

Índice

Pág.

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. <i>ELF3</i> , <i>ELF4</i> y <i>PIF3</i> .	10
El oscilador central. <i>TOC1</i> , <i>CCA1</i> y <i>LHY</i> .	11
Genes de salida del reloj. <i>GI</i> , <i>CO</i> y <i>FT</i> .	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

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
-------------------------	----

Material es y Métodos

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.

8) Cuantificación de los niveles de ácido salicílico.

9) Detección de la actividad β -glucuronidasa.

<i>10) Análisis transcriptómico mediante micromatrices de oligonucleótidos.</i>	48
<i>11) Aplicaciones bioinformáticas.</i>	49

Resultados

<i>1) Correlación entre niveles endógenos de ácido salicílico y transición floral.</i>	51
<i>2) Análisis transcriptómico comparado de plantas deficientes en ácido salicílico y plantas silvestres durante la transición floral.</i>	54
<i>3) Caracterización molecular de PCC1.</i>	58
<i>4) Conexión funcional entre PCC1 y las diferentes vías de transición floral.</i>	60
<i>5) Patrón de expresión de PCC1 a lo largo del desarrollo.</i>	64
<i>6) Conexión entre ácido salicílico y el reloj circadiano.</i>	66
<i>7) Caracterización funcional de PCC1.</i>	69
<i>8) Funciones de PCC1 no relacionadas con la regulación de la transición floral.</i>	82
<i>9) Caracterización de los mutantes de la vía de fotoperiodo en eventos que requieren de la síntesis de ácido salicílico.</i>	87
<i>10) Variación genética natural en la transición floral activada por luz UV-C en Arabidopsis thaliana.</i>	90

Discusión

<i>Cambios en los niveles endógenos de ácido salicílico correlacionan con el tiempo de floración.</i>	97
---	----

<i>PCC1 relaciona ácido salicílico con el reloj circadiano y la vía de fotoperiodo.</i>	98
<i>PCC1 participa en la regulación del tiempo de floración.</i>	100
<i>Otras funciones para PCC1.</i>	101
<i>¿Qué confiere a PCC1 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

Pág.

Introducción

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

Materiales y Métodos

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

Resultados

<i>Figura 1.</i> Cambios en el contenido basal de SA se correlacionan temporalmente con la transición del estado vegetativo a reproductivo.	53
<i>Figura 2.</i> Análisis de la expresión GUS en plantas cultivadas en días cortos.	54

Tabla 1. Genes diferencialmente expresados en el análisis transcriptómico de plantas deficientes en SA frente a plantas silvestres.	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 PCCI se activa por irradiación con luz UV-C o aplicación exógena de SA.	59
Figura 4. La activación de la expresión de PCCI requiere la función de CO.	61
Figura 5. La activación de la expresión de PCCI por aplicación exógena de SA requiere la función de CO y se modula negativamente por JA.	62
Figura 6. Niveles de transcrito de PCCI en plantas tratadas con diferentes fitohormonas o especies reactivas donadoras de oxígeno y nitrógeno.	63
Figura 7. Patrón de expresión espacio- temporal de PCCI.	64
Figura 8. La expresión de PCCI 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 PCCI 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 SOCI en líneas transgénicas de PCCI en fondo Col-0.	71
Figura 12. Homología de secuencia entre At3g22235, At3g22240 y PCCI. Niveles de transcrito relativo en las líneas de RNAi de PCCI en fondo Col-0.	73
Figura 13. Niveles de SA en líneas transgénicas de PCCI en fondo Col-0.	74
Figura 14. Análisis fenotípico en D.L. de las líneas transgénicas de PCCI en fondo Col-0.	75

Figura 15. Análisis morfológico de los órganos reproductivos de las líneas RNAi PCCI en fondo Col-0.	76
Figura 16. Análisis fenotípico en D.C. de las líneas transgénicas de PCCI en fondo Col-0.	77
Figura 17. Tiempo de floración y respuesta a UV-C en líneas transgénicas de PCCI en fondo co-1.	79
Figura 18. Tiempo de floración y respuesta a UV-C en líneas transgénicas de PCCI en fondo fve-3.	81
Tabla 3. Resistencia frente a <i>Pseudomonas</i> de las líneas transgénicas de PCCI en fondo Col-0, co-1 y fve-3.	83
Figura 19. Estudio de la senescencia natural y forzada en líneas transgénicas de PCCI en fondo Col-0.	85
Figura 20. Estudio de la senescencia en líneas transgénicas de PCCI 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 Arabidopsis y en líneas híbridas recombinantes.*

