabidopsis. *Plant Physiology* **143** (1): 517-529

Chou, C.H., Patrick, Z.A. (1976). Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. *Journal of Chemical Ecology* **2** (3): 369-387.

Cipollini, D., Enright, S., Traw, M.B., Bergelson, J. (2004). Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of Arabidopsis thaliana to Spodoptera exigua. *Molecular Ecology* **13**: 1643-1653.

Clack, T., Mathews, S., Sharrock, R.A. (1994). The Phytochrome Apoprotein Family in Arabidopsis Is Encoded by 5 Genes - the Sequences and Expression of PhyD and PhyE. *Plant Molecular Biology* **25**: 413-427.

Clarke, J.D., Aarts, N., Feys, B.J., Dong, X.N., Parker, J.E. (2001). Constitutive disease resistance requires EDS1 in the Arabidopsis mutants cpr1 and cpr6 and is partially EDS1-dependent in cpr5. *Plant Journal* **26**: 409-420.

Cleland, C.F. (1974). Isolation of flower-inducing and flower-inhibitory factors from aphid honeydew. *Plant Physiology* **54** (6): 899-903

Cleland, C.F., Ajami, A. (1974). Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiology* **64**: 421-424.

Cleland, C.F., Takana, O. (1979). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of plant Physiology. Plant Molecular Biology* **48**: 355-381.

Clouse, S.D., Sasse, J.M. (1998). Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **49**: 427-451

Corbesier, L., Gadisseur, I., Silvestre, G., Jacquard, A., Bernier, G. (1996). Design in *Arabidopsis thaliana* of a synchronous system of floral induction by one long day. *Plant Journal* **9**: 947-952.

Corbesier, L. Coupland, G. (2006). The quest for florigen: a review of recent progress. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3395-3403.

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316** (5827): 1030-1033.

Covington, M.F., Panda, S., Liu, X.L., Strayer, C.A., Wagner, D.R., Kay, S.A. (2001). ELF3 modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13** (6): 1305-15.

Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. (1996). Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807.

Dean, T.R., Sheldon, C.C., Bagnall, D.J., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (2002). FLC, a repressor of flowering, is regulated by genes in different inductive pathways. *Plant Journal* **29**: 183-191.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gutrella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J. (1994). A Central Role of Salicylic-Acid in Plant-Disease Resistance. *Science* **266**: 1247-1250.

Delaney, T.P., Friedrich, L., Ryals, J.A. (1995). *Arabidopsis* Signal-Transduction Mutant Defective in Chemically and Biologically Induced Disease Resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 6602-6606.

Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 547-575.

Devoto, A., Turner, J.G. (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Annals of Botany* **92**: 329-337.

Dong X.N., Mindrinos M., Davis K.R. (1991). Induction of *Arabidopsis* defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas-syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *Plant cell* **3** (1): 61-72.

Dong, X.N. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 316-323.

Dong, X.N. (2001). Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 309-314.

Dong, X.N., Li, X., Zhang, Y.L., Fan, W.H., Kinkema, M., Clarke, J. (2001). Regulation of systemic acquired resistance by NPR1 and its partners. *Rice Biotechnology: Improving Yield, Stress Tolerance and Grain Quality* **236**: 165-175.

Dowson-Day, M.J., Millar, A.J. (1999). Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **17**: 63-71.

Doyle, M.R., Davis, S.J., Bastow, R.M., McWatters, H.G., Kozma-Bognar, L., Nagy, F., Millar, A.J., Amasino, R.M. (2002). The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **419**: 74-77.

Durrant, W.E., Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185-209.

Edery, I. (1999). Role of posttranscriptional regulation in circadian clocks: Lessons from *Drosophila*. *Chronobiology International* **16**: 377-414.

Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Oxford University Press. *Nucleic Acids research* **19** (6): 1349.

Eriksson, M.E., Millar, A.J. (2003). The circadian clock. A plant's best friend in a spinning world. *Plant Physiology* **132**: 732-738.

Farre, E.M., Harmer, S.L., Harmon, F.G., Yanovsky, M.J., Kay, S.A. (2005). Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the Arabidopsis circadian clock. *Current Biology* **15**: 47-54.

Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., Parker, J.E. (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *Embo Journal* **20**: 5400-5411.

Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275-296.

Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Coupland, G., Putterill, J. (1999). GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *Embo Journal* **18**: 4679-4688.

Fraser, R.S.S. (1981). Evidence for the occurrence of the "pathogenesis-related" proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering. *Physiological Plant Pathology* **19**: 69-76.

Glazebrook, J. (1999). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 280-286.

Glazebrook, J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis - 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 301-308.

Goodman, R.N., Novacky, A.J. (1994). The hypersensitive reaction in plants to pathogen. A resistance phenomena. St. Paul, MN:APS Press.

Goto, N. (1981). Enhancement of gibberellic acid effect by 5-bromodeoxyuridine, salicylic acid and benzoic acid on the flowering of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Information Service* **18**: 157-160.

Gozzo, F. (2003). Systemic Acquired Resistance in Crop Protection: From Nature to a Chemical Approach. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **51 (16)**: 4487-4503.

Grant, M., Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 414-420.

Green, R.M., Tobin, E.M. (1999). Loss of the circadian clock-associated protein I in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4176-4179.

Halliday, K.J., Hudson, M., Ni, M., Qin, M., Quail, P.H. (1999). *poc1*: an *Arabidopsis* mutant perturbed in phytochrome signaling because of a T DNA insertion in the promoter of PIF3, a gene encoding a phytochrome-interacting bHLH protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96 (10)**: 5832-5837.

Hanano, S., Domagalska, M.A., Nagy, F., Davis, S.J. (2006). Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes to Cells* **11**: 1381-1392.

Harborne, J.B. (1980). Plant phenolics. In EA Bell, BV Charlwood, eds, *Secondary Plant Products*. Springer-Verlag, Berlin, 329-402.

Harmer, S.L., Kay, S.A. (2005). Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 1926-1940.

Hayama, R. Coupland, G. (2003). Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 13-19.

He, Y.K., Tang, R.H., Hao, Y., Stevens, R.D., Cook, C.W., Am, S.M., Jing, L.F., Yang, Z.G., Chen, L.G., Guo, F.Q., Fiorani, F., Jackson, R.B., Crawford, N.M., Pei, Z.M. (2004). Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* **305**: 1968-1971.

Heil, M., Baldwin, I.T. (2002). Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* **7**: 61-67.

Hepworth, S.R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A., Coupland, G. (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *Embo Journal* **21**: 4327-4337.

Hetherington, A.M., Quatrano, R.S. (1991). Mechanisms of action of abscisic-acid at the cellular-level. *New Phytologist* **119** (1): 9-32.

Hicks, K.A., Millar, A.J., Carre, I.A., Somers, D.E., Straume, M., MeeksWagner, D.R., Kay, S.A. (1996). Conditional circadian dysfunction of the Arabidopsis early-flowering 3 mutant. *Science* **274**: 790-792.

Hicks, K.A., Albertson, T.M., Wagner, D.R. (2001). EARLY FLOWERING3 encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1281-1292.

Howe, G.A., Lightner, J., Browse, J., Ryan, C.A. (1996). An octadecanoid pathway mutants (JL5) of tomato is compromised in signalling for defense against insect attack. *Plant Cell* **8**: 2067-2077.

Huang, T., Bohlenius, H., Eriksson, S., Parcy, F., Nilsson, O. (2005). The mRNA of the Arabidopsis gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* **309**: 1694-1696.

Hückelhoven, R. (2007). Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*.

Ingram, J., Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 377-403.

Jackson, A.O., Taylor, D.N. (1996). Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the interface. *Plant Cell* **8**: 1651-1668.

Jaeger, K.E., Wigge, P.A. (2007). FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. *Current Biology* **17**: 1050-1054.

Jarvis, A.P., Schaaf, O., Oldham, N.J. (2000). 3-Hydroxy-3-phenylpropanoic acid is an intermediate in the biosynthesis of benzoic acid and salicylic acid but benzaldehyde is not. *Planta* **212**: 119-126.

Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., Glazebrook, J. (1999). Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13583-13588.

Jirage, D., Zhou, N., Cooper, B., Clarke, J.D., Dong, X.N., Glazebrook, J. (2001). Constitutive salicylic acid-dependent signaling in *cpr1* and *cpr6* mutants requires PAD4. *Plant Journal* **26**: 395-407.

Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Dooner, H.K., Klessig, D.F. (2000). Resistance to turnip crinkle virus in Arabidopsis is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell* **12**: 677-690.

Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., Weigel, D. (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* **286**: 1962-1965.

Kikis, E.A., Khanna, R., Quail, P.H. (2005). ELF4 is a phytochrome-regulated component of a negative feedback loop involving the central oscillator components CCA1 and LHY. *Plant Journal* **44**: 300-313.

Kim, J., Yi H., Choi, G., Shin, B., Song P.S., Choi, G. (2003). Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell* **15 (10)**: 2399-2407.

Kim, H.J., Hyun, Y., Park, J.Y., Park, M.J., Park, M.K., Kim, M.D., Kim, H.J., Lee, M.H., Moon, J., Lee, I., Kim, J. (2004). A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **36**: 167-171.

Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**: 1960-1962.

Koornneef, M., Hanhart, C.J., Hilhorst, H.W.M., Karsen, C.M. (1989). In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic-acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis-thaliana*. *Plant Physiology* **90** (2): 463-469.

Koornneef, M., Hanhart, C.J., Vanderveen, J.H. (1991). A Genetic and Physiological Analysis of Late Flowering Mutants in *Arabidopsis-Thaliana*. *Molecular & General Genetics* **229**: 57-66.

Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C.J., Peeters, A.J.M. (1998a). Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* **148**: 885-892.

Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J.M., Soppe, W. (1998b). Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 345-370.

Kumar, S., Nanda, K.K., (1981a). GA3-caused and salicylic acid-caused changes in rnas associated with floral induction in *impatiens-balsamina* exposed to inductive and non-inductive photoperiods. *Indian Journal of Experimental Biology* **19** (10): 961-965.

Kumar, S., Nanda, K.K. (1981b). Gibberellic acid-caused and salicylic acid-caused formation of new proteins associated with extension growth and flowering of *impatiens-balsamina*. *Biologia plantarum* **23** (5): 321-327.

Kumar, S., Nanda, K.K. (1981c). Effect of gibberellic-acid and salicylic-acid on the activity and electrophoretic pattern of iaa-oxidase during floral induction in *impatiens-balsamina*. *Biologia plantarum* **23** (5): 328-334.

Kunkel, B.N., Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signalling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 325-331.

Kuno, N., Moller, S.G., Shinomura, T., Xu, X.M., Chua, N.H., Furuya, M. (2003). The Novel Myb Protein Early-Phytochrome-Responsive1 Is A Component of A Slave Circadian Oscillator in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 2476-2488.

Lamarck, J.B. (1778). *Flore Francaise* 3. L'imprimerie Royale, Paris, pp 537-539.

Laubinger, S., Marchal, V., Gentilhomme, J., Wenkel, S., Adrian, J., Jang, S., Kulajta, C., Braun, H., Coupland, G., Hoecker, U. (2006). Arabidopsis SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* **133**: 3213-3222.

Lee, H., Suh, S.S., Park, E., Cho, E., Ahn, J.H., Kim, S.G., Lee, J.S., Kwon, Y.M., Lee, I. (2000) The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes & Development* **14**: 2366-2376.

Lee, I., Michaels S.D., Masshardt, A.S. (1994). The late-flowering phenotype of *frigida* and mutations in *luminidependens* is suppressed in the *landsberg erecta* strain of Arabidopsis. *Plant Journal* **6** (6): 903-909.

León, J., Yalpani, N., Raskin, I., Lawton, M.A. (1993). Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology* **103**: 323-328.

Levy, Y.Y., Dean, C. (1998). The transition to flowering. *Plant Cell* **10** (12): 1973-1989.

Lin, C.T., Shalitin, D. (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 469-496.

Lin, M.K., Belanger, H., Lee, Y.J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K., Miura, E., Xoconostle-Cazares, B., Gendler, K., Jorgensen, R.A., Phinney, B., Lough, T.J., Lucas, W.J. (2007). FLOWERING LOCUS T Protein May Act as the Long-Distance Florigenic Signal in the Cucurbits. *Plant Cell* **19** (5): 1488-1506.

Linthorst, H.J.M. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **10**: 123-150.

Liu, X.L., Covington, M.F., Fankhauser, C., Chory, J., Wanger, D.R. (2001). ELF3 encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an Arabidopsis PHYB signal transduction pathway. *Plant Cell* **13**: 1293-1304.

Locke, J.C.W., Millar, A.J., Turner, M.S. (2005a). Modelling genetic networks with noisy and varied experimental data: the circadian clock in Arabidopsis thaliana. *Journal of Theoretical Biology* **234**: 383-393.

Locke, J.C.W., Southern, M.M., Kozma-Bognar, L., Hibberd, V., Brown, P.E., Turner, M.S., Millar, A.J. (2005b). Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Molecular Systems Biology*.

Locke, J.C.W., Kozma-Bognar, L., Gould, P.D., Feher, B., Kevei, E., Nagy, F., Turner, M.S., Hall, A., Millar, A.J. (2006). Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of Arabidopsis thaliana. *Molecular Systems Biology*.

Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* **163**: 16-20.

Lyndon, R. F. (1990). *Plant development*. Unwin Hyman.

Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lister, C., Schmidt, R., Love, K., Westphal, L., Murphy, G., Sherson, S., Cobbett, C., Dean, C. (1997). FCA, a gene controlling flowering time in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* **89**: 737-745.

Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004.

Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L., Dietrich, R.A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* **26**: 403-410.

Martínez, C., Pons, E., Prats, G., Leon, J. (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant Journal* **37**: 209-217.

Martínez-Zapater, J.M., Somerville, C.R. (1990). Effect of Light Quality and Vernalization on Late-Flowering Mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **92** (3): 770-776.

Martínez-Zapater, J.M., Coupland, G., Dean, C., Koornneef, M. (1994). The transition to Flowering in *Arabidopsis*. *Arabidopsis* chapter 16. 403-433.

Más, P., Alabadi, D., Yanovsky, M.J., Oyama, T., Kay, S.A. (2003a). Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 223-236.

Más, P., Kim, W.Y., Somers, D.E., Kay, S.A. (2003b). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **426**: 567-570.

Mathieu, J., Warthmann, N., Kuttner, F., Schmid, M. (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Current Biology* **17**: 1055-1060.

Mathieu, Y., Kurkjian, A., Xia, H., Guern, J., Spiro, M., O'Nelly, M., Albersheim, P., Darvill, A. (1991). Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-culture tobacco cells. *Plant Journal* **1**: 333-343.

McClung, C.R. (2001). Circadian rhythms in plants. *Annual Review of plant Physiology. Plant Molecular Biology* **52**: 139-162.

Meuse, B.J.D., Raskin, I. (1988). Sexual reproduction in the *Arum* lily family with emphasis on thermogenicity. *Sexual Plant Reproduction* **1**: 3-15.

Métraux, J-P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006.

Miao, Y., Zentgraf, U. (2007). The antagonist function of Arabidopsis WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. *Plant Cell* **19**: 819-830.

Michaels, S.D., Amasino, R.M. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**: 949-956.

Michaels, S.D., Amasino, R.M. (2000). Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant Cell and Environment* **23**: 1145-1153.

Michaels, S.D., Amasino, R.M. (2001). Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* **13**: 935-941.

Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.R., Carre, I.A., Coupland, G. (2002). LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis. *Developmental Cell* **2** (5): 629-641.

Morris, K., Mackerness, S.A.H., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M., Carr, J.P., Buchanan-Wollaston, V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal* **23**: 677-685.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.

Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Sato, E., Yamashino, T., Mizuno, T. (2005). The Arabidopsis pseudo-response regulators, PRR5 and PRR7, coordinately play essential roles for circadian clock function. *Plant Cell Physiology* **46** (4): 609-619.

Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Sato, E., Yamashino, T., Mizuno, T. (2007). Arabidopsis Clock-Associated Pseudo-Response Regulators PRR9, PRR7 and PRR5 Coordinately and Positively Regulate Flowering Time Through the Canonical CONSTANS-Dependent Photoperiodic Pathway. *Plant Cell Physiology* **48** (6): 822-832.

Nanda, K.K., Sharma, R. (1976). Effects of gibberellic-acid and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate on flowering of eschscholtzia-californica cham, a qualitative long day plant. *Plant and Cell Physiology* **17** (5): 1093-1095.

Nandi, A., Krothapalli, K., Buseman, C.M., Li, M., Welti, R., Enyedi, A., Shah, J. (2003). Arabidopsis sfd mutants affect plastidic lipid composition and suppress dwarfing, cell death, and the enhanced disease resistance phenotypes resulting from the deficiency of a fatty acid desaturase. *Plant Cell* **15** (10): 2383-2398.

Nawrath, C., Metraux, J.P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**: 1393-1404.

Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., Metraux, J.P. (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**: 275-286.

Ni, M., Tepperman, J.M., Quail, P.H. (1999). Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400** (6746): 781-784.

Ni, W.T., Fahrendorf, T., Balance, G.M., Lamb, C.J., Dixon, R.A. (1996). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L) .20. Transcriptional activation of phenylpropanoid pathway genes in elicitor-induced cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology* **30** (3): 427-438.

O'Donnell, P.J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J.B., Klee, H.J. (2003). Multiple Hormones Act Sequentially to Mediate a Susceptible Tomato Pathogen Defense Response. *Plant Physiology* **133**: 1181-1189.

Oliverio, K.A., Crepy, M., Martin-Tryon, E.L., Milich, R., Harmer, S.L., Putterill, J., Yanovsky, M.J., Casal, J.J. (2007). GIGANTEA regulates phytochrome A-mediated photomorphogenesis independently of its role in the circadian clock. *Plant Physiology* **144**: 495-502.

Onouchi, H., Igeno, M.I., Perilleux, C., Graves, K., Coupland, G. (2000). Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. *Plant Cell* **12**: 885-900.

Oota, Y. (1972). The response of *Lemna gibba* G3 to a single long day in the presence of EDTA. *Plant and Cell Physiology* **13**: 575-580.

Oota, Y. (1975). Short-day flowering of *Lemna gibba* G3 induced by salicylic acid. *Plant and Cell Physiology* **16** (6): 1131-1135.

Page, T., Macknight, R., Yang, C.H., Dean, C. (1999). Genetic interactions of the Arabidopsis flowering time gene FCA, with genes regulating floral initiation. *Plant Journal* **17**: 231-239.

Park, D.H., Somers, D.E., Kim, Y.S., Choy, Y.H., Lim, H.K., Soh, M.S., Kim, H.J., Kay, S.A., Nam, H.G. (1999). Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the Arabidopsis GIGANTEA gene. *Science* **285**: 1579-1582.

Pastori, G.M., Foyer, C.H. (2002). Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* **129** (2): 460-468.

Pieterse, A.H., Müller, L.J. (1977). Induction of flowering in *Lemna gibba* G3 under short-day conditions. *Plant and Cell Physiology* **18**: 45-53.

Pieterse, C.M.J., Ton J., Van Loon, L.C. (2001). Cross-Talk between plant defense signalling pathways: boost or burden?. *AgBiotechNet* **3**, ABN 068.

Pieterse, C.M., Van Loon, L. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 456-464.

Piñero, M., Coupland, G. (1998). The control of flowering time and floral identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **117**: 1-8.

Putterill, J., Robson, F., Lee, K. (1995). The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc-finger transcription factors. *Cell* **80** (6): 847-857.

Quesada, V., Macknight, R., Dean, C., Simpson, G.G. (2003). Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls *Arabidopsis* flowering time. *Embo Journal* **22**: 3142-3152.

Raskin, I., Ehmann, A., Melander, W.R., Meeuse, B.J.D. (1987). Salicylic acid: A natural inducer of heat production in *Arum* lilies. *Science* **237**: 1545-1556.

Raskin, I. (1992) Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiology* **99** (3): 799-803.

Razem, F.A., El-Kereamy, A., Abrams, S.R., Hill, R.D. (2006). The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**: 290-294.

Reeves, P.H., Coupland, G. (2000). Response of plant development to environment: control of flowering by daylength and temperature. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 37-42.

Reeves, P.H., Coupland, G. (2001). Analysis of flowering time control in *Arabidopsis* by comparison of double and triple mutants. *Plant Physiology* **126**:1085-1091.

Reymond, P., Farmer, E.E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 404-411.

Reymond, P., Weber, H., Damond, M. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12** (5): 707-719.

Ribnicky, D.M., Shulaev, V. Raskin, I. (1998). Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* **118**: 565-572.

Robson, F., Costa, M.M.R., Hepworth, S.R., Vizir, I., Piñeiro, M., Reeves, P.H., Putterill, J., Coupland, G. (2001). Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant Journal* **28**: 619-631.

Rouse, D.T., Sheldon, C.C., Bagnall, D.J., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (2002). *FLC*, a repressor of flowering, is regulated by genes in different inductive pathways. *Plant Journal* **29**: 183-191.

Ruiz-García, L., Madueño, F., Wilkinson, M., Haughn, G., Salinas, J., Martínez-Zapater, J.M. (1997). Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**: 1921-1934.

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819.

Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., Okada, K. (2001). *Arabidopsis* *nph1* and *npl1*: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6969-6974.

Samach, A., Coupland, G. (2000). Time measurement and the control of flowering in plants. *Bioessays* **22**: 38-47.

Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., Coupland, G. (2000). Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**: 1613-1616.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd de. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sauerbrunn, N., Schlaich, N.L., (2004). PCC1: a merging point for pathogen defence and circadian signalling in Arabidopsis. *Planta* **218**: 552-561.

Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I.A., Coupland, G. (1998). The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**: 1219-1229.

Schultz, E.A., Haughn, G.W. (1991). Leafy, A Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **3**: 771-781.

Serino, L., Reimann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P., Haas, D. (1995). Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Gen Genetics* **249**: 217-228.

Seth, P.N., Venkataraman, R., Maheshwari, S.C. (1970). Studies on the growth and flowering of a short-day plant, *wolffia-microscopica*. II. Role of metal ions and chelates. *Planta* **90**: 349-359.

Shah, J., Kachroo, P., Klessig, D.F. (1999). The Arabidopsis *ssl1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**: 191-206.

Sharma, Y.K., Leon, J., Raskin, I., Davis, K.R. (1996). Ozone-induced responses in Arabidopsis thaliana: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5099-5104.

Shimizu-Sato, S., Huq, E., Tepperman, J.M., Quail, P.H. (2002). A light-switchable gene promoter system. *Nature biotechnology* **20 (10)**: 1041-1044.

Smith, B.N., Meeuse, B.J.D. (1966). Production of volatile amines and skatole at anthesis in some arum lily species. *Plant Physiology* **41 (2)**: 343.

- Smith, H.** (2000). Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. *Nature* **407**: 585-591.
- Somers, D.E., Webb, A.A.R., Pearson, M., Kay, S.A.** (1998). The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**: 485-494.
- Somerville, C., Koornneef, M.** (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Natural Review Genetics* **3**: 883-889.
- Sood, V., Nanda K.K.** (1979). Effect of gibberellic-acid and monophenols on flowering of *impatiens-balsamina* in relation to the number of inductive and non-inductive photoperiodic cycles. *Physiologia Plantarum* **45 (2)**: 250-254.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X., Pieterse, C.M.** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**: 760-770.
- Staiger, D.** (2001). RNA-binding proteins and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **356**: 1755-1759.
- Staiger, D.** (2002). Circadian rhythms in *Arabidopsis*: time for nuclear proteins. *Planta* **214**: 334-344.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., Jones, J.D.** (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **5: 268 (5211)**: 661-667.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B.** (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75(8)**: 687-706.

Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A.F.W. (1994). Tratado de Botánica. 8ª edición. Omega.

Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Mas, P., Panda, S., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2000). Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**: 768-771.

Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature* **410**: 1116-1120.

Sweeney, B.M. (1987). Rhythmic Phenomena in Plants. Academic Press, San Diego.

Takahashi, H., Kanayama, Y., Zheng, M.S., Kusano, T., Hase, S., Ikegami, M., Shah, J. (2004). Antagonistic interactions between the SA and JA signaling pathways in Arabidopsis modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to cucumber mosaic virus. *Plant and Cell Physiology* **45**: 803-809.

Takemiya, A., Inoue, S., Doi, M., Kinoshita, T., Shimazaki, K. (2005). Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* **17** (4): 1120-1127.

Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F., Broekaert, W.F. (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **121**: 1093-1102.

Toledo-Ortíz, G., Huq, E., Quail, P.H. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15** (8): 1749-1770.

Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., Coupland, G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**: 1003-1006.

Van Herk, A.W.H. (1937). Die chemischen Vorgänge im Sauromatum-Kolben. III. Mitteilung. Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen **40**: 709-719.

Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology **44**: 135-162.

Venkataraman, R., Seth, P.N., Maheshwari, S.C., (1970). Studies on growth and flowering of a short-day plant, *wolffia-microscopica*. I. General aspects and induction of flowering by cytokinins. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie **62 (4)**: 316-327.

Verberne, M.C., Budi Muljono, A.B. y Verpoorte, R. (1999). Salicylic acid biosynthesis. In Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones **33**: 295-312.

Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J. (1994). Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction. Plant Cell **6**: 959-965.

Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**: 7209-7214.

Wagner, D., Sablowski, R.W.M., Meyerowitz, E.M. (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. Science **285**: 582-584.

Wang, H.Y., Deng, X.W. (2002). Arabidopsis FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1. Embo Journal **21**: 1339-1349.

Wang, Z.Y., Tobin, E.M. (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. Cell **93**: 1207-1217.

Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P., Ryals, J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**: 1085-1094.

Watanabe, K., Takimoto, A. (1979). Flower-inducing effects of benzoic-acid and some related compounds in *lemna-paucicostata* 151. *Plant and Cell Physiology* **20** (4): 847-850.

Watanabe K., Fujita T., Takimoto A. (1981). Relationship between structure and flower-inducing activity of benzoic acid derivatives in *lemna paucicostata* 151. *Plant Cell Physiology* **20**: 847-850.

Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562-565.

Wilson, R.N., Heckman, J.W., Somerville, C.R. (1992). Gibberellin Is Required for Flowering in *Arabidopsis-Thaliana* Under Short Days. *Plant Physiology* **100**: 403-408.

Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. (2002). *Principles of development*. Oxford University Press.

Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M.A., Raskin, I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology* **103**: 315-321.

Yalpani, N., Enyedi, A.J., León, J., Raskin, I. (1994). Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related protein and virus resistance in tobacco. *Planta* **193**: 372-376.

Yanovsky, M.J., Kay, S.A. (2001). Signaling networks in the plant circadian system. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 429-435.

Yoder, M.D., Keen, F.N.T., Journak, F. (1993). New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* **206**: 1503-1507.

Yoder, O.C., Turgeon, B.G., 't Westende, Y.A. (2001). Fungal genomics and pathogenicity. *Current Opinion Plant Biology* **4**: 315-321.

Young, M.W., Kay, S.A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Natural Review Genetics* **2** (9): 702-715.

Zeevaart, J.A.D. (1976). Physiology of flower formation. *Annual Review of plant Physiology* **27**: 321-348.

Zeevaart, J.A.D., Creelman, R.A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic-acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**: 439-473.

Muchas han sido las personas que en pequeña o gran medida han contribuido a este trabajo, y es que casi 5 años dan para mucho.... Así que quiero aprovechar estas líneas para agradecerles a todos ellos su ayuda.

A Pepe, por sus enseñanzas, paciencia, tiempo y comprensión a lo largo de este tiempo y sobre todo por pensar que sería capaz de hacerlo aún cuando ni yo misma sabía donde me metía. Cuando me llamaste para darme la beca te di las gracias por elegirme y me dijiste: “ya me las darás al final” pues bien, el final ya ha llegado y desde aquí ¡Gracias!

Esa beca no sólo me dio la oportunidad de ver que era eso de la investigación y empezar mi carrera científica, la mejor parte es que me ha permitido conocer a mis compañeros del laboratorio y compartir el día a día con ellos: Cris, La Mari, Curro, La Noe, Roseta, Jorge y Ricardo, sin los cuales esta tesis desde luego que no hubiera sido lo mismo. Gracias por estar siempre que os necesito, por la ayuda, el ánimo, las lecciones, las charlas, las risas o simplemente por escuchar. Han sido tantas horas juntos.... que ahora os hecho de menos. ¡¡¡Si es que nos queremos un montón!!!

A toda la gente que durante la realización del trabajo me ha ayudado en pequeñas cosas del día a día pero no por eso menos importantes: en los cursos de doctorado, en el invernadero, en la campana de flujo, con algún protocolo, con algún equipo, con sus consejos o con su amistad. Aquí prácticamente está incluido más de medio IBMCP así que date por aludido. En especial a Carol, M^a Eugenia y Silvia, al grupo de José M^a Bellés por su ayuda con el HPLC, a MD con la lupa y a Eugenio por poner orden en la cuantitativa.

No puedo olvidarme en este momento de Eavan, sin ti seguramente tampoco habría llegado hasta aquí. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudar, aún en la distancia. Ni de mis nuevos compañeros: Alberto, Hugo, Pedro, Sandra, Antonia y Esther que con sus ánimos, consejos y ayuda también han puesto su granito de arena en la etapa final.

La cara B de este trabajo tengo que agradecerla a mi familia: Los pachus y el netito y a mis amigos: La Lore, Bibi (una vez más gracias por la portada y la asistencia técnica), Chou, Roxi y Antoñete que aún sin saber muy bien a qué me dedico intentan

Agradecimientos

entenderme y han sufrido mis nervios y mi abandono en los últimos meses. Y muy especialmente a Juanjo, simplemente sin ti no se cómo lo hubiera hecho. Has sido lo mejor de muchos de los días. Gracias por tu paciencia, comprensión, ayuda y apoyo en todo momento.