

# ÍNDICE



---

<b>INDICE</b> .....	1
<b>ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
1. La arquitectura de las inflorescencias .....	15
2. El meristemo apical del tallo .....	17
3. El desarrollo de la inflorescencia en Arabidopsis .....	18
3.1 Control del desarrollo de la inflorescencia en Arabidopsis .....	20
3.1.1 Los genes de identidad del meristemo floral .....	21
3.1.2 Los genes integradores de la transición floral .....	22
3.1.3 Integración de las distintas señales por las rutas inductoras de la floración .....	23
3.1.4 Mantenimiento del crecimiento indeterminado del SAM tras la transición floral .....	25
4. <i>TFL1</i> y el desarrollo de la inflorescencia en Arabidopsis .....	25
4.1. La proteína <i>TFL1</i> .....	27
4.2. Patrón de expresión de <i>TFL1</i> .....	28
4.3 Regulación de <i>TFL1</i> .....	29
4.3.1. Regulación de <i>TFL1</i> por las rutas inductoras de la floración .....	29
4.3.2. Regulación de <i>TFL1</i> por los genes de identidad del meristemo floral .....	29
4.3.3. El promotor de <i>TFL1</i> .....	31
4.4. Ortólogos de <i>TFL1</i> en otras especies .....	31
5. Objetivos de este trabajo .....	33
<b>RESULTADOS</b> .....	35
<b>Capítulo 1: Búsqueda de genes que regulan a <i>TFL1</i> mediante la mutagénesis de una línea delatora</b> .....	37
1. Mutagénesis de una línea delatora <i>TFL1</i> pro::GUS .....	40
1.1 Descripción de la línea delatora empleada en la mutagénesis .....	40
1.2. Escrutinio de la mutagénesis de la línea reportera <i>TFL1</i> pro::GUS .....	41
1.2.1. Descripción de las líneas mutantes identificadas .....	47
2. Caracterización del mutante <i>moss</i> .....	50

2.1. El mutante <i>moss</i> presentó un fenotipo pleiotrópico con defectos en la arquitectura .....	50
2.2. <i>TFL1</i> se expresa de manera fuerte y ectópica en el mutante <i>moss</i> .....	54
3. Identificación del gen afectado por la mutación <i>moss</i> .....	58
4. Análisis fenotípico del mutante <i>ago1-26</i> .....	60
5. Efecto de la mutación <i>ttl1</i> en el fenotipo del mutante <i>moss</i> .....	61
<b>Capítulo 2: Análisis comparativo de las secuencias no codificantes de ortólogos de <i>TFL1</i> en especies de brasicáceas</b> .....	65
1. Obtención de las secuencias no codificantes de genes ortólogos de <i>TFL1</i> en diferentes especies de brasicáceas .....	68
1.1. Identificación del ortólogo de <i>TFL1</i> en <i>C. bursa-pastoris</i> y secuenciación de la región genómica correspondiente .....	70
1.2. Identificación del ortólogo de <i>TFL1</i> en <i>B. rapa</i> y secuenciación de la región genómica correspondiente .....	74
2. Estudio comparativo de la región genómica de <i>TFL1</i> en diferentes especies de brasicáceas. Identificación de regiones conservadas .....	75
<b>Capítulo 3: Identificación de factores de transcripción candidatos a regular a <i>TFL1</i> mediante la unión directa a su promotor</b> .....	83
1. Identificación de factores de transcripción que interaccionan con regiones reguladoras de <i>TFL1</i> .....	88
1.1. Escrutinio mediante híbrido simple de una genoteca de dímeros de MADS con regiones reguladoras del promotor de <i>TFL1</i> .....	88
1.2. Escrutinio mediante híbrido simple de una genoteca de cDNA de planta completa con regiones reguladoras del promotor de <i>TFL1</i> .....	90
2. Caracterización del gen <i>TCP7</i> de <i>Arabidopsis</i> .....	93
2.1. Unión de <i>TCP7</i> al promotor de <i>TFL1</i> .....	93
2.2. Patrón de expresión de <i>TCP7</i> .....	94
2.3. Obtención y análisis de plantas con pérdida de función de <i>TCP7</i> .....	96
2.3.1. Alelos de <i>TCP7</i> obtenidos de una mutagénesis de EMS .....	97
2.3.2. Caracterización del mutante <i>stop</i> que codifica una versión truncada de <i>TCP7</i> .....	99
2.3.3. Reducción de la expresión de <i>TCP7</i> mediante técnicas de silenciamiento génico ....	102
2.4. Obtención y análisis de plantas con ganancia de función de <i>TCP7</i> .....	104
2.4.1. Fenotipo de las líneas 35S:: <i>TCP7</i> .....	104
2.4.2. Análisis de la expresión de <i>TFL1</i> en plantas 35S:: <i>TCP7</i> .....	111

<b>DISCUSIÓN</b> .....	113
1. Análisis del mutante <i>moss</i> . Papel de <i>AGO1</i> en la regulación de <i>TFL1</i> .....	115
1.1. El mutante <i>moss</i> , un nuevo alelo que permite estudiar el papel de <i>AGO1</i> durante el desarrollo .....	115
1.2. El fenotipo del mutante <i>moss</i> sugiere un papel para <i>AGO1</i> en la actividad del SAM .....	115
1.3. La pérdida de función de <i>AGO1</i> afecta a la identidad del meristemo floral .....	116
1.4. La alteración del patrón de expresión <i>TFL1</i> podría contribuir a los defectos relacionados con la identidad del meristemo floral de los mutantes <i>ago1</i> .....	116
1.5. Posibles modelos para explicar la regulación de <i>TFL1</i> por <i>AGO1</i> .....	117
2. Análisis comparativo de las secuencias no codificantes de ortólogos de <i>TFL1</i> en especies de brasicáceas .....	119
2.1. Conservación modular de las secuencias no codificantes de los genes <i>TFL1</i> de brasicáceas .....	119
2.2. Posible papel de los módulos conservados en la regulación de <i>TFL1</i> .....	120
2.3. Utilidad de los módulos conservados para la predicción de dianas de factores de transcripción que regulan a <i>TFL1</i> .....	121
3. Nuevos posibles reguladores de <i>TFL1</i> identificados por híbrido simple .....	123
4. Función del gen <i>TCP7</i> en el control de la arquitectura de la planta a través de la regulación de <i>TFL1</i> .....	125
4.1. Papel de <i>TCP7</i> en la actividad del SAM y en la transición floral .....	125
4.2. Papel de <i>TCP7</i> en el desarrollo de la hoja .....	125
4.3. Papel de <i>TCP7</i> en el desarrollo de las inflorescencias laterales .....	126
4.4. Posible relación entre <i>TCP7</i> y las auxinas .....	127
4.5. Participación de <i>TCP7</i> en el control del reloj circadiano .....	128
4.6. <i>TCP7</i> reprime la expresión de <i>TFL1</i> .....	129
4.6.1. Relación entre la disminución de los niveles de <i>TFL1</i> y los defectos en la arquitectura de las plantas 35S::TCP7 .....	129
4.6.2. <i>TCP7</i> podría regular a <i>TFL1</i> a través de la interacción con otros factores de transcripción .....	130
<b>CONCLUSIONES</b> .....	133
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	139
1. Materiales .....	141
1.1. Material vegetal .....	141
1.2. Microorganismos .....	142

1.2.1. Cepas bacterianas .....	142
1.2.2. Cepas de levadura .....	142
1.3. Plásmidos .....	143
1.4. Oligonucléotidos .....	144
1.5. Secuencias utilizadas .....	150
2. Métodos .....	151
2.1. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de Arabidopsis .....	151
2.1.1. Cultivo de Arabidopsis en invernadero .....	151
2.1.2. Cultivo de Arabidopsis <i>in vitro</i> .....	152
2.1.3. Fertilización cruzada .....	152
2.1.4. Conservación de semillas .....	152
2.1.5. Generación de plantas transgénicas .....	152
2.1.5.1. Transformación genética mediante infiltración al vacío .....	152
2.1.5.2. Selección de plantas transgénicas .....	153
2.2. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de bacterias .....	154
2.2.1. Medios y condiciones de cultivo .....	154
2.2.2. Transformación de bacterias .....	155
2.3. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de levaduras .....	155
2.3.1. Medios y condiciones de cultivo .....	155
2.3.2. Transformación de levaduras .....	155
2.4. Extracción y purificación de ácidos nucleicos .....	156
2.4.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	156
2.4.2. Extracción de DNA de cósmidos o BACs de <i>E. coli</i> .....	156
2.4.3. Extracción de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> .....	157
2.4.4. Extracción de DNA de levaduras .....	157
2.4.5. Extracción de DNA genómico de Arabidopsis .....	157
2.4.6. Extracción de RNA total de Arabidopsis .....	158
2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transcripción reversa (RT) .....	158
2.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	158
2.5.2. Transcripción reversa (RT) .....	159
2.5.3. RT-PCR semicuantitativa .....	159
2.5.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) .....	159
2.6. Separación de ácidos nucleicos por electroforesis .....	160

2.6.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	160
2.6.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa .....	160
2.7. Detección de DNA transferido a membrana mediante hibridación con una sonda .....	160
2.7.1. Transferencia de DNA a una membrana .....	161
2.7.2. Marcaje de la sonda .....	161
2.7.3. Hibridación, lavados y detección de la señal .....	161
2.8. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa .....	161
2.9. Digestión de DNA con enzimas de restricción .....	161
2.10. Tratamiento de DNA con enzimas modificadores .....	161
2.10.1. Desfosforilación de extremos cohesivos .....	161
2.10.2. Ligación de fragmentos de DNA .....	162
2.10.2. Ligación de fragmentos de DNA mediante la tecnología <i>Gateway</i> .....	162
2.11. Hibridaciones <i>in situ</i> de RNA (RNA ISH) .....	162
2.11.1. Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina .....	162
2.11.2. Cuantificación de las sondas de RNA .....	163
2.11.3. Prehibridación, hibridación e inmunodetección colorimétrica de la señal .....	163
2.12. Construcción de los plásmidos .....	164
2.12.1. Construcciones cebo para los ensayos de híbrido simple .....	164
2.12.2. Construcción con el fragmento de cDNA a partir de la cual se sintetizó la sonda para la RNA ISH de <i>TCP7</i> .....	165
2.12.3. Construcción 35S::TCP7 .....	166
2.12.4. Construcción TCP7-RNAi .....	166
2.13. Métodos de histología y microscopía .....	166
2.13.1. Análisis de la actividad GUS .....	167
2.13.1.2. Aclarado de muestras con hidrato de cloral .....	168
2.13.2. Fijación e inclusión de muestras para RNA ISH .....	168
2.13.3. Obtención de cortes histológicos .....	169
2.13.4. Observación y captura de imágenes con poco aumento .....	169
2.13.5. Microscopía óptica .....	169
2.13.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	169
2.14. Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en fondos <i>moss</i> , <i>ago1-26</i> y 35S::TCP7 .....	170
2.14.1. Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en el mutante <i>moss</i> .....	170
2.14.2. Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en <i>ago1-26</i> .....	171

2.14.3. Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en 35S::TCP7 .....	172
2.15. Genotipado por dCAP .....	172
2.15.1. Generación de la línea empleada en la caracterización de la mutación <i>moss</i> .....	173
2.16. Ensayos de híbrido simple .....	173
2.16.1. Escrutinio mediante híbrido simple de una genoteca de dímeros de proteínas MADS .....	173
2.16.2. Escrutinio por híbrido simple de una genoteca de cDNA de planta entera .....	174
2.17. Determinación y análisis de secuencias de DNA .....	175
2.17.1. Determinación de las secuencias de DNA utilizadas en este trabajo .....	175
2.17.1.1. Secuenciación del gen <i>AGO1</i> en el mutante <i>moss</i> .....	175
2.17.1.2. Secuenciación de las regiones genómicas de <i>TFL1</i> en <i>A. thaliana</i> , <i>C. bursa-pastoris</i> y <i>B. rapa</i> .....	176
2.17.1.3. Secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR y clonados en las diferentes construcciones .....	176
2.17.2. Análisis de las secuencias utilizadas en el análisis comparativo de la región genómica de <i>TFL1</i> en diferentes especies de brassicáceas .....	176
2.17.2.1. Predicción de genes .....	176
2.17.2.2. Análisis comparativo de las secuencias .....	176
2.17.2.3. Predicción de sitios de unión a factores de transcripción .....	177
2.17.3. Otras herramientas informáticas utilizadas en este trabajo .....	178
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	181
<b>MATERIALES SUPLEMENTARIOS</b> .....	203
Alineamiento S1 .....	205
Alineamiento S2 .....	209
Alineamiento S3 .....	217
Alineamiento S4 .....	229