

# **ÍNDICE**



---

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>1</b>
<b>1-INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
1.1. La arquitectura de la planta.....	11
1.1.1. El desarrollo de la inflorescencia en Arabidopsis.....	12
1.2. Control del desarrollo de la inflorescencia de Arabidopsis.....	14
1.2.1. Control del tiempo de floración.....	14
1.2.1.1. Control del tiempo de floración mediado por la ruta del fotoperiodo....	15
1.2.1.2. Control del tiempo de floración mediado por las rutas autónoma y de la vernalización.....	17
1.2.1.3. Control del tiempo de floración mediado por las giberelinas.....	19
1.2.1.4. Integradores de las distintas rutas reguladoras del tiempo de floración..	19
1.2.2. El desarrollo reproductivo. Los genes de identidad de meristemo floral....	21
1.3. <i>TFL1</i> y el desarrollo de la inflorescencia de Arabidopsis.....	23
1.3.1. La proteína TFL1.....	26
1.3.2. Patrón de expresión de <i>TFL1</i> .....	28
1.4. Regulación de la expresión <i>TFL1</i> .....	29
1.4.1. Regulación de <i>TFL1</i> por las rutas inductoras de la floración.....	29
1.4.2. Regulación de <i>TFL1</i> por los genes de identidad del meristemo floral.....	29
1.4.3. El promotor de <i>TFL1</i> .....	31
1.4.4. Reguladores directos de la expresión de <i>TFL1</i> .....	31
1.5. Las proteínas VOZ.....	32
1.6. Objetivos de este trabajo.....	34
<b>2-RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>

---

2.1. Identificación de VOZ1 como posible regulador de <i>TFL1</i> .....	37
2.2. Patrón de expresión del gen <i>VOZ1</i> .....	38
2.2.1. Distribución del mRNA de <i>VOZ1</i> en distintos tejidos de la planta.....	38
2.2.2. Análisis de la expresión de <i>VOZ1</i> por hibridación <i>in situ</i> .....	39
2.2.3. Análisis del patrón de expresión de <i>VOZ1</i> mediante una línea transgénica reportera pVOZ1:GUS.....	40
2.3. Análisis de la localización subcelular de la proteína VOZ1.....	43
2.4. Interacción de VOZ1 con el promotor de <i>TFL1</i> .....	45
2.4.1. Interacción de VOZ1 con el promotor de <i>TFL1</i> en el ensayo de activación de la luciferasa.....	45
2.4.2. Mapeo del sitio de unión de VOZ1 al promotor de <i>TFL1</i> .....	47
2.4.3 Unión de VOZ1 al promotor de <i>TFL1</i> .....	50
2.5. Análisis fenotípico de los mutantes de los genes <i>VOZ</i> .....	52
2.5.1. Aislamiento de mutantes de inserción para los genes <i>VOZ</i> .....	52
2.5.2. Fenotipo de floración de los mutantes <i>voz</i> .....	53
2.5.3. Efecto del fotoperiodo sobre la floración de los mutantes <i>voz</i> .....	55
2.5.4. Efecto de la vernalización sobre la floración de los mutantes <i>voz</i> .....	57
2.5.5. Efecto de las giberelinas sobre la floración de los mutantes <i>voz</i> .....	59
2.6. Sobreexpresión de <i>VOZ1</i> .....	61
2.6.1 Generación de líneas transgénicas con sobreexpresión de <i>VOZ1</i> .....	61
2.6.2. Fenotipo de floración de las líneas 35S::VOZ1.....	63
2.7. Efecto de VOZ1 en la expresión de <i>TFL1</i> .....	67
2.7.1. Expresión de TFL1pro::GUS en plantas que sobreexpresan <i>VOZ1</i> .....	67
2.7.2. Expresión de <i>TFL1</i> en fondos de pérdida o ganancia de función de <i>VOZ1</i> .....	69
2.8. Caracterización preliminar de <i>VOZ2</i> .....	70
2.8.1. Expresión del gen <i>VOZ2</i> en distintos tejidos de la planta.....	70

---

2.8.2. Análisis de la localización subcelular de la proteína VOZ2.....	71
2.8.3. Interacción de VOZ2 con el promotor de <i>TFL1</i> en el ensayo de activación de la luciferasa.....	72
2.9. Interacción genética entre los genes <i>VOZ</i> y <i>TFL1</i> .....	74
2.9.1. Combinación de pérdida de función de los genes <i>VOZ</i> y <i>TFL1</i> .....	74
2.10. Efecto de los factores VOZ sobre la expresión de genes reguladores de la floración.....	77
2.11. Interacción de la proteína VOZ1 con factores reguladores de la floración.....	78
<b>3-DISCUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
3.1. <i>VOZ1</i> codifica un factor de transcripción de expresión en vasculatura.....	87
3.2. <i>VOZ1</i> es un regulador directo de la expresión de <i>TFL1</i> .....	88
3.3. Los genes <i>VOZ</i> controlan redundantemente el tiempo de floración.....	91
3.4. ¿Cómo actúan los factores <i>VOZ</i> en la regulación de la floración?.....	92
<b>4- CONCLUSIONES.....</b>	<b>97</b>
<b>5- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>101</b>
5.1. Material vegetal.....	103
5.2. Microorganismos.....	104
5.2.1. Cepas bacterianas.....	104
5.2.2. Cepas de levadura.....	104
5.3. Plásmidos.....	105
5.4. Oligonucléotidos.....	111
5.5. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de <i>Arabidopsis</i> .....	115
5.5.1 Cultivo de <i>Arabidopsis</i> en invernadero.....	115

---

5.5.2 Tratamiento de Arabidopsis con giberelinas.....	115
5.5.3 Tratamiento de vernalización.....	116
5.5.4 Cultivo de Arabidopsis <i>in vitro</i> .....	116
5.5.5 Fertilización cruzada.....	117
5.5.6 Conservación de semillas.....	117
5.5.7 Generación de plantas transgénicas.....	117
5.5.7.1 Transformación genética mediante infiltración al vacío.....	117
5.6. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de bacterias.....	118
5.6.1 Medios y condiciones de cultivo.....	118
5.6.2 Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> por electroporación.....	119
5.6.3 Transformación células competentes de <i>A.tumefaciens</i> por electroporación.....	119
5.7 Medios y condiciones de cultivo y manipulación de levaduras.....	120
5.7.1 Medios y condiciones de cultivo.....	120
5.7.2 Transformación de levaduras (integración de insertos en el genoma).....	121
5.7.3 Transformación simple de levaduras.....	121
5.8. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	122
5.8.1 Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	122
5.8.2 Extracción de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> .....	122
5.8.3 Extracción rápida de DNA genómico de Arabidopsis.....	122
5.8.4. Extracción de DNA genómico de alta calidad de Arabidopsis.....	123
5.8.5. Extracción de RNA total de Arabidopsis.....	124
5.9 Métodos de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	124
5.9.1 PCR sobre DNA.....	124
5.9.2 Transcripción reversa (RT).....	126

---

5.9.3. RT-PCR semicuantitativa.....	126
5.9.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	126
5.10 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	127
5.11 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	127
5.12 Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	128
5.13 Tratamiento de DNA con enzimas modificadores.....	128
5.13.1 Desfosforilación de extremos cohesivos.....	128
5.13.2 Clonaje de fragmentos de DNA amplificados por PCR.....	128
5.13.3 Clonaje de fragmentos de DNA y plásmidos digeridos.....	128
5.13.4 Clonaje de fragmentos de DNA mediante la tecnología <i>Gateway</i> .....	129
5.14 Hibridaciones <i>in situ</i> de RNA (RNA ISH).....	129
5.14.1 Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina.....	129
5.14.2 Cuantificación de las sondas de RNA.....	130
5.14.3 Prehibridación, hibridación e inmunodetección colorimétrica de la señal.	131
5.14.4 Análisis de la expresión de <i>VOZ1</i> y <i>VOZ2</i> en Col WT.....	131
5.15 Métodos de histología y microscopía.....	132
5.15.1. Análisis de la actividad GUS.....	132
5.15.2. Aclarado con hidrato de cloral para la observación del tejido vegetal.....	132
5.15.3. Fijación e inclusión de muestras para ISH.....	133
5.15.4. Obtención de cortes histológicos.....	134
5.15.5. Fotografía a bajo aumento.....	134
5.15.6. Microscopía óptica.....	134
5.15.7. Microscopía confocal.....	135
5.16. Análisis de la expresión de <i>TFL1</i> en diferentes fondos genéticos.....	135

---

5.16.1. Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en 35S::VOZ1.....	135
5.16.2. Análisis de <i>TFL1</i> en 35S::VOZ1 y en el doble mutante <i>voz1 voz2</i> .....	136
5.17. Ensayos que implicaron el uso de expresión transitoria en hojas de <i>Nicotiana</i>	136
5.17.1. Ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC).....	136
5.17.2. Ensayos de activación de la Luciferasa.....	138
5.17.3. Localización subcelular de las proteínas VOZ en <i>Nicotiana benthamiana</i> .	138
5.18. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	139
5.18.1. Entrecruzamiento.....	139
5.18.2. Preparación de las “beads”.....	139
5.18.3. Extracción y sonicación del DNA.....	140
5.18.4. Inmunoprecipitación.....	140
5.18.5. Lavados.....	141
5.18.6. Elución.....	141
5.18.7. Reversión del entrecruzamiento.....	141
5.19. Ensayos de híbrido simple en levadura.....	142
<b>6-BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>145</b>



