

Índice de contenidos

Introducción.....	1
1. Relación de la planta con su entorno	3
2. Identificación de <i>Pathogen and Circadian Controlled 1</i>	4
3. La transición floral en <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
3.1. Ruta del fotoperiodo	7
3.1.1. Percepción y transmisión del fotoperiodo en <i>Arabidopsis</i>	7
3.1.2. Función de <i>CONSTANS-FLOWERING LOCUS T</i> en la regulación de la transición floral por la ruta del fotoperiodo	9
3.1.2.1. Activación de FT por CO	9
3.1.2.2. Función de FT en la activación de la transición floral	12
3.2. Otras rutas para la activación de la transición floral en <i>Arabidopsis</i>	13
4. Interacción planta-patógeno	16
4.1. Respuesta de las plantas frente a patógenos	16
4.2. Señalización por SA en la defensa frente a patógenos	19
4.3. Señalización lipídica en la respuesta frente a patógenos	21
4.3.1. Tipos y función de los lípidos en plantas	21
4.3.2. Ácidos grasos y compuestos derivados	22
4.3.3. Fosfolípidos	24
4.3.4. Señalización por el ácido jasmónico	24
5. El signalosoma COP9 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
5.1. Estructura del signalosoma COP9 (CSN).....	25
5.2. Función de CSN en la regulación de la degradación de proteínas	26
5.3. Función de CSN en la regulación transcripcional	30
5.4. Función fisiológica de CSN en <i>Arabidopsis</i>	30
5.4.1. Función de CSN en el desarrollo de <i>Arabidopsis</i>	30
5.4.1.1. CSN y fotomorfogénesis	30
5.4.1.2. Otras alteraciones del desarrollo en plantas <i>csn</i>	31
5.4.2. Función relacionada con la respuesta a estrés biótico	32
6. Antecedentes.....	33

Resultados.....	37
1. Análisis <i>in silico</i> de la proteína PCC1 y sus homólogos en Arabidopsis	39
1.1. Características generales de PCC1	39
1.2. Análisis de secuencia de genes homólogos a <i>PCC1</i> en Arabidopsis	45
2. Patrón de expresión de <i>PCC1</i>	47
3. Localización celular de PCC1	51
3.1. Localización celular de PCC1 fusionada a GFP en plantas de Nicotiana transformadas transitoriamente y en plantas transgénicas de Arabidopsis.....	51
3.2. La aplicación de SA altera la localización de PCC1 de Arabidopsis	57
3.3. Homodimerización de PCC1	58
3.4. El dominio CYSTM de PCC1 es el responsable de la homodimerización y del anclaje a la membrana plasmática	62
4. Función de PCC1 en la transición floral en Arabidopsis.....	65
4.1. CONSTANS no es un activador transcripcional de <i>PCC1</i>	65
4.2. PCC1 no interacciona con CONSTANS	66
4.3. PCC1 no es necesario para la activación de <i>FT</i> por CO.....	68
4.4. La expresión de <i>PCC1</i> no depende de CO	70
4.5. Implicación de PCC1 en la transición floral dependiente de vernalización y de giberelinas.....	70
4.6. El fenotipo de floración tardía en plantas <i>iPCC1</i> podría estar relacionado con alteraciones en la señalización por luz.....	72
5. Interacción de PCC1 con otras proteínas de Arabidopsis.....	75
5.1. Escrutinio de potenciales interactores de PCC1 mediante doble híbrido en levadura	75
5.2. Localización subcelular de CSN5B	78
5.3. Confirmación de las interacciones PCC1 con CSN5A y CSN5B <i>in planta</i>	79
5.4. Detección de formas rubiladas de CUL1 en líneas <i>iPCC1</i>	81
6. Análisis transcriptómico de líneas <i>iPCC1</i>	81
6.1. Categorías funcionales sobrerrepresentadas en el análisis transcriptómico	82
6.2. Comprobación por RT-qPCR de los datos del análisis transcriptómico	83
6.3. Hipersensibilidad al ABA de las líneas <i>iPCC1</i>	84

6.4. Alteración de la composición lipídica en líneas iPCC1	93
6.5. Fenotipos de defensa de líneas iPCC1 frente a distintos tipos de patógenos	95
Discusión.....	101
Conclusiones.....	122
Materiales y métodos.....	127
1. Material biológico y condiciones de cultivo.....	129
1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	129
1.1.1. Material vegetal	129
1.1.2. Condiciones de cultivo	129
1.2. Material microbiológico: cepas utilizadas y condiciones de cultivo	130
1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	130
1.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	130
1.2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	131
1.2.4. <i>Pseudomonas psyringae</i>	131
1.2.5. <i>Botrytis cinerea</i>	131
1.2.6. <i>Phytophthora brassicae</i>	132
2. Tratamientos aplicados a las plantas	132
2.1. Aplicación de dexametasona	132
2.2. Tratamientos con hormonas.....	132
2.3. Infección con microorganismos patógenos	133
2.3.1. Infección con <i>Pseudomonas syringae</i>	133
2.3.2. Infección con <i>Botrytis cinerea</i>	134
2.3.3. Infección con <i>Phytophthora brassicae</i>	134
2.4. Tratamiento de vernalización	135
3. Manipulación del material biológico	135
3.1. Generación de electro-competencia en células de <i>E. coli</i> y transformación genética	135
3.2. Generación de termo-competencia en células de <i>A. tumefaciens</i> y transformación genética	136
3.3. Generación de termo-competencia en células de <i>S. cerivisiae</i> y transformación genética	137

3.4. Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	137
3.5. Transformación transitoria en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	138
4. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos	139
4.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos	139
4.1.1. Extracción de ADN genómico de Arabidopsis.....	139
4.1.2. Extracción de ARN de Arabidopsis.....	139
4.1.3. Extracción de ARN para el análisis transcriptómico.....	140
4.1.4. Extracción de ADN de bacteria	140
4.2. Manipulación de ácidos nucleicos	141
4.2.1. Amplificación de fragmentos específicos de ADN por PCR	141
4.2.2. Purificación de bandas de AND	143
4.2.3. Retrotranscripción (RT) de ARN	144
4.2.4. Cuantificación de transcritos por RT-qPCR	144
4.2.5. Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	145
4.2.6. Reacciones de fosforilación y defosforilación de fragmentos de ADN y vectores	145
4.2.7. Ligación de fragmentos de PCR y plásmidos.....	146
4.2.7.1. Ligaciones convencionales	146
4.2.7.2. Ligaciones mediante el uso de tecnología Gateway®.....	147
5. Obtención de plásmidos recombinantes	147
5.1. Generación de fusiones <i>pPCC1::GUS</i>	147
5.2. Generación de fusiones traduccionales de proteínas con distintas etiquetas para su análisis en plantas.....	148
5.3. Generación de fusiones traduccionales de proteínas con distintas etiquetas para su análisis en levaduras.....	150
6. Analisis cuantitativo de ácidos grasos y lípidos polares.....	150
7. Obtención de plantas transgénicas <i>iPCC1 oxCO-GR (co-2)</i>	151
8. Ensayos de doble híbrido en levadura	152
8.1. Comprobación directa de interacciones por doble híbrido en levadura	152
8.2. Escrutinio por doble híbrido en levadura para la búsqueda de proteínas interactoras.....	152

9. Manipulación de proteínas.....	153
9.1. Análisis Western.....	153
9.2. Inmunoprecipitación de proteínas con anticuerpos específicos	155
10. Análisis fenotípicos	155
10.1. Medida de la longitud de hipocotilos	155
10.2. Ensayos de germinación y establecimiento de plántula	156
10.3. Crecimiento de raíces	156
10.4. Medida del cierre estomático.....	156
10.5. Estimación de la pérdida de agua	157
10.6. Tiempo de floración.....	157
11. Obtención de protoplastos a partir de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	157
12. Tinciones histoquímicas	158
12.1. Tinción de actividad b-glucuronidasa (GUS).....	158
12.2. Tinción con yoduro de propidio	158
12.3. Tinción con FM TM 4-64FX	158
13. Técnicas microscópicas	159
13.1. Toma de imágenes de plantas <i>pPCC1 1100::GUS</i>	159
13.2. Microscopía confocal	160
14. Aplicaciones bioinformáticas y bases de datos	160
14.1. Herramientas básicas para el manejo de secuencias.....	160
14.2. Predicción de modificaciones secundarias de proteínas.....	161
14.3. Predicción de localización subcelular.....	161
14.4. Bases de datos consultadas	161
14.5. Herramientas utilizadas para el análisis de datos transcriptómicos.....	162
Bibliografía.....	163