

INDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCION	1
FORMULACION DE LA HIPOTESIS	11
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS	12
II. MATERIALES Y METODOS	13
2.1 Cultivo de <i>Pinus radiata</i>	14
2.2 Experimentos de pérdida de verticalidad en <i>P. radiata</i>	14
2.3 Extracción de ARN total	14
2.4 Electroforesis en gel de agarosa	16
2.5 Purificación de templados desde gel agarosa	17
2.6 Elongación de las secuencias con homología a proteína MADS-box	17
2.7 Clonamiento del largo completo de los genes <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i>	18
2.8 Análisis bioinformáticos	20
2.9 Análisis del perfil de expresión de los factores de transcripción en <i>P. radiata</i>	20
2.10 Expresión de la proteína recombinante PrMADS10 y PrMADS11	21
2.10.1 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.10.2 Transformación por electroporación de <i>S. cerevisiae</i>	21
2.10.3 Producción y purificación de proteína recombinante en <i>S. cerevisiae</i>	22
2.10.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida	22
2.10.5 Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSAs)	23
2.11 Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
2.11.1 Generación de construcciones genéticas para la transformación estable	24
2.11.2 Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	24
2.11.3 Cultivo de <i>A. thaliana</i>	25
2.11.3 Extracción de ARN total de <i>A. thaliana</i>	26
2.11.4 Síntesis de ADNc de <i>A. thaliana</i>	26
2.12 Análisis del perfil de expresión de genes en Arabidopsis transgénico	26

2.12.1 Análisis de Microarreglos	26
2.12.2 Análisis de genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides	27
2.13 Análisis histoquímico en Arabidopsis	28
2.14 Determinación del contenido de lignina en Arabidopsis transgénico	28
III. RESULTADOS	30
3.1 Caracterización de dos secuencias de factores de transcripción tipo MADS-box de <i>P. radiata</i>	31
3.1.1 Obtención de secuencias de largo completo de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i>	31
3.1.2 Análisis filogenético de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i>	34
3.2 Determinación del perfil de expresión MADS-box durante la respuesta a inclinación en <i>P. radiata</i>	36
3.3 Evaluación de la interacción de proteínas MADS-box con elementos de respuesta de ADN	37
3.4 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de los factores de transcripción de pino en plantas de Arabidopsis	41
3.4.1 Efectos de la expresión constitutiva de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> determinados mediante Microarreglos	44
3.4.2 Efectos de la expresión constitutiva de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> en la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en Arabidopsis	52
3.4.3 Contenido de lignina en líneas transgénicas <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i>	55
IV. DISCUSION	57
4.1 <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> codifican para factores de transcripción tipo MADS-box	58
4.2 <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> son expresados diferencialmente en tallo de pino	59
4.3 Genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides contienen elementos CArG en sus promotores, reconocidos por MADS-box	60
4.4 La sobre-expresión constitutiva de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> regula la inducción positiva y negativa de genes en Arabidopsis	61

4.5 La sobre-expresión constitutiva de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> regula la ruta de biosíntesis de fenilpropanpides en <i>Arabidopsis</i>	66
4.6 La sobreexpresión de <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i> regulan diferencialmente genes de la ruta de biosíntesis de lignina en <i>Arabidopsis</i>	67
V. CONCLUSIONES	70
VI. BIBLIOGRAFÍA	73
VII. ANEXOS	87

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de corte transversal de tallo de pino adulto	2
Figura 2. Ruta de biosíntesis de fenilpropanoides de Arabidopsis	6
Figura 3. Esquema ilustrando plantas inclinadas y sección de tallo seleccionada	7
Figura 4. Respuesta gravitrópica temprana en ápice de <i>P. radiata</i>	9
Figura 5. Gel de agarosa de amplicones obtenidos por RACE	31
Figura 6. Secuencia aminoacídica del largo completo obtenida de PrMADS10 (A) y PrMADS11 (B)	32
Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias aminocídicas de PrMADS10 y PrMADS11	33
Figura 8. Alineamiento de secuencias del motivo MADS-box	34
Figura 9. Análisis filogenético del largo completo de las proteínas predichas de PrMADS10 y PrMADS11 y otras proteínas de factores de transcripción MADS-box	35
Figura 10. Expresión relativa del gen <i>PrMADS10</i> inducida por respuesta gravitropica a tiempos tempranos	36
Figura 11. Expresión relativa del gen <i>PrMADS11</i> inducida por respuesta gravitropica a tiempos tempranos	37
Figura 12. Gel SDS/PAGE y Western blot de las proteínas recombinantes PrMADS10 y PrMAS11 expresadas en <i>S. cerevisiae</i>	38
Figura 13. Gel SDS/PAGE y Western blot de la proteína recombinante PrMADS11 expresada en <i>S. cerevisiae</i> analizada en 4 tiempos diferentes	38
Figura 14. Gel SDS/PAGE y Western blot de las proteínas recombinantes PrMADS10 y PrMAS11 purificadas	39
Figura 15. Ensayo EMSA de PrMADS10 y PrMADS11 con varios elementos de respuesta de ADN tipo CArG	40
Figura 16. Identificación líneas transgénicas T2 de <i>PrMADS10</i> en Arabidopsis	41

Figura 17. Identificación líneas transgénicas T2 de <i>PrMADS11</i> en Arabidopsis	42
Figura 18. Líneas transgénicas sobreexpresando 35S:: <i>PrMADS10</i> y 35S:: <i>PrMADS11</i> en Arabidopsis comparadas con plantas wild type a los 10 días de edad	43
Figura 19. Selección de plantas de Arabidopsis transformadas con el vector pBI121Ø	43
Figura 20. Genes regulados diferencialmente obtenidos mediante análisis de microarreglos	44
Figura 21. Mapa de rutas metabólicas reguladas por <i>PrMADS10</i> (A) y <i>PrMADS11</i> (B) en plantas transgénicas de Arabidopsis obtenidas mediante el programa MapMan	51
Figura 22. Expresión relativa del gen 35S:: <i>PrMADS10</i> en Arabidopsis	52
Figura 23. Niveles de transcrito de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en plantas de Arabidopsis sobreexpresando 35S:: <i>PrMADS10</i>	53
Figura 24. Expresión relativa del gen 35S:: <i>PrMADS11</i> en Arabidopsis	54
Figura 25. Niveles de transcrito de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en plantas de Arabidopsis sobreexpresando 35S:: <i>PrMADS11</i>	55
Figura 26. Análisis del contenido de lignina en tallos de Arabidopsis sobreexpresando <i>PrMADS10</i> y <i>PrMADS11</i>	56

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Partidores empleados para la obtención de la secuencia completa de los transcritos de los genes PrMADS10 y PrMADS11	18
Tabla 2. Partidores empleados para amplificar los marcos de lectura abiertos sin codón stop, y con sitios de restricción	18
Tabla 3. Partidores empleados para amplificar los marcos de lectura abiertos completos, y con sitios de restricción	18
Tabla 4. Partidores empleados en los ensayos de qPCR	27
Tabla 5. Lista de los 50 genes sobreexpresados en PrMADS10 obtenidos mediante análisis de microarreglos	45
Tabla 6. Lista de los 50 genes sobreexpresados en PrMADS11 obtenidos mediante análisis de microarreglos	46
Tabla 7. Lista de los 50 genes regulados negativamente en PrMADS10 obtenidos mediante análisis de microarreglos	47
Tabla 8. Lista de los 50 genes regulados negativamente en PrMADS11 obtenidos mediante análisis de microarreglos	49

ABREVIACIONES

AG	Gen Agamous
DEFA	Gen Deficiens
GLO	Gen Globosa
CArG	Elemento de DNA reconocido por proteínas MADS-box
ARNm	ARN mensajero.
ADNc	ADN sintetizado a partir de ARN mensajero
ADNg	ADN genómico
MS	Medio de cultivo semisólido propuesto por Murashige-Skoog
mM	Micromolar
YPD	Medio para crecer levadura
YMM	Medio mínimo para levadura
ORF	Marco abierto de lectura, sección codificante de un gen sin codón terminal
UTR	región no codificante
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR en tiempo real
GUS	Gen de la <i>β-glucoronidasa</i>
p/v	Relación peso volumen
NaOH	Hidróxido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
EMSA	Ensayo de movilidad electroforética
TGA	Acido tioglicólico
rpm	Revoluciones por minuto
Wt	Línea silvestre
TM	Temperatura de hibridación de partidores con la secuencia de ADN
PM	Peso molecular
KAN	Kanamicina
FT	Factor de transcripción