



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Estudio del papel de los factores de transcripción SHI/STY
en la formación del estigma de *Arabidopsis thaliana*

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Ballester Clausell, David

Tutor/a: Niños Rodenes, Regina

Cotutor/a externo: FERRANDIZ MAESTRE, CRISTINA

Director/a Experimental: BALLESTER FUENTES, PATRICIA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Estudio del papel de los factores de transcripción SHI/STY en la formación del estigma de *Arabidopsis thaliana*

Trabajo Final de Máster
M. U. en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas
Enero de 2023

Autor: David Ballester Clausell

Tutora: Cristina Ferrándiz Maestre

Directora experimental: Patricia Ballester Fuentes

Tutora UPV: Regina Niños Rodenes



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Biología Molecular
y Celular de Plantas



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

AGRADECIMIENTOS

Qui m'havia de dir fa dos anys, abans de començar les meues pràctiques del grau, que ara estaria escrivint els agraïments del meu TFM relacionat amb la biotecnologia molecular i cel·lular de plantes. Només puc estar agraït a tots els que heu compartit amb mi aquest camí que la vida m'ha regalat en el IBMCP. Tot el que he aconseguit, no haguera sigut possible sense la vostra ajuda i companyia. Per tant, vull donar les gràcies a:

Cristina, per donar-me l'oportunitat de realitzar aquest treball i per la confiança que em transmetia cada volta que entrava al seu despatx.

Patri, per guiar-me per aquest camí des de les meues pràctiques fins a aquest treball, sempre disposada a ajudar-me en el que fera falta, i donar-me consell i suport en els moments més indicats.

Clara, per mostrar-me i transmetre'm la immensa passió que sent per la ciència i per sempre estar disposada a ajudar-me i donar-me consells.

Ana Alarcia, Irene, Vicent i Edu, per la seua inestimable ajuda i per la seua paciència amb mi.

Carol per la seua reciprocitat i ajuda en el xicotet temps que vam compartir bancada i preocupacions.

Francisca, Ana Berbel, Majo, Marcos i Ricardo, per l'ajuda i consells que m'han proporcionat.

Maria, Dani i Sam, amb els quals vaig formar el "Team Semillas", per fer-me passar el màster d'una manera més agradable i viure experiències úniques. Espere que la distància no ens faça esborrar tot el que hem viscut junts després d'haver-nos juntat en el primer treball de classe.

Nama, per estar sempre disposada a escoltar-me cada vegada que tornava al pis, donar-me suport i aconseguir que m'evadira de les preocupacions del dia a dia amb les seues curiositats.

Mon pare Manolo i ma mare Lucía, dos pilars fonamentals en la meua vida que m'han donat suport en tot moment i m'han fet ser la persona que soc a hores d'ara.

Ma "*uela*" Lucía, per estar sempre disposada a escoltar els experiments que feia en les plantes encara que no ho entenguera, per creure sempre en mi i per donar-me suport en tot moment.

Ma "*uelo*" Vicent, perquè estic segur que m'ha ajudat i donat suport en tot aquest procés encara que no es trobe present en aquest món. Espere que estiga molt orgullós de tot el que ha aconseguit el seu net.

A tots els que m'heu acompanyat en aquest camí, MOLTES GRÀCIES.

DAVID

Resumen

En *Arabidopsis thaliana*, la familia de genes *SHORT INTERNODES/STYLISH* (*SHI/STY*) está compuesta por once genes que codifican proteínas de función redundante que presentan un dominio RING-like zinc finger de 43 aminoácidos altamente conservado. Los mutantes múltiples *shi/sty* presentan defectos en el desarrollo de la parte apical del gineceo, fenotipo muy similar al de los mutantes de los genes *NGATHA* (*NGA*), que codifican factores de transcripción con un dominio de unión al DNA de tipo B3.

Estudios recientes han demostrado que los factores de transcripción *NGA* forman un complejo con *INDEHISCENT* (*IND*), *HECATE* (*HEC*) y *SPATULA* (*SPA*) con el fin de dirigir el desarrollo del estigma en *Arabidopsis thaliana*. El objetivo de este trabajo fue identificar el posible rol de los genes *SHI/STY* en la formación del estigma y si lo hace formando parte de este complejo transcripcional, mediante la caracterización de la interacción entre los genes *SHI/STY* y *HEC*.

Debido a que no se observaron diferencias significativas en el patrón de expresión de los genes *HEC* y *STY* en los mutantes de pérdida de función de *STY* y *HEC*, respectivamente, y a que la sobreexpresión o la pérdida de función de ambos genes provocaba cambios en el desarrollo de la parte apical del gineceo, se concluyó que *HEC* y *STY* podían actuar de manera conjunta en el desarrollo del estilo y del estigma. La capacidad de interacción de *STY* con las proteínas del complejo *HEC*, *NGA* y *SPT*, comprobado por complementación bimolecular de la fluorescencia (*BiFC*), proporcionó la idea de que la interacción de *STY* con el complejo *HEC-NGA-IND-SPT* podría ser esencial para especificar y desarrollar el estigma de *A. thaliana*.

Palabras clave: gineceo; estilo; estigma; *Arabidopsis thaliana*; *SHORT INTERNODES/STYLISH*; *HECATE*

Resum

A *Arabidopsis thaliana*, la família de gens *SHORT INTERNODES/STYLISH* (*SHI/STY*) es compon d'onze gens que codifiquen proteïnes de funció redundant que presenten un domini RING-like zinc finger de 43 aminoàcids altament conservat. Els mutants múltiples *shi/sty* presenten defectes en el desenvolupament de la part apical del gineceu, fenotip molt similar al dels mutants dels gens *NGATHA* (*NGA*), que codifiquen factors de transcripció amb un domini d'unió al DNA de tipus B3.

Estudis recents han demostrat que els factors de transcripció *NGA* formen un complex amb *INDEHISCENT* (*IND*), *HECATE* (*HEC*) i *SPATULA* (*SPA*) amb la finalitat de dirigir el desenvolupament de l'estigma d'*Arabidopsis thaliana*. L'objectiu d'aquest treball va ser identificar el possible rol dels gens *SHI/STY* en la formació de l'estigma y si ho fa formant part d'aquest complex transcripcional, mitjançant la caracterització de la interacció entre els gens *SHI/STY* i *HEC*.

Pel fet que no es van observar diferències significatives en el patró d'expressió dels gens *HEC* i *STY* en els mutants de pèrdua de funció de *STY* i *HEC*, respectivament, i al fet que la sobreexpressió o la pèrdua de funció de tots dos gens provocava canvis en el desenvolupament de la part apical del gineceu, es va concloure que *HEC* i *STY* podien actuar de manera conjunta en el desenvolupament de l'estil i de l'estigma. La capacitat d'interacció de *STY* amb les proteïnes del complex *HEC*, *NGA* i *SPT*, comprovat per complementació bimolecular de la fluorescència (*BiFC*), va proporcionar la idea que la interacció de *STY* amb el complex *HEC-NGA-IND-SPT* podria ser essencial per a especificar i desenvolupar l'estigma de *A. thaliana*.

Paraules clau: gineceu; estil; estigma; *Arabidopsis thaliana*; *SHORT INTERNODES/STYLISH*; *HECATE*

Abstract

In *Arabidopsis thaliana*, the *SHORT INTERNODES/STYLISH* (*SHI/STY*) gene family is composed of eleven genes encoding redundant function proteins with a highly conserved 43 amino acid RING-like zinc finger domain. Multiple *shi/sty* mutants are defective in the development of the apical part of the gynoecium, a phenotype very similar to the mutants of *NGATHA* (*NGA*) genes, which encode transcription factors with a B3-type DNA binding domain.

Recent studies have shown that *NGA* transcription factors form a complex with *INDEHISCENT* (*IND*), *HECATE* (*HEC*) and *SPATULA* (*SPA*) to direct stigma development in *Arabidopsis thaliana*. The aim of this work was to identify the possible role of *SHI/STY* genes in stigma formation and whether it does so as part of this transcriptional complex through characterising the interaction between *SHI/STY* and *HEC* genes.

Since no significant differences in the expression pattern of *HEC* and *STY* genes were observed in *STY* and *HEC* loss-of-function mutants, respectively, and overexpression or loss-of-function of both genes caused changes in the development of the apical part of the gynoecium, it was concluded that *HEC* and *STY* could act together in the development of the style and stigma. The ability of *STY* to interact with *HEC*, *NGA* and *SPT* complex proteins, tested by bimolecular fluorescence complementation (BiFC), provided the idea that the interaction of *STY* with the *HEC-NGA-IND-SPT* complex might be essential for specifying and developing the stigma of *A. thaliana*.

Keywords: gynoecium; style; stigma; *Arabidopsis thaliana*; *SHORT INTERNODES/STYLISH*; *HECATE*

Listado de abreviaturas

°C	Grados Celsius
$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$	Microeinstein por metro cuadrado por segundo al cuadrado
$\mu\text{g/ml}$	Microgramo por mililitro
μl	Microlitro
μM	Micromolar
CaMV35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CDS	Región codificante del gen
cm	Centímetro
CO₂	Dióxido de carbono
Col-0	Ecotipo Columbia
CRC	Factores de transcripción CRABS-CLAW
CRC	Genes <i>CRABS-CLAW</i>
Ct	Ciclo umbral
C-terminal	Carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinuclósidos trifosfato
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F1	Generación filial 1
F2	Generación filial 2
FAE	Formaldehido-ácido acético-etanol
g/l	Gramo por litro
gDNA	DNA genómico

GFP	Proteína fluorescente verde
GUS	β -glucuronidasa
H₂O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
HEC	Factores de transcripción HECATE
HEC	Genes <i>HECATE</i>
kb	Kilobase
KOH	Hidróxido de potasio
kV	Kilovoltios
LB	Medio Luria-Bertani
mg/l	Miligramo por litro
mg/ml	Miligramo por mililitro
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSS	Medio Murashige y Skoog con sacarosa
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NGA	Factores de transcripción NGATHA
NGA	Genes <i>NGATHA</i>
nm	Nanómetros
N-terminal	Amino terminal
o/n	Over night (toda la noche)
p/v	Peso por volumen

pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	PBS con Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SHY/STY	Factores de transcripción SHORT INTERNODES/STYLISH
<i>SHY/STY</i>	Genes <i>SHORT INTERNODES/STYLISH</i>
SPT	Factores de transcripción SPATULA
<i>SPT</i>	Genes <i>SPATULA</i>
STY	Factores de transcripción STYLISH
<i>STY</i>	Genes <i>STYLISH</i>
TBE	Tampón Tris/Borato/EDTA
Tm	Temperatura de fusión estimada
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
Tween	Polisorbato
v/v	Volumen por volumen
WT	Ecotipo silvestre

ÍNDICE

1.	Introducción	1
1.1.	Desarrollo del gineceo en <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
1.2.	Los genes <i>HECATE (HEC)</i>	3
1.3.	Los genes <i>SHORT INTERNODES/STYLISH (SHI/STY)</i>	5
1.4.	Otros genes implicados en el desarrollo del estilo y estigma de <i>A. thaliana</i>	9
2.	Objetivos	12
3.	Material y métodos	12
3.1.	Material bacteriano.....	12
3.1.1.	Cepas bacterianas	12
3.1.2.	Medios de cultivo bacteriano.....	12
3.1.3.	Suplementos de los medios de cultivo bacterianos.....	13
3.1.4.	Condiciones de cultivo de microorganismos.....	13
3.1.5.	Glicerizados.....	13
3.2.	Material vegetal	13
3.2.1.	Líneas vegetales	13
3.2.2.	Condiciones de cultivo en el invernadero	14
3.2.3.	Medios de cultivo	14
3.2.4.	Suplementos del medio de cultivo de plantas	15
3.2.5.	Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	15
3.2.6.	Cruce de plantas.....	15
3.3.	Métodos de biología molecular	15
3.3.1.	Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.....	15
3.3.1.1.	Extracción y purificación de DNA genómico	15
3.3.1.2.	Extracción y purificación de RNA total para la síntesis de cDNA	16
3.3.1.3.	Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	16
3.3.2.	Métodos de PCR.....	17
3.3.2.1.	PCR para genotipados	17
3.3.2.2.	PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	19
3.3.3.	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	20
3.3.4.	Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	20
3.3.5.	Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	20
3.3.6.	Técnicas de clonación.....	20
3.3.6.1.	Vectores plasmídicos utilizados	20

3.3.6.2.	Clonaje Gateway.....	21
3.3.7.	Hibridación <i>in situ</i>	22
3.3.8.	Secuenciación de DNA y secuencias obtenidas.....	27
3.3.9.	Transformación de células competentes de <i>E coli</i> y <i>A tumefaciens</i> por electroporación.....	27
3.4.	Metodología de plantas.....	28
3.4.1.	Complementación bimolecular de la fluorescencia (BIFC).....	28
3.4.2.	Esterilizado de semillas.....	29
3.4.3.	Selección de semillas transgénicas.....	30
3.5.	Detección de la actividad β -glucuronidasa (GUS).....	30
3.5.1.	Tinción GUS rápido.....	30
3.5.2.	Tinción GUS lento.....	30
3.6.	Análisis fenotípico de mutantes y líneas transgénicas.....	31
3.6.1.	Fotografía a bajo aumento.....	31
3.6.2.	Técnicas de microscopía.....	31
3.6.2.1.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	31
4.	Resultados y discusión.....	32
4.1.	Caracterización de la interacción entre <i>SHI/STY</i> y <i>HEC</i>	32
4.1.1.	Hipótesis 1: <i>SHI/STY</i> regula la expresión de los genes <i>HEC</i>	32
4.1.2.	Hipótesis 2: <i>HEC</i> regula la expresión de los genes <i>SHI/STY</i>	36
4.1.3.	Hipótesis 3: <i>HEC</i> y <i>SHI/STY</i> actúan de manera conjunta.....	39
4.1.3.1.	Caracterización fenotípica del mutante <i>35S:HEC3x35S:STY1</i>	39
4.1.3.2.	Caracterización fenotípica del mutante <i>sty1sty2hec1hec3</i>	43
4.1.4.	Comprobación de la interacción entre <i>STY</i> y <i>HEC</i>	48
4.2.	Evaluación de la formación de un complejo de mayor orden a partir del heterodímero <i>STY/HEC</i>	51
5.	Conclusiones.....	55
6.	Bibliografía.....	55
7.	Anexos.....	59
7.1.	Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.....	59

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del gineceo de <i>Arabidopsis thaliana</i> en estadio de antesis.....	1
Figura 2. Patrón de expresión de la construcción reportera de los genes <i>HECATE</i>	4
Figura 3. Fenotipo de los mutantes de pérdida de función <i>hec1hec3</i> y <i>hec1hec2hec3</i> y de la sobreexpresión de <i>HEC3</i>	5
Figura 4. Patrón de expresión de la construcción reportera del gen <i>STY1</i>	6
Figura 5. Patrón de expresión de la construcción reportera pSTY2:STY2:GUS del gen <i>STY2</i>	7
Figura 6. Fenotipo del mutante de pérdida de función <i>sty1sty2</i> y de la sobreexpresión de <i>STY19</i>	
Figura 7. Patrón de expresión del gen <i>NGA1</i> mediante hibridación <i>in situ</i>	10
Figura 8. Modelo propuesto para la actuación de los factores de transcripción implicados en la formación del estigma de <i>A. thaliana</i>	11
Figura 9. Cruces realizados para comprobar la hipótesis de que los genes <i>STY</i> regulan a los genes <i>HEC</i>	33
Figura 10. Patrón de expresión de <i>HEC2::GUS</i> en fondo silvestre, <i>35S:STY1</i> , <i>sty1sty2</i> y <i>sty1 sty2 shi lrp srs5</i> en inflorescencia y flor en estadio de antesis	34
Figura 11. Patrón de expresión de <i>HEC3::GUS</i> en fondo silvestre, <i>35S:STY1</i> y <i>sty1sty2</i> en inflorescencia y flor en estadio de antesis.	35
Figura 12. Cruces realizados para comprobar la hipótesis de que los genes <i>HEC</i> regulan a los genes <i>STY</i>	36
Figura 13. Patrón de expresión de <i>STY1::GUS</i> en fondo silvestre, <i>35S:HEC3</i> y <i>hec1hec3</i> en inflorescencia y flor en estadio de antesis.	37
Figura 14. Patrón de expresión de <i>STY2::GUS</i> en fondo silvestre, <i>35S:HEC3</i> y <i>hec1hec3</i> en inflorescencia y flor en estadio de antesis.	38
Figura 15. Cruces realizados para comprobar la hipótesis de la acción conjunta entre los genes <i>STY</i> y <i>HEC</i>	39
Figura 16. Morfología general de la planta resultante del cruce de la doble sobreexpresión de <i>STY</i> y <i>HEC</i>	40
Figura 17. Morfología de la inflorescencia y de flor en antesis de la doble sobreexpresión de <i>STY</i> y <i>HEC</i>	41
Figura 18. Morfología de la flor en antesis y detalle de la parte apical del gineceo de la doble sobreexpresión de <i>STY</i> y <i>HEC</i> mediante microscopía electrónica de barrido.....	42
Figura 19. Morfología de los frutos de la doble sobreexpresión de <i>STY</i> y <i>HEC</i>	43
Figura 20. Morfología de la roseta del cuádruple mutante <i>sty1sty2hec1hec3</i>	44
Figura 21. Morfología general del cuádruple mutante <i>sty1sty2hec1hec3</i>	44
Figura 22. Morfología de la inflorescencia y de flor en antesis del cuádruple mutante <i>sty1sty2hec1hec3</i>	45
Figura 23. Morfología de la flor en antesis y detalle de la parte apical del gineceo del mutante <i>sty1sty2hec1hec3</i> mediante microscopía electrónica de barrido.....	46

Figura 24. Morfología de las anteras del mutante <i>sty1sty2hec1hec3</i> mediante microscopía electrónica de barrido.....	47
Figura 25. Morfología de los frutos del cuádruple mutante <i>sty1sty2hec1hec3</i>	48
Figura 26. Estudio de la interacción proteína-proteína entre <i>STY</i> y <i>HEC</i>	49
Figura 27. Estudio de la interacción proteína-proteína entre <i>STY1</i> y <i>STY2</i>	50
Figura 28. Estudio de la interacción proteína-proteína entre <i>STY</i> y <i>SPT</i>	51
Figura 29. Estudio de la interacción proteína-proteína entre <i>STY</i> y <i>NGA</i>	52
Figura 30. Patrón de expresión de <i>NGA1</i> en flores en estadio de post-antesis de la doble sobreexpresión de <i>STY</i> y <i>HEC</i> y el cuádruple mutante <i>sty1sty2hec1hec3</i>	52
Figura 31. Patrón de expresión de <i>NGA1</i> en flores en estadio de pre-antesis del cuádruple mutante <i>sty1sty2hec1hec3</i>	53
Figura 32. Niveles de expresión de los genes <i>NGA1</i> , <i>NGA2</i> , <i>NGA3</i> y <i>NGA4</i> en el cuádruple mutante <i>sty1sty2hec1hec3</i>	54

Índice de tablas

Tabla 1. Estadios del desarrollo de la flor y el fruto de <i>A. thaliana</i>	2
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	12
Tabla 3. Suplementos de los medios de cultivo bacterianos	13
Tabla 4. Líneas vegetales utilizadas en este trabajo	13
Tabla 5. Suplementos empleados en los medios de cultivo de plantas.....	15
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los genes estudiados.....	17
Tabla 7. Programas de PCR utilizados para el genotipado de cada uno de los genes estudiados.	18
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para analizar la expresión de los genes <i>NGATHA</i> mediante RT-qPCR.....	19
Tabla 9. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo	20
Tabla 10. Oligonucleótidos y programa de PCR utilizados para la amplificación del gen <i>STY2</i> ..	21
Tabla 11. Programa utilizado para procesar los tejidos utilizados en la hibridación <i>in situ</i>	23
Tabla 12. Oligonucleótidos y programa de PCR utilizados para preparar la sonda del gen <i>NGA1</i>	24
Tabla 13. Condiciones utilizadas en la transformación de células de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> mediante electroporación.....	28

1. Introducción

1.1. Desarrollo del gineceo en *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta angiosperma dicotiledónea de la familia de las brasicáceas utilizada universalmente como modelo en los estudios de genética, fisiología y biología molecular de plantas. Debido a que los aspectos biológicos de esta planta no difieren del resto de angiospermas, las conclusiones obtenidas en estos estudios pueden ser extrapoladas a otras especies.

Las flores de *A. thaliana*, como las del resto de angiospermas, están constituidas por cuatro anillos concéntricos o verticilos. En el verticilo más exterior, la flor de *A. thaliana* presenta cuatro sépalos. En el siguiente se encuentran cuatro pétalos blancos en posiciones alternas a los sépalos. Seguidamente, se sitúan cuatro estambres en posición medial y dos laterales. Finalmente, en el verticilo central se encuentra el órgano reproductor femenino, el gineceo. Éste está compuesto por dos carpelos que se encuentran unidos a lo largo del plano medial por un falso septum (Becker, 2020).

En el estadio de antesis, el gineceo de *A. thaliana* puede ser dividido en tres regiones: estigma, estilo y ovario (Figura 1).

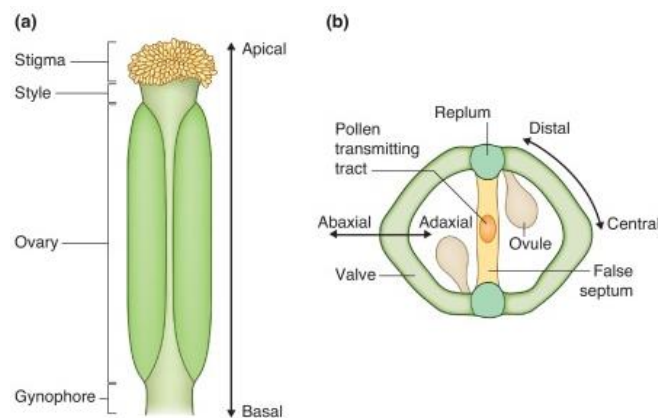


Figura 1. Esquema del gineceo de *Arabidopsis thaliana* en estadio de antesis. (a) Vista en plano frontal. (b) Vista en plano transversal. (Tomado de: Becker, 2020)

El estigma está formado por una sola capa de células papilares alargadas (papilas estigmáticas). Tiene la función de capturar los granos de polen, permitiendo la germinación y los primeros pasos del crecimiento del tubo polínico (Herrera-Ubaldo y de Folter, 2022). El estilo es un cilindro sólido y corto que conecta el estigma con el ovario y está formado por células epidérmicas que presentan depósitos de cera. El ovario está compuesto por dos valvas que se conectan por el replum en el exterior. En el interior

está dividido por el septum en dos cámaras o lóculos donde se sitúan cuatro filas de óvulos de manera longitudinal (Simonini y Ostergaard, 2019).

A su vez, las valvas se encuentran formadas mediante varias capas de células. La más externa es el exocarpo, que está formado por una capa de células intercaladas con estomas inmaduros. Seguidamente se encuentra el mesocarpo, que está formado por tres capas de células del clorénquima. Finalmente, el endocarpo consta de una epidermis interna con células grandes, isodiamétricas, lignificadas y de paredes delgadas y una capa subepidérmica de células pequeñas y alargadas (Ferrándiz et al., 1999; Roeder y Yanofsky, 2006).

El tracto de transmisión es un tejido enriquecido en una matriz extracelular de polisacáridos que tiene la función de dirigir el crecimiento del tubo polínico hasta su llegada al óvulo (Simonini y Ostergaard, 2019). El margen de la valva se encuentra entre la valva y el replum y se puede diferenciar en una capa lignificada y una capa de separación. La capa de separación está compuesta por células isodiamétricas, que secretan enzimas hidrolíticas que permiten que se genere la dehiscencia del fruto maduro con el objetivo de dispersar las semillas (Dong y Wang, 2015). El ginóforo se encuentra en la base del ovario y tiene la función de conectar el gineceo con el resto de la planta (Simonini y Ostergaard, 2019).

El desarrollo de la flor de *A. thaliana* se puede dividir en 20 estadios:

Tabla 1. Estadios del desarrollo de la flor y el fruto de *A. thaliana* (adaptado de Roeder y Yanofsky, 2006)

Estadio	Características
1	El primordio floral es visible en el meristemo inflorescente
2	El primordio floral se agranda y empieza a separarse del meristemo inflorescente
3	Se forma el primordio de los sépalos
4	El primordio de los sépalos cubre parcialmente el meristemo floral
5	Se forman los primordios de pétalos y estambres. El meristemo floral se expande para formar una plataforma donde se desarrollará el gineceo
6	Los sépalos cierran la flor y se empieza a formar el gineceo
7	Se forma el pedúnculo de los estambres y el gineceo crece como un tubo hueco
8	Las anteras desarrollan lóculos. El gineceo crece y se ensancha
9	Los pétalos desarrollan un pedúnculo basal. En el gineceo, se forma el septum
10	El primordio de los pétalos alcanza la altura de los estambres laterales. Formación de los primordios de los óvulos. Se empiezan a formar las papilas estigmáticas
11	Las papilas estigmáticas cubren el estigma. Se empieza a depositar cera en las células del estilo. Se inicia la formación de los integumentos
12	Los pétalos alcanzan la altura de los estambres mediales. El gineceo está listo para la fertilización y las valvas, márgenes de la valva, replum y estilo comienzan a diferenciarse morfológicamente
13	Antesis. La flor se abre. Ocurre la polinización

Estadio	Características
14	Las anteras sobrepasan el estigma. Ocurre la fertilización
15	El gineceo se elonga y se extiende más allá de las anteras. Lignificación del xilema
16	Los sépalos, pétalos y estambres se secan y caen del fruto
17	El fruto elonga completamente. La capa lignificada del margen de la valva y el endocarpo se lignifican
18	El fruto se amarillenta
19	El fruto se seca y se vuelve marrón. Ocurre la dehiscencia del fruto por la separación de las valvas
20	Dispersión de las semillas

1.2. Los genes *HECATE* (*HEC*)

La familia génica *HECATE* (*HEC*) codifica tres factores de transcripción hélice-bucle-hélice (bHLH) esenciales en la formación del estilo, estigma, septum y tracto de transmisión de *Arabidopsis thaliana* (Gremski et al., 2007; Schuster et al., 2015).

Las proteínas bHLH son una de las familias más grandes de factores de transcripción de *A. thaliana*. El dominio bHLH consta de aproximadamente 60 aminoácidos altamente conservados en todos los organismos eucariotas y está compuesto por una región básica y una región hélice-bucle-hélice. La región básica permite la unión de la proteína a cajas E (CANNTG) o cajas G (CACGTG) del DNA, mientras que el motivo HLH es requerido para la dimerización con el objetivo de regular la expresión de sus genes diana (Hao et al., 2021).

Los factores de transcripción *HEC* presentan un dominio bHLH similar al de los factores *INDEHISCENT* (*IND*), considerando estas dos familias de factores de transcripción como un subgrupo de las proteínas bHLH (Heim et al., 2003). En este dominio, ambas familias no presentan el glutamato en posición 13, característico de los dominios bHLH y que permiten la unión al DNA, sugiriendo que podría realizarse mediante el uso de otros aminoácidos (Ellenberger et al., 1994; Ma et al., 1994). Recientemente, se ha comprobado que el gen *IND* surgió a partir de una duplicación del gen *HEC3* en la familia de las brassicáceas (Pabón-Mora et al., 2014).

La expresión de los genes *HECATE* se observa por primera vez en el replum y en la zona apical del gineceo (a partir de la cual se desarrollará el estigma) en el estadio 8 del desarrollo de la flor de *A. thaliana*. Desde el estadio 10 al 13 (Figura 2), la expresión se encuentra en el tracto de transmisión y en el estigma en desarrollo. Se puede observar en estos estadios que *HEC1* y *HEC2* se expresan en óvulos y *HEC3* en los funículos del óvulo (Gremski et al., 2007).

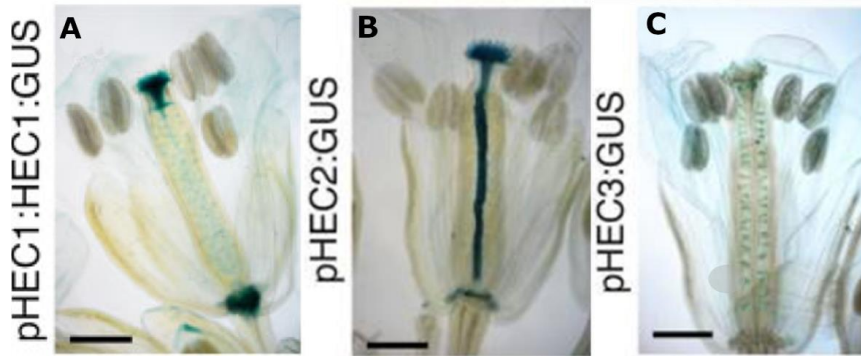


Figura 2. Patrón de expresión de la construcción reportera de los genes *HECATE*. (A) Patrón de expresión de pHEC1:HEC1:GUS en flor en antesis de Col-0. (B) Patrón de expresión de pHEC2:HEC2:GUS en flor en antesis de Col-0. (C) Patrón de expresión de pHEC3:HEC3:GUS en flor en antesis de Col-0. Escala: 200 μ m. (Tomado de: Ballester et al., 2021)

En el gineceo del mutante de pérdida de función *hec1-1hec3-1* (Figura 3B) se puede observar el alargamiento del estilo, papilas estigmáticas más pequeñas y variables en número, y el tracto de transmisión reducido tanto en la zona del estilo como en la del septum comparado con el fenotipo silvestre. Además, se pueden observar defectos en el crecimiento del tubo polínico que provocan una disminución de la fertilidad (Gremski et al., 2007).

El triple mutante *hec1hec2hec3* (Figura 3C) presenta una elevada esterilidad debido a efectos importantes en el desarrollo apical, con ausencia completa del tejido estigmático y gran alargamiento en la región apical del estilo. Además, se observan efectos severos en el septum y en el desarrollo del tracto de transmisión. En comparación con el mutante *hec1-1hec3-1*, este fenotipo implica que los genes *HEC* son funcionalmente redundantes y juegan un papel importante en el desarrollo del tracto de transmisión, del estigma y del septum (Gremski et al., 2007; Schuster et al., 2015).

Estudios recientes han mostrado que los mutantes *hec1hec2* presentan una reducción de la capacidad de germinación de la semilla en respuesta a luz roja y tienen reducidos los niveles de clorofila y carotenoides en comparación con el fenotipo silvestre en oscuridad, luz roja y rojo lejano. Además, se ha comprobado que los factores de transcripción *HEC1* y *HEC2* pueden heterodimerizar con factores de interacción del fitocromo (PIF) y regular de manera negativa las proteínas PIF para promover la fotomorfogénesis (Zhu et al., 2016; Kathare et al., 2020).

La sobreexpresión de los genes *HEC1* y *HEC3* (Figura 3D) ocasiona la pérdida de la polaridad apical-basal del gineceo, papilas estigmáticas más grandes, ovarios

reducidos, formación ectópica de tejido carpeloide y ginóforos elongados. Este fenotipo sugiere la alteración en los niveles, el transporte y/o la percepción de auxinas (Gremski et al., 2007). Además, se ha descubierto que HEC1, HEC2 y HEC3 pueden activar genes *ARR* de tipo A, reguladores negativos de la señalización por citoquininas, para restringir las respuestas a esta hormona durante el desarrollo del gineceo (Schuster et al., 2015).

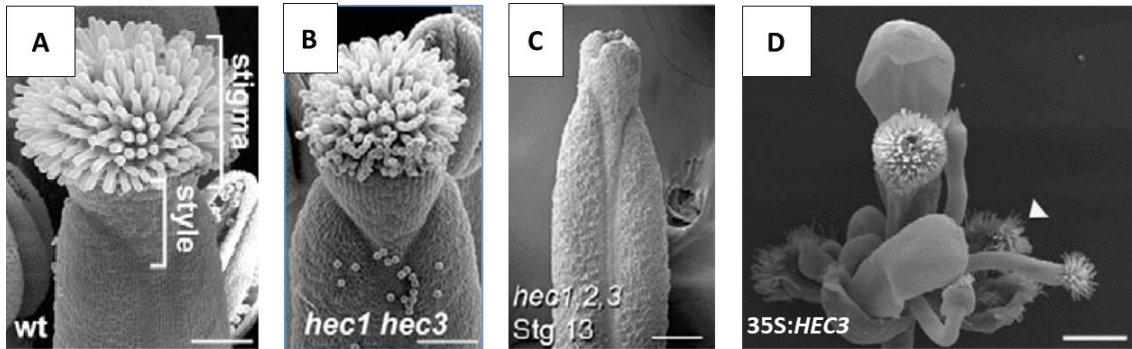


Figura 3. Fenotipo de los mutantes de pérdida de función *hec1hec3* y *hec1hec2hec3* y de la sobreexpresión de *HEC3*. (A) Flor en antesis de Col-0. (B) Flor en antesis del mutante *hec1hec3*. (C) Flor en antesis del mutante *hec1hec2hec3*. (D) Flor del mutante 35S:*HEC3*. La flecha indica tejido carpeloide. Escala: 100 μ m A-C. 400 μ m D (Tomado de: Gremski et al., 2007; Schuster et al., 2015)

1.3. Los genes *SHORT INTERNODES/STYLISH (SHI/STY)*

La familia génica *SHORT INTERNODES/STYLISH (SHI/STY)* codifica factores de transcripción que se encuentran presentes únicamente en plantas. Dentro de ellas, se pueden encontrar en número variable en diferentes especies de plantas, como, por ejemplo, 11 genes en *Arabidopsis* (*SHI*, *STY1*, *STY2*, *LRP1*, *SRS3*, *SRS4*, *SRS5*, *SRS6*, *SRS7*, *SRS8* y *SRS11*), 21 en soja y 6 en arroz. Están involucrados en la formación de raíces laterales, extensión del tallo, morfogénesis de la hoja, producción de nódulos radiculares, tiempo de floración y desarrollo del gineceo y estambres (Kuusk et al., 2002; Fang et al., 2022).

En su estructura, los factores de transcripción SHI/STY presentan dos regiones altamente conservadas: un dominio RING en dedos de zinc y un dominio IGGH. El dominio RING en dedos de zinc se encuentra en la región N-terminal de la proteína y consta de dos motivos proteicos pequeños que son capaces de coordinar una molécula de zinc cada uno, permitiendo que la proteína se una a DNA, RNA y proteínas. Por su parte, el dominio IGGH, característico de esta familia, se encuentra en la zona C-terminal de la proteína y está compuesto por cuatro residuos de isoleucina-glicina-

glicina-histidina (IGGH). Además, estas proteínas presentan una o dos regiones ricas en glicina y una señal de localización nuclear. El resto de la secuencia es completamente diferente en todos los miembros de la familia *SHI/STY* (Kuusk et al., 2006; Eklund et al., 2010).

La expresión del gen *STY1* (Figura 4A) se puede detectar por primera vez en la aparición del meristemo floral (estadio 1) y se observa en los primordios de los sépalos. La expresión en el gineceo se empieza a detectar desde su aparición (estadio 6). Más en detalle, en el gineceo la expresión de *STY1* se observa en primordios de óvulos en su aparición en el estadio 9. Con la elongación del gineceo, la expresión de *STY1* queda restringida a la parte apical del gineceo, donde, en los estadios 11-12 (Figura 4B), quedará recluida en una interfase entre el estilo y el estigma, para que, a partir del estadio 13, se observe una disminución en la expresión. Con el desarrollo de los óvulos, se puede denotar expresión de *STY1* en la epidermis de los funículos en desarrollo, al tegumento externo y en la parte apical de la nucela. Además, a partir del estadio 10 aproximadamente, se puede observar la expresión de *STY1* en la capa interna del septum. También se observa expresión en pétalos, en el primordio de los estambres y en el tapete de las anteras (Kuusk et al., 2002).

En referencia a las anteras, *STY1* se expresa desde el establecimiento del primordio de los estambres hasta el estadio 3-4. A partir del estadio 5 la expresión de *STY1* se observa en el extremo apical de la antera. En el estadio 9 se activa la expresión en el tapetum de la antera y, durante los estadios 12 y 13, se puede observar en los granos de polen (Estornell et al., 2018).

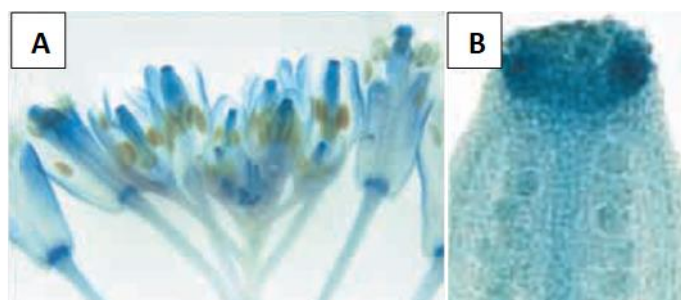


Figura 4. Patrón de expresión de la construcción reportera del gen *STY1*. (A) Patrón de expresión de pSTY1:STY1:GUS en inflorescencia de Col-0. (B) Patrón de expresión de pSTY1:STY1:GUS en flor en estadio 12 de Col-0. (Tomado de: Kuusk et al., 2002)

La expresión de *STY2* (Figura 5) se puede detectar por primera vez en la parte apical del gineceo en el estadio 9. A partir del estadio 10, se puede observar una fuerte expresión en el estilo y estigma. Después de la polinización, la expresión desaparece del estigma, pero permanece en el estilo hasta la maduración completa de la silicua (Kuusk et al., 2002). Además, se puede detectar expresión de *STY2* en las células madre del polen y en las células del tapetum en los estadios 6 y 8, respectivamente, y se encuentra activo en estas células hasta el estadio 11. Como *STY1*, la expresión de *STY2* se puede observar en el extremo apical de la antera desde el estadio 5 (Estornell et al., 2018).

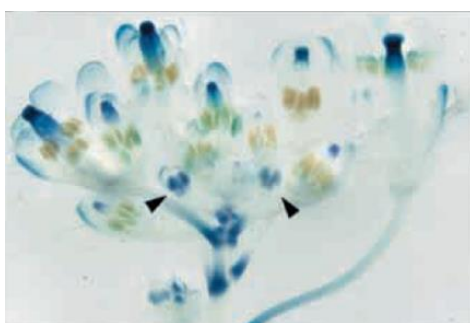


Figura 5. Patrón de expresión de la construcción reportera pSTY2:STY2:GUS del gen *STY2*. (Tomado de: Kuusk et al., 2002)

En tejidos vegetativos, podemos encontrar expresión tanto de *STY1* como de *STY2* en primordios foliares, estípulas, hidátodos de roseta, hojas caulinares y en primordios de raíces laterales. Además, la actividad de *STY2* se puede detectar en tricomas en desarrollo y pedicelos (Baylis et al., 2013).

El gen *STY1* es el único de la familia *SHI/STY* que presenta fenotipo en un mutante sencillo. Su pérdida de función (mutante *sty1-1*) genera una pequeña cavidad en la zona medial del estilo, expansión de células estilares y presencia en la parte apical del gineceo y crecimiento de las células estigmáticas hacia todas las direcciones. Este fenotipo se ve aumentado en los mutantes múltiples *shi/sty*, debido a la gran redundancia que existe entre ellos. En flores en estadio 13 (Figura 6B) del doble mutante *sty1-1sty2-1*, se puede observar una gran cavidad central, que se encuentra rodeada de células estilares que crecen en 3-5 protuberancias cortas, quedando las papilas estigmáticas dentro de la cavidad. Además, se observa una reducción de los tejidos estigmático y estilar, ausencia de septum, alteración del patrón vascular y hojas de roseta y caulinares más serradas que las del fenotipo silvestre y de los mutantes

simples, característica más visible antes de que las hojas estén completamente expandidas (Kuusk et al., 2002; Kuusk et al., 2006; Sohlberg et al., 2006).

El fenotipo observado en los mutantes múltiples *shi/sty* es debido al fallo del establecimiento de la polaridad apical-basal en el gineceo. Sohlberg et al. (2006) observó que el patrón apical-basal de los mutantes *sty1sty2* era muy sensible a la inhibición del transporte polar de auxinas. Además, demostró que STY1 podía activar la transcripción del gen de biosíntesis de auxinas *YUCCA4*. Eklund et al. (2010) confirmó la interacción de STY con el promotor de *YUCCA4* y describió a la familia SHI/STY como reguladores esenciales del desarrollo de hojas y flores mediado por auxinas. Además, mostró que *STY1* podía tener un rol en la formación y mantenimiento del meristemo apical del tallo regulando los niveles de auxinas en el embrión.

La expresión constitutiva de los genes *STY1* y *STY2* genera plantas de tamaño considerablemente más pequeño que las silvestres, hojas de roseta epinásticas y estrechas y floración tardía en condiciones de día corto. En flores de plantas gravemente afectadas se observa como los pétalos son más cortos y estrechos que los del tipo silvestre y la fertilidad se ve muy reducida debido a la pobre elongación de los estambres y el bajo desarrollo de las anteras (Kuusk et al., 2002).

El gineceo presenta un estilo corto y de forma roma y una expresión ectópica de células estilares en las valvas (Figura 6C y 6D). Las células vecinas a éstas presentan mezcladas características de células estilares y de valva, sugiriendo que el cambio de una célula a otra ocurre de manera gradual. Las silicuas completamente desarrolladas son más cortas que las de tipo silvestre y el tercio superior se encuentra comprimido y ligeramente curvado, debido a la dificultad de expandirse de las células estilares ectópicas. La expresión ectópica de células estilares forma un continuo con las células verdaderas presentes en el estilo e impide que se defina el margen de la valva y la zona de dehiscencia en esta región, quedando las valvas parcialmente unidas al fruto después de la dispersión de las semillas (Kuusk et al., 2002).

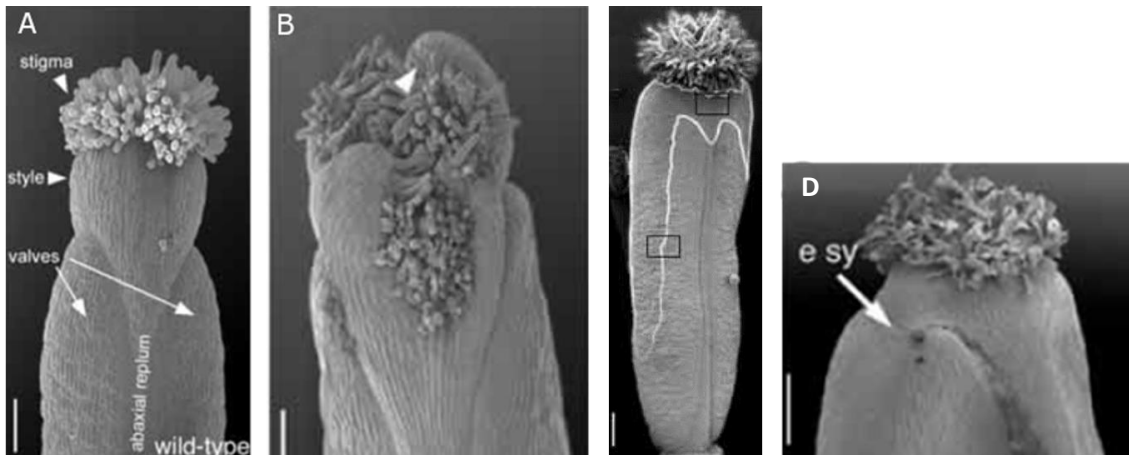


Figura 6. Fenotipo del mutante de pérdida de función *sty1sty2* y de la sobreexpresión de *STY1*. (A) Flor en antesis de Col-0. (B) Flor en antesis del mutante *sty1sty2* (C) Flor en antesis del mutante 35S:*STY1*. Se marca la zona de producción de células estilares ectópicas (D) Detalle de la parte apical del gineceo del mutante 35S:*STY1*. La flecha indica expresión ectópica de células estilares en la valva. Escala: 100 μ m. (Tomado de: Kuusk et al., 2002)

1.4. Otros genes implicados en el desarrollo del estilo y estigma de *A. thaliana*

El desarrollo del estilo y estigma de *A. thaliana* está controlado por múltiples genes funcionalmente redundantes debido a la gran importancia que tiene este tejido para la reproducción de la planta. Debido a ello, estos genes solo pueden ser estudiados con mutantes múltiples que generen un fenotipo severo en el desarrollo de la parte apical del gineceo.

Además de los genes *HEC* y *SHI/STY*, en el desarrollo del estilo y estigma de *A. thaliana* también son importantes los genes *NGATHA (NGA)*, *INDEHISCENT (IND)*, *SPATULA (SPT)* y *CRABS-CLAW (CRC)* entre otros.

Los genes *NGA (NGA1, NGA2, NGA3 y NGA4)* forman parte de un subgrupo de genes de la familia RAV que codifican factores de transcripción que contienen un dominio B3 de unión al DNA en posición N-terminal y carecen del dominio de unión a DNA tipo AP2, característico de la familia RAV. Actúan de manera redundante y dependiente de dosis para especificar el desarrollo del estilo. Los genes *NGA* y *SHI/STY* tienen un patrón de expresión muy similar, pero no presentan regulación transcripcional entre ellos. Además, los mutantes múltiples de pérdida de función de los genes *NGA* no presentan estigma, al igual que los mutantes múltiples *shi/sty*, siendo este fenotipo debido a la falta de activación de los genes de enzimas biosintéticas de auxinas

YUCCA2 y *YUCCA4*. Por lo tanto, *NGA* y *STY* podrían estar actuando de manera cooperativa en el desarrollo del estilo de *A. thaliana* regulando la síntesis de auxinas en la región apical del gineceo (Trigueros et al., 2009).

La expresión del gen *NGA1* (Figura 7) empieza a detectarse en la mitad adaxial del primordio floral en el estadio 2. En el estadio 7 se puede observar expresión de *NGA1* en los primordios del gineceo, estambres y pétalos. En el estadio 10, la expresión se encuentra restringida al tejido placentario, estilo, estigma y óvulos en desarrollo. En el estadio 11, la expresión de *NGA1* se puede detectar en óvulos, pero es baja en el estilo y estigma (Trigueros et al., 2009).

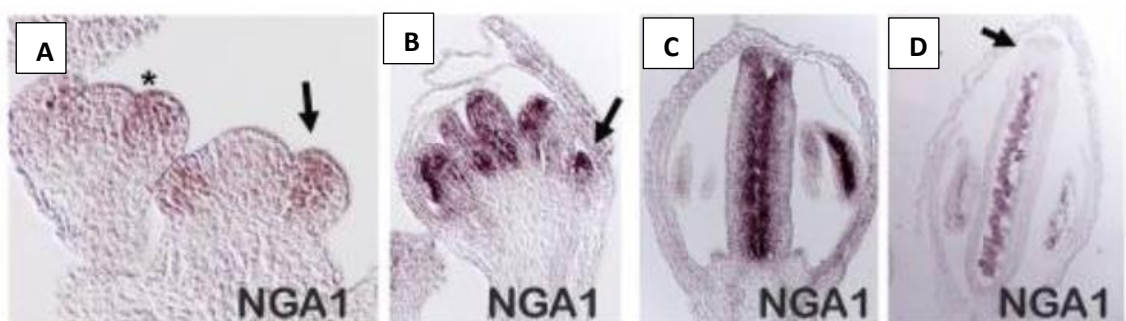


Figura 7. Patrón de expresión del gen *NGA1* mediante hibridación *in situ*. (A) Meristemo inflorescente de Col-0. (B) Flor de Col-0 en estadio 7. (C) Flor de Col-0 en estadio 9. (D) Flor de Col-0 en estadio 11. (Tomado de: Trigueros et al., 2009)

El gen *IND* codifica un factor de transcripción de la familia bHLH, el cual realiza un papel crucial en la dispersión de las semillas. Cuando el fruto madura, la expresión de *IND* es necesaria para formar una capa de células lignificadas y una capa de separación en la zona de dehiscencia del fruto. Además, se ha observado que este factor de transcripción es responsable de la relocalización de los transportadores de auxinas, permitiendo mantener un nivel mínimo en esta zona que posibilite la especificación de estas capas (Liljegren et al., 2004; Girin et al., 2011).

El gen *SPT* codifica un factor de transcripción de tipo bHLH implicado en la formación de la parte apical de la flor. La correcta participación de esta proteína en el desarrollo del gineceo depende de su interacción con el factor de transcripción *CRC*, codificado por un gen de tipo *YABBY*, siendo ambos genes diana de *AGAMOUS* (*AGA*). Aunque en los mutantes simples de estos genes se observan malformaciones parciales en el gineceo, este fenotipo se agrava en el doble mutante *crc spt*, en el que los carpelos permanecen sin fusionar y se reducen los tejidos estilar y estigmático y el número de

óvulos (Álvarez y Smyth, 1999). Girin et al. (2011) demostró que IND podía regular de manera directa y positiva la expresión de *SPT* y actúan de manera conjunta para regular genes involucrados en el transporte de auxinas.

Navarrete (2011) mostró que los factores de transcripción NGA y STY eran capaces de interactuar en presencia de CRC y funcionar de manera cooperativa, sin regulación transcripcional entre ellos, para, posteriormente, regular la biosíntesis de auxinas y especificar el desarrollo del estilo en *A. thaliana*.

Recientemente, Ballester et al. (2021) observó que el efecto de la sobreexpresión de los genes *NGA* y *HEC* dependía de la presencia de los factores de transcripción HEC y NGA, respectivamente. En este estudio se propuso la formación de un complejo HEC-NGA-IND-SPT para la formación del estigma de *A. thaliana* (Figura 8). Primeramente, los factores de transcripción HEC y NGA son capaces de interactuar para formar un heterodímero que activa la expresión del gen *IND*. Este factor de transcripción se unirá al heterodímero HEC-NGA formando un complejo de orden mayor (HEC-NGA-IND). Posteriormente, se incorporará *SPT*, formando un heterotetrámero que podrá regular genes diana aguas abajo para determinar el desarrollo del estigma y la correcta distribución de auxinas.

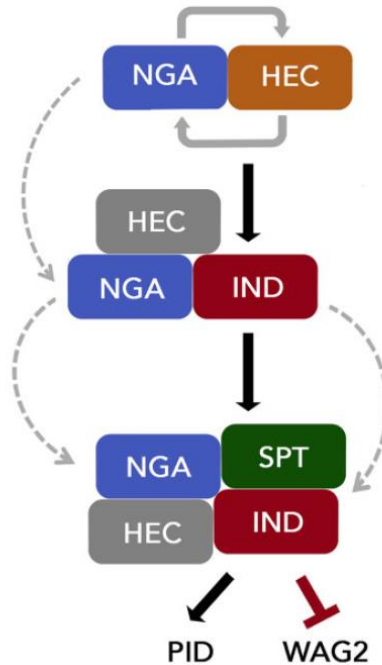


Figura 8. Modelo propuesto para la actuación de los factores de transcripción implicados en la formación del estigma de *A. thaliana*. (Tomado de: Ballester et al. 2021)

Debido a los estudios que demuestran que NGA es capaz de interactuar con STY y HEC y a la falta de estigma de los mutantes múltiples *shi/sty*, se puede pensar

que los genes *STY* podrían formar parte del complejo HEC-NGA-IND-SPT o actuar aguas arriba o aguas abajo de él.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es identificar el posible rol de los genes *SHI/STY* en la formación del estigma y si lo hace formando parte del complejo transcripcional NGA-HEC-IND-SPT para el desarrollo del estigma en *Arabidopsis thaliana*.

Este objetivo se puede concretar en los siguientes:

- Caracterizar la interacción entre los genes *SHI/STY* y *HEC* mediante análisis genéticos y moleculares
- Evaluar la formación de un complejo de mayor orden a partir del heterodímero *STY/HEC*

3. Material y métodos

En este apartado se describirá el material biológico y la metodología utilizada para conseguir los objetivos propuestos.

3.1. Material bacteriano

3.1.1. Cepas bacterianas

En este trabajo fueron utilizadas las siguientes cepas bacterianas, que se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Origen	Uso
Supercharge EZ10 (<i>E. Coli</i>)	Clontech	Clonación de vectores
C58 pMP90 (<i>A. tumefaciens</i>)	Koncz y Schell (1989)	Clonación de vectores para la transformación genética de plantas

3.1.2. Medios de cultivo bacteriano

Los cultivos bacterianos empleados en este trabajo se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) a pH 7.0, compuesto por triptona (1% p/v), extracto de levadura (0,5% p/v)

y NaCl (1% p/v). El pH se ajustó con NaOH. El medio sólido se consiguió con la adición de agar (1,5% p/v de concentración final).

3.1.3. Suplementos de los medios de cultivo bacterianos

Los suplementos empleados en los medios de cultivos bacterianos se encuentran recogidos en la Tabla 3:

Tabla 3. Suplementos de los medios de cultivo bacterianos

ANTIBIÓTICO	STOCK	DISOLVENTE	CONCENTRACIÓN	
			<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Kanamicina	100 mg/ml	H ₂ O	50 µg/ml	50 µg/ml
Espectinomicina	100 mg/ml	H ₂ O	100 µg/ml	-
Gentamicina	100 mg/ml	H ₂ O	50 µg/ml	-
Rifampicina	50 mg/ml	Metanol 90%	-	100 µg/ml

3.1.4. Condiciones de cultivo de microorganismos

Los cultivos líquidos de *E. coli* fueron incubados a 37 °C en agitación durante toda una noche (*o/n, over night*). El cultivo sólido en placa se incubó a 37 °C *o/n*. Los cultivos líquidos de *A. tumefaciens* se incubaron a 28 °C en agitación durante dos días. El cultivo sólido se realizó en placa y se incubó a 28 °C durante dos días.

3.1.5. Glicerizados

Para la conservación de las cepas utilizadas durante un periodo largo de tiempo, se realizaron glicerizados de las mismas, mediante la mezcla homogénea de 1 ml del cultivo bacteriano y 1 ml de glicerol (50%, p/v) en viales Cryovial de Simport. Posteriormente, fueron congelados en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C.

3.2. Material vegetal

3.2.1. Líneas vegetales

Tabla 4. Líneas vegetales utilizadas en este trabajo

	GENOTIPO	REFERENCIA
Ecotipo silvestre	Col-0	Redei, 1962
Líneas mutantes	<i>hec1-1hec3-1</i>	Gremski et al, 2007
	<i>sty1-1sty2-1</i>	Kuusk et al, 2002
	<i>sty1-1sty2-1hec1-1hec3-1</i>	Obtenido anteriormente en el laboratorio
	<i>sty1-1sty2-1shi-3lrp-1srs5-1</i>	Kuusk et al, 2006

	GENOTIPO	REFERENCIA
Líneas sobreexpresoras	35S: <i>HEC3</i>	Ballester, 2016
	35S: <i>STY1</i>	Kuusk et al, 2002
Líneas de GUS	<i>STY1p::GUS</i>	Kuusk et al, 2002
	<i>STY2p::GUS</i>	Kuusk et al, 2002
	<i>HEC2p::GUS</i>	Gremski et al, 2007
	<i>HEC3p::GUS</i>	Gremski et al, 2007

3.2.2. Condiciones de cultivo en el invernadero

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron sembradas en bandejas con alveolos de plástico de 6,5x6,5x6,5 cm con una mezcla de turba:perlita:vermiculita con proporción 2:1:1. Esta mezcla fue esterilizada previamente a 80 °C durante 20 minutos y humedecida con agua.

Una vez sembradas, las bandejas se cubrieron con film plástico y se mantuvieron en oscuridad y a 4 °C durante tres días para promover la germinación. Pasados estos días fueron llevadas a una cámara de cultivo, donde se mantuvieron en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), con un rango de temperatura entre 21-23 °C y una humedad del 50%. La cámara se ilumina mediante tubos fluorescentes standard F58W/133-T8 (Sylvania), que proporcionan luz blanca fría, con una intensidad de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$.

Con la aparición de las primeras hojas, se realizaron agujeros en el plástico y, al cabo de 3-4 días, se eliminó por completo. Las bandejas fueron regadas con solución Hoagland n° 1, suplementada con oligoelementos (Hewitt and Eden, 1953).

Cuando las plantas habían completado su ciclo vital se embolsaron de manera individual y se dejaron secando durante, al menos, 7 días. Posteriormente se mantuvieron secándose en una cámara de cultivo a 37 °C y se almacenaron en una cámara con 10 °C de temperatura, oscuridad y una humedad del 25%.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron cultivadas en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a 22 °C (día) y 18 °C (noche) en macetas de 12 cm de diámetro con una mezcla de turba:perlita:vermiculita con proporción 2:1:1, idéntica a la utilizada para *Arabidopsis thaliana*.

3.2.3. Medios de cultivo

Para el cultivo de semillas en placas Petri se utilizó el medio Murashige y Skoog con sacarosa (MSS) pH 5.9. La composición del medio fue 2.2 g/L medio Murashige y

Skoog que incluye vitaminas, 20 g/L sacarosa y 0.1 g/L MES. Se ajustó el pH con KOH y se añadieron 6 g/l de agar bacteriológico.

3.2.4. Suplementos del medio de cultivo de plantas

En la Tabla 5 se detallan los suplementos utilizados en los medios de cultivo de plantas.

Tabla 5. Suplementos empleados en los medios de cultivo de plantas

COMPUESTO	STOCK	DISOLVENTE	CONCENTRACIÓN
			<i>A. thaliana</i>
Higromicina	100 mg/ml	H ₂ O	40 mg/L
Ácido giberélico (GA3)	34,17 mg/ml	70% EtOH	17,3 mg/L
Timentina	500 mg/ml	H ₂ O	300 mg/L

3.2.5. Condiciones de cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de semillas de *A. thaliana* en medio MSS sólido se realizó en un fitotrón con condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) y temperatura constante de 25 °C. Este fitotrón está iluminado mediante tubos fluorescentes GroLux 36W (Sylvania) que proporcionan luz blanca fría, con una intensidad de 90 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$.

3.2.6. Cruce de plantas

Para realizar los cruces entre plantas de *A. thaliana*, las flores de la planta utilizada como parental femenino deben encontrarse en un estadio anterior a la autofecundación. Éstas fueron emasculadas y, posteriormente, se colocó el polen de una flor del parental masculino sobre la superficie de su estigma. Transcurridas tres semanas, donde el cruce creció en la planta madre, éste fue recogido y secado a 37 °C durante tres días, para, posteriormente, guardarse a 10 °C.

3.3. Métodos de biología molecular

3.3.1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos

3.3.1.1. Extracción y purificación de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico se partió de 10g, aproximadamente una hoja joven, de la planta a tratar, se depositó en un tubo eppendorf que contenía dos/tres

perlas de vidrio y se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente se trituró mediante el homogenizador de muestras MM400 (Retsch) durante 45 segundos a una frecuencia de 30 s⁻¹.

Con las muestras ya trituradas, se añadió 400 µL de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 7.5 y 0.5% EDTA en H₂O Mili-Q) a cada tubo eppendorf y se mezcló mediante vórtex durante 5 segundos. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 4 minutos y se transfirieron 300 µL del sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadieron 300 µL de isopropanol a cada tubo, se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos para recoger el DNA. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* durante aproximadamente una hora. Por último, el *pellet* fue resuspendido con 100 µL de H₂O Mili-Q y, si se procedía a realizar una PCR, se utilizaron 2 µL por 25 µL de reacción.

3.3.1.2. Extracción y purificación de RNA total para la síntesis de cDNA

La extracción de RNA total de las plantas se realizó con el kit E.Z.N.A.[®] total DNA/RNA isolation kit (Omega Bio-Tek), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. A partir del RNA extraído, se sintetizó el cDNA por transcripción reversa mediante la utilización de la SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

3.3.1.3. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* y *A. tumefaciens*

Con el fin de comprobar la correcta transformación de las células de *E. coli* mediante una posterior digestión con enzimas de restricción, se realizó el aislamiento de DNA plasmídico. Para ello se utilizó el kit NZYMiniprep (NZYTech), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, el DNA obtenido fue cuantificado con el espectrofotómetro NanoDrop[™] 2000.

El aislamiento de DNA plasmídico a partir de células de *A. tumefaciens* se realizó siguiendo el mismo procedimiento. Debido al bajo rendimiento y pureza del DNA obtenido, se procedió a transformar células de *E. coli*, con el fin de extraer una mayor concentración de DNA plasmídico y poder realizar una digestión con enzimas de restricción del plásmido.

3.3.2. Métodos de PCR

3.3.2.1. PCR para genotipados

La amplificación de las regiones genómicas y el genotipado de los mutantes utilizados en este trabajo se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se utilizó DNA genómico extraído de las plantas a analizar como molde, oligonucleótidos específicos para cada reacción (Tabla 6), tampón 5x Green GoTaq (Promega), 25 mM MgCl₂ (Promega), 10 μM dNTPs (Promega) y DNA polimerasa GoTaq (Promega). Además, se completó con agua Mili-Q hasta el volumen necesario para llevar a cabo la reacción. Los oligonucleótidos empleados como cebadores fueron sintetizados por la empresa Integrated DNA Technologies.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los genes estudiados

Mutante	Banda	Oligonucleótido	Secuencia
<i>sty1</i>	WT	SRSM	5' CAACTTCAATACACTACAAACCCAG 3'
		EST3	5' TTCACGGTGGCGTTTAGGAACG 3'
	Mutante	SRSM	5' CAACTTCAATACACTACAAACCCAG 3'
		Dspml	5' CTTATTTTCAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG 3'
<i>sty2</i>	WT	BcDNA1	5' ATGATCAATTCGGAGAGCAGCAACAACACC 3'
		BcDNA2	5' ATGATCACCAGAGCAACAAAACAAAAGACA 3'
	Mutante	SRS2:E	5' TGGGAGAAGCAACCGCAACATCG 3'
		Dspml	5' CTTATTTTCAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG 3'
<i>hec1</i>	WT	oKG156	5' ACCACAACAACACTTACCCTTTTC 3'
		oKG157	5' GTTCCACACCCTTTCATAACCACT 3'
	Mutante	oKG156	5' ACCACAACAACACTTACCCTTTTC 3'
		GabiT	5' CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC 3'
<i>hec2</i>	WT	HEC2 F (silv)	5' CTCACAAAACCTTAACTAGATGTCTGA 3'
		HEC2 R	5' ATGCTTTCTGAATCCAACACCC 3'
	Mutante	HEC2 F (mut)	5' CCGACACTCTTTAATTAAGTACTGACTC 3'
		HEC2 R	5' ATGCTTTCTGAATCCAACACCC 3'
<i>hec3</i>	WT	ILC-X3	5' TCCTAACAAACCCCTTATTTTCGTATCCA 3'
		ILC-X8	5' GTGCTATTTTCGTGAAGAGACAAGAGA 3'
	Mutante	ILC-X3	5' TCCTAACAAACCCCTTATTTTCGTATCCA 3'
		LbB3	5' AACCAGCGTGGACCGCTTGGTG 3'
35S:STY1	Mutante	35S:end	5' ACAATCCCACTATCCTTCGCAAG 3'
		EST3	5' TTCACGGTGGCGTTTAGGAACG 3'
35S:HEC3	Mutante	35S:end	5' ACAATCCCACTATCCTTCGCAAG 3'
		oPBf4	5' CTAGATTAATTCTCCTACTCCTCT 3'

Los programas utilizados para llevar a cabo las amplificaciones se encuentran en la Tabla 7. Todas las reacciones fueron realizadas en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies).

Tabla 7. Programas de PCR utilizados para el genotipado de cada uno de los genes estudiados.

MUTANTE	PROGRAMA DE PCR	CEBADORES	BANDA WT	BANDA MUTANTE
<i>sty1</i>	94 °C 2min 94 °C 15s 60 °C 45s 72 °C 1min 72 °C 5min 15 °C ∞ 30x	SRSM EST3 Dspml	SRSM/EST3 830 pb	SRSM/Dspml 750 pb
<i>sty2</i>	94 °C 2min 94 °C 15s 58 °C 15s 72 °C 2min 72 °C 5min 15 °C ∞ 40x	BcDNA1 BcDNA2 SRS2:E Dspml	BcDNA1/BcDNA2 1700 pb	SRS2:E/Dspml 1200 pb
<i>hec1</i>	94 °C 3min TD (60-65 °C) 10X 94 °C 20s 56 °C 30s 72 °C 2min 72 °C 5min 15 °C ∞ 40x	oKG156 oKG157 oKG156 GabiT	oKG156/oKG157 600 pb	oKG156/GabiT 750 pb
<i>hec2</i>	95 °C 2min 94 °C 30s 55 °C 30s 72 °C 1min 72 °C 5min 15 °C ∞ 30x	HEC2 R HEC2 F (silv) HEC2 F (mut)	HEC2 R/HEC2 F (silv) 900 pb	HEC2 R/HEC2 F (mut) 600 pb
<i>hec3</i>	94 °C 3min 94 °C 20s 55 °C 30s 72 °C 1min 72 °C 5min 15 °C ∞ 35x	ILC-X3 ILC-8 LBb3	ILC-X3/ILC-X8 850 pb	ILC-X3/LBb3 550 pb
<i>35S:STY1</i>	94 °C 2min 94 °C 15s 55 °C 30s 72 °C 1.5min 72 °C 5min 15 °C ∞ 30x	35S:end EST3	35S:end/EST3 No banda	ILC-X3/EST3 850 pb
<i>35S:HEC3</i>	94 °C 3min 94 °C 30s 51 °C 30s 72 °C 1min 72 °C 5min 4 °C ∞ 35x	35S:end oPBf4	35S:end/oPBf4 No banda	35S:end/oPBf4 860 pb

La amplificación obtenida en la PCR fue analizada mediante la separación electroforética horizontal de las moléculas de DNA en gel de agarosa 1% (p/v).

3.3.2.2. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Con el objetivo de analizar la expresión de los genes *NGATHA* (*NGA*) en el mutante *sty1sty2hec1hec3*, se llevó a cabo un experimento de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Para ello, se utilizaron cebadores específicos para estos genes (Tabla 8).

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para analizar la expresión de los genes *NGATHA* mediante RT-qPCR

GEN	NOMBRE	SECUENCIA
<i>NGA1</i>	oMNG48	CAGCTTTCCTTCGACCAATTACA
	oMNG49	TGACGTTGCTGCTGATGATTATAAA
<i>NGA2</i>	oMNG46	GGAGAGCACAAGTCGCTTCAA
	oMNG47	GCCTTAACCGCTTCTCTCCTC
<i>NGA3</i>	oMNG42	TGGAATGTGGCAATGACTATAATCA
	oMNG43	GTGGCACCAACCATGACTCTT
<i>NGA4</i>	oMNG44	TCGTCTCCGGTTGTGATCAG
	oMNG45	TGGCGACCTCCAAAATGATT
<i>UBQ</i>	UBC21F	TGCGACTCAGGGAATCTTCTA
	UBC21R	CATCATCCTTTCTTAGGCATAGC

Las mezclas de reacción se realizaron en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems™) y consistieron en 2 µL de cDNA, 2 µL de *SYBR® GREEN PCR Master Mix* (Applied Biosystems™) y 0,4 µL de cada uno de los oligonucleótidos (5 µM), con un volumen final de 10 µL. La RT-qPCR se realizó en un termociclador *Quant Studio 3* acoplado a un programa informático específico (Applied Biosystems). La amplificación se llevó a cabo, siguiendo el programa recomendado por el fabricante, mediante una atemperación de 20 s a 50 °C, una desnaturalización de 15 min a 95 °C y 40 ciclos de desnaturalización 15 segundos a 95 °C, hibridación 20 segundos a 60 °C y extensión 30 segundos a 72 °C. Para cada cDNA se realizaron 3 réplicas técnicas.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems™), en el cual se compara la diferencia de expresión entre un gen de interés y un gen de referencia, siendo Ct el ciclo umbral donde se detecta la amplificación del gen por encima del nivel basal de fluorescencia:

$$\Delta Ct (\text{muestra}) = Ct(\text{gen de interés}) - Ct(\text{gen de referencia})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{muestra}) - \Delta Ct(\text{muestra referencia})$$

Este método asume que las eficiencias de amplificación de ambos genes son iguales. En este caso, el gen de referencia utilizado fue el de *UBIQUITINA* (*UBQ*).

3.3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis horizontal de agarosa 1-1,2 % (p/v) en tampón TBE 1x (89 mM de Tris; 89 mM de ácido bórico; 2 mM de EDTA). Además, los geles contenían 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, característica que permitiría la posterior visualización del DNA con luz ultravioleta.

3.3.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los productos de PCR fueron separados mediante geles de agarosa. El fragmento de interés fue cortado del gel y purificado mediante el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

3.3.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Para comprobar la correcta transformación de las colonias de *E. coli* se realizó una digestión del DNA plasmídico mediante enzimas de restricción. Cada enzima fue utilizada a la temperatura ideal para que su actividad sea máxima y el tampón adecuado, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La reacción se incubó durante 2 horas y, posteriormente, se analizó en una electroforesis horizontal en gel de agarosa 1% (p/v).

3.3.6. Técnicas de clonación

3.3.6.1. Vectores plasmídicos utilizados

Tabla 9. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo

VECTOR	CARACTERÍSTICAS	USO
PCR8/GW/TOPO	Contiene sitios attP1 y attP2 flanqueando el gen <i>ccdB</i> y resistencia a kanamicina	Vector donante en clonación Gateway
pDONOR207	Contiene sitios attP1 y attP2 flanqueando el gen <i>ccdB</i> y resistencia a gentamicina	Vector donante en clonación Gateway
mpYFC43	Contiene el fragmento C-terminal de la YFP en el extremo 5' de sitios de clonación attR1 y attR2 y resistencia a kanamicina	Vector de expresión en clonación Gateway para BiFC
mpYFN43	Contiene el fragmento N-terminal de la YFP en el extremo 5' de sitios de clonación attR1 y attR2 y resistencia a kanamicina	Vector de expresión en clonación Gateway para BiFC
pEarleyGate104	Contiene la etiqueta YFP en el extremo 5' de sitios de clonación attR1 y attR2 y resistencia a kanamicina	Vector de expresión en clonación Gateway para Co-IP
pEarleyGate201	Contiene la etiqueta HA en el extremo 5' de sitios de clonación attR1 y attR2 y resistencia a kanamicina	Vector de expresión en clonación Gateway para Co-IP

VECTOR	CARACTERÍSTICAS	USO
pEarleyGate202	Contiene la etiqueta FLAG en el extremo 5' de sitios de clonación attR1 y attR2 y resistencia a kanamicina	Vector de expresión en clonación Gateway para Co-IP
pEarleyGate203	Contiene la etiqueta Myc en el extremo 5' de sitios de clonación attR1 y attR2 y resistencia a kanamicina	Vector de expresión en clonación Gateway para Co-IP

3.3.6.2. Clonaje Gateway

El sistema de clonación utilizado para llevar a cabo todas las construcciones utilizadas en este trabajo es la tecnología Gateway. Ésta esta basada en la utilización de versiones modificadas de las recombinasas del bacteriófago lambda. Consiste en dos reacciones, BP (recombinación entre sitios attB y attP) y LR (recombinación entre sitios attL y attR), con las que se puede producir múltiples vectores de expresión a partir de un solo vector dador del gen a estudio. Los clones transformados son seleccionados de manera positiva mediante la resistencia a antibióticos y el uso del gen *ccdB*.

Para realizar la clonación del gen *STY2* en el vector PCR8/GW/TOPO (vector de entrada), primero se realizó una amplificación de este gen a partir de cDNA de inflorescencias de plantas *wild-type* ecotipo Columbia-0. La mezcla de la reacción fue 10 µl de tampón 5x HF Phusion Buffer (Promega), 1 µl de 10 mM dNTPs (Promega), 1,5 µl de 3% DMSO (Promega), 0,5 µl de 20 µM de cada oligonucleótido (Tabla 10), 0,5 µl de DNA polimerasa Phusion (Promega), 5 µl de cDNA y H₂O Mili-Q hasta 50 µl.

Tabla 10. Oligonucleótidos y programa de PCR utilizados para la amplificación del gen *STY2*

GEN	NOMBRE	SECUENCIA
<i>STY2</i>	oDB_STY2_fwd	5' ATGGCTGGGATATTCTCATTAGGAGG 3'
	oDB_STY2_revSTOP2	5' TCAAGATCTTGGTGGATTTTGATAG 3'
PROGRAMA DE PCR		
98 °C 30s		
TD (40-45 °C) 12X		
98 °C 10s		
53 °C 30s		
72 °C 30s		
72 °C 5min		
4 °C ∞		

Posteriormente se analizó el producto de PCR en una electroforesis horizontal en gel de agarosa 0.8% (p/v) y se purificó el fragmento de DNA de interés (969 pb) con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Posteriormente, se adicionó la cola poly A al producto amplificado. Para ello se utilizó una dilución 2/3 del producto de PCR (20 µl producto PCR + 10 µl H₂O), 9,6 µl tampón 5x GoTaq de Promega, 2,9 µl

50 mM MgCl₂ de Promega, 3,2 µl dATPs 3mM de Thermo Fischer y 0,3 µl DNA polimerasa GoTaq de Promega, completando con H₂O Mili-Q hasta 48,16 µl, en una reacción que se incubó a 72 °C durante 20 minutos.

Seguidamente, se realizó una purificación de la reacción mediante el kit mi-PCR purification kit de Metabion. Posteriormente, se realizó la ligación del producto resultante con el vector PCR8/GW/TOPO mediante el kit de clonación pCR™8/GW/TOPO™ TA de Invitrogen (3 µl purificado PCR, 1 µl dilute salt (1/4), 1 µl H₂O y 1 µl vector PCR8/GW/TOPO; 30 minutos a temperatura ambiente) y se electroporó en células Supercharge EZ10 de *E. Coli* (200 Ω; 25 µF; 1.8 kV).

Las colonias transformadas fueron seleccionadas mediante placas Petri con medio LB sólido con espectinomicina (100 µg/ml) y comprobadas mediante cultivo líquido de las mismas, extracción de DNA plasmídico y digestión con el enzima de restricción *EcoRI*. Además, la construcción se comprobó mediante secuenciación.

Una vez obtenido el vector de entrada, se llevó a cabo la reacción LR con 1 µl vector PCR8/GW/TOPO-STY2, 1 µl vector de expresión (Tabla 9), 1 µl LR clonasa y 3 µl de tampón TE, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se paró la reacción con 1 µL de 2 µg/µL Proteinasa K durante 10 minutos a 37 °C y se electroporó en células Supercharge EZ10 de *E. Coli*. Las células fueron cultivadas en medio LB sólido con kanamicina y se comprobaron las transformadas mediante extracción de DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción. Las construcciones correctas fueron utilizadas para transformar *A. tumefaciens* por electroporación (400 Ω; 25 µF; 1.8 kV). Este procedimiento fue realizado una vez por cada vector de expresión utilizado en este trabajo.

Con el gen *STY1* se llevaron a cabo reacciones LR con las mismas condiciones para cada vector de expresión.

3.3.7. Hibridación *in situ*

El protocolo en el que se ha basado la hibridación *in situ* realizada en este trabajo se encuentra descrito por Ferrándiz y Sessions (2008).

- Fijación e imbibición de las muestras

Las muestras fueron recogidas en viales de cristal de 20 ml con fijador FAE (50% EtOH, 3.7% formaldehído, 5% ácido acético glacial) fresco, se realizó vacío durante 15 minutos y se incubó durante 2 horas. Pasado este tiempo, las muestras se incubaron

con etanol 70% durante 30 minutos y fueron procesadas en un procesador automático de tejidos TP1020 (Leica).

Tabla 11. Programa utilizado para procesar los tejidos utilizados en la hibridación *in situ*

Jarra	Solución	Tiempo
1	-	-
2	EtOH 70%	1 hora
3	EtOH 90%	1 hora
4	EtOH 90%	1 hora
5	EtOH 95% + eosina	1 hora
6	EtOH 95%	1 hora
7	EtOH 100%	1 hora
8	Histoclear	1 hora
9	Histoclear	1 hora
10	Histoclear	1 hora 15 minutos
11	Parafina	1 hora en vacío
12	Parafina	3 hora en vacío

- Modelado de bloques y obtención de los cortes

Los bloques fueron montados en una estación de inclusión EG1150H (Leica). Para ello, las muestras fueron colocadas de manera horizontal en moldes metálicos con parafina fundida en su interior. Se deslizó el molde hacia una zona más fría de la placa se colocó la base de plástico, convenientemente rotulada en lápiz, y se dejó enfriar.

Para realizar los cortes se utilizó un microtomo RM2025 (Leica). Se cortaron secciones de tejido de 7 μm . Con ayuda de una lupa binocular SMZ800 (Nikon) y un microscopio óptico Eclipse E-600 (Nikon) se determinó la zona de interés. Las tiras fueron estiradas en agua a 42-45 °C para eliminar las arrugas del tejido y se montaron en portaobjetos, que se dejaron secar en vertical hasta no quedar agua retenida. El tejido se fijó al portaobjetos mediante incubación en placa caliente a 45 °C.

- Preparación de la sonda

Para realizar la sonda del gen *NGA1*, primero se realizó una PCR para amplificar el gen a partir de cDNA de inflorescencias de plantas *wild-type* ecotipo Columbia-0. La mezcla de la reacción fue 10 μl de tampón 5x HF Phusion Buffer (Promega), 1 μl de 10 mM dNTPs (Promega), 1,5 μl de 3% DMSO (Promega), 0,5 μl de 20 μM de cada oligonucleótido (Tabla 12), 0,5 μl de DNA polimerasa Phusion (Promega), 5 μl de cDNA

y H₂O Mili-Q hasta 50 µl. Posteriormente, se comprobó la correcta amplificación con una electroforesis horizontal de 1% agarosa (p/v). El producto de PCR fue purificado mediante el kit mi-PCR purification kit de Metabion. Se realizó una cuantificación del DNA con el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 y se realizó la dilución pertinente a volumen final de 13 µl con H₂O Mili-Q para tener 150 ng de DNA, el cual sería utilizado como molde para la reacción de transcripción.

Tabla 12. Oligonucleótidos y programa de PCR utilizados para preparar la sonda del gen *NGA1*.

GEN	NOMBRE	SECUENCIA
<i>NGA1</i>	oDB_NGA1fwdis	5' GCCCTTAGCAGAAGAAGAAGG 3'
	oDB_STY2_rev7	5'CTTAATACGACTCACTATAGGGGTGATGATGACGTTGCTGCT G 3'
PROGRAMA DE PCR		
		98 °C 30s
		98 °C 10s
		62 °C 30s
		72 °C 30s
		72 °C 5min
		4 °C ∞

Posteriormente, se realizó la reacción de transcripción añadiendo a un tubo eppendorf 13 µl de DNA molde, 2 µl de Transcription reaction buffer (10x), 2 µl de DIG-labelling mix (10x, Roche), 1 µl de RNasin (inhibidor de RNasa) y 2 µl de ARN polimerasa T7 (Roche). La reacción se incubó a 37 °C durante 90 minutos en un termobloque. Finalizado este periodo, se adicionó 1 µl de DNasal libre RNasa (Amersham) y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. La reacción de transcripción y la completa degradación del DNA se comprobó en una electroforesis en gel de agarosa 1.2%.

La precipitación de la sonda se llevó a cabo con 1 µl de tRNA de levadura, 25 µl de NH₄OAc 7.5 M, 220 µl de EtOH 96% frío y 36.5 µl H₂O Mili-Q estéril, incubándose a -80 °C durante 1 hora. Seguidamente, se centrifugó 15 minutos a 13200 rpm a 4 °C de temperatura. Transcurrido este tiempo, se descartó el sobrenadante y se adicionó 500 µl de EtOH 80% frío y se centrifugó a 13200 rpm durante 5 minutos, para, posteriormente, descartar el sobrenadante y dejar reposar 5 minutos para eliminar el exceso de etanol. Por último, la sonda se resuspendió con 10 µl de H₂O Mili-Q y se guardó a -80 °C hasta el momento de su cuantificación.

- Cuantificación de la sonda

Para la cuantificación de la sonda se utilizó 1 µl de la sonda y se prepararon diluciones seriadas (1/20, 1/250, 1/1000, 1/2500). A los 9 µl de sonda restantes se les adicionó 91 µl de tampón de hibridación y se almacenó a -20 °C. Posteriormente, se aplicó 1 µl de cada dilución a una membrana de nylon, en un proceso conocido como Dot Blot, y, después de secarse, se realizó un “cross-link” con luz UV para fijar la sonda a la membrana.

El revelado de la membrana se realizó en un tubo falcon de 15 ml. Primero se mojó la membrana en tampón TBS 1X durante 2 minutos. Seguidamente, se incubó en “blocking/TBS” durante 10 minutos y con el anticuerpo Anti-DIG-Ab (1/3000) en TBS 1X durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó con tampón de detección sin sustrato durante 1 minutos y se reveló con tampón de detección con sustrato (150 µl de NBT (100 mg/ml) y 150 µl de BCIP (50 mg/ml) por cada 100 ml de tampón; Roche Diagnostics) durante 12 minutos. La concentración de sonda a utilizar en el experimento será aquella que se aproxime al penúltimo punto de la tira control, teniendo en cuenta que la sonda de la que partíamos ya ha sido diluida 1/10 antes de preparar la solución final.

- Prehibridación

En primer lugar, se desparafinan los cortes mediante dos incubaciones de las muestras con HistoClear 100% de 10 minutos cada uno. Seguidamente, se hidrata el tejido en series de EtOH de 2 minutos cada una (2x 100%, 96%, 70%, 50%, 30%, 20%) y dos lavados con H₂O Mili-Q.

Posteriormente, se realiza la hidrólisis ácida del tejido tratando las muestras con 0.2 M HCl durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lava el tejido con H₂O Mili-Q y dos veces con buffer SSC (5 minutos cada uno) y se incuba con proteinasa K (1µg/ml) en el tampón de la proteinasa K 1X durante 15 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se lavó con PBS 1X durante 2 minutos y se bloqueó la proteinasa K con 2 mg/ml de glicina (limpia, de alta pureza) en PBS 1X durante 2 minutos. Se realizaron dos lavados de 2 minutos cada uno con PBS 1X y se refijó el tejido con 4% formaldehído en PBS 1X (30 ml de 37% formaldehído en 270 ml de PBS 1X) durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X y se deshidrató el tejido con series de EtOH (2x H₂O Mili-Q, 30%, 50%, 70%, 96% y 2x100%) de 2 minutos cada una. Finalmente, se escurrieron los portaobjetos y se secaron en campana durante 1 hora.

- Hibridación y lavados

La sonda fue diluida a la concentración adecuada con tampón de hibridación y se desnaturalizó a 80 °C durante 2 minutos. Los portaobjetos se calentaron a 45 °C en una placa caliente y se aplicó 150 µl de sonda en cada uno de ellos, cerrándose con un cubreobjetos. Los portaobjetos se incubaron durante toda la noche en una caja húmeda sellada con film en un horno a la temperatura de incubación (50-56 °C). Al día siguiente se separaron los cubreobjetos en solución de lavado (2X SSC, 50% formamida) y se realizaron dos lavados de 90 minutos a la temperatura de hibridación.

- Inmunodetección

Las muestras se lavaron en TBS 1X durante 5 minutos y se pasaron a jarras Coplin, donde se incubaron en *blocking agent* (0.5% Roche blocking en TBS) durante 1 hora. Se realizó un lavado de las muestras en 1% BSA/0.3% (v/v) Tritón X-100/TBS durante 30 minutos y se incubó con el anticuerpo Anti-DIG-Ab (dilución 1:3000) (AP conjugated anti-DIG, Fab fragment (Roche)) en 1% BSA/0.3% (v/v) Tritón X-100/TBS durante 2 horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 20 minutos cada uno con 1% BSA/0.3% (v/v) Tritón X-100/TBS y un lavado con tampón de detección sin sustrato (Solución A:Solución B (1:1)) durante 5 minutos. Posteriormente, se incubaron las muestras con tampón de detección con sustrato (150 µl de NBT (100 mg/ml) y 150 µl de BCIP (50 mg/ml) por cada 100 ml de tampón; Roche Diagnostics). Las muestras se incubaron en oscuridad desde una noche a varios días, según sea la intensidad de la señal.

- Observación de los resultados

Una vez las muestras tenían la intensidad de señal deseada, la reacción se paró mediante la adición de agua. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos y se observaron las muestras en un microscopio Nikon Eclipse E-600.

- Soluciones utilizadas

3.7% FAE (preparar fresco)	
50% EtOH	50 ml
5% Ácido Acético	5 ml
3.7% Formaldehido	10 ml
H ₂ O dd	35 ml
	100 ml

Tampón de hibridación	
SSC 6X	3 ml
3% SDS	1.5 ml
50% Formamida	5 ml
100 µg/ml tRNA	0.1 ml
H ₂ O dd	0.4 ml
	10 ml

SSC 20X	
NaCl	175.3 g
Na citrato	88.2 g
H ₂ O dd	800 ml

Ajustar a 1L

Tampón proteinasa K 5X (autoclavado)	
Tris 0.5 M	60.55 g
EDTA 0.25 M	93.06 g

Ajustar a pH 8 y llevar a 1L

TBS 10X (autoclavado)	
Tris (pH 7.5) 1 M	121.1 g
NaCl 4 M	233.6 g

Ajustar a 1L

PBS 20X (autoclavado)	
NaCl	160 g
KCl	4 g
Na ₂ HPO ₄	28.8 g
KH ₂ PO ₄	4.8 g
H ₂ O dd	700 ml

Ajustar a pH 7.4 y llevar a 1L

Tampón de detección 10X (autoclavado)			
Tampón de detección A 10X		Tampón de detección B 10X	
Tris (pH 9.5) 1 M	121.1 g	MgCl ₂	101.6 g MgCl ₂ ·6H ₂ O
NaCl 1 M	58.4 g	Ajustar a 1L	

Ajustar a 1L

3.3.8. Secuenciación de DNA y secuencias obtenidas

Las construcciones utilizadas en este trabajo fueron secuenciadas en el servicio de secuenciación de DNA y análisis de la expresión génica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC) mediante secuenciación Sanger mediante el secuenciador capilar ABI 3130XL. Las secuencias proporcionadas fueron analizadas mediante el software de análisis de secuencias Benchling (<https://benchling.com>).

3.3.9. Transformación de células competentes de *E. coli* y *A. tumefaciens* por electroporación

Las construcciones obtenidas con la tecnología Gateway fueron utilizadas para transformar células competentes de *E. coli*, con el objetivo de amplificarlas y comprobarlas. Asimismo, con el objetivo de transformar genéticamente plantas, se transformaron células competentes de la cepa C58 pMP90 de *A. tumefaciens*.

Primeramente, se descongeló una alícuota de células competentes de la cepa Supercharge EZ10, se añadió 1 µl de la construcción y se homogenizó. La mezcla se

introdujo en una cubeta de 0.1 cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo, y se sometió a un pulso de corriente eléctrica, mediante el electroporador ECM399 (BTX). En la Tabla 13 se describen las condiciones utilizadas.

Tabla 13. Condiciones utilizadas en la transformación de células de *E. coli* y *A. tumefaciens* mediante electroporación.

CÉLULAS	Ω	μF	kV
Supercharge EZ10 (<i>E. coli</i>)	200	25	1.8
C58 pMP90 (<i>A. tumefaciens</i>)	400	25	1.8

Una vez realizado el pulso, se añadió a la cubeta 1 ml de medio LB líquido y se recuperaron las células transformadas, las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora en caso de *E. coli* o a 28 °C durante 3 horas en caso de *A. tumefaciens*. Posteriormente, se plaquearon 50 μl y el resto en placas de LB sólido con el antibiótico correspondiente y se incuban durante toda la noche a 37 °C en caso de *E. coli* o a 28 °C durante 2 días en el caso de *A. tumefaciens*.

3.4. Metodología de plantas

3.4.1. Complementación bimolecular de la fluorescencia (BIFC)

Con el fin de comprobar las posibles interacciones entre las proteínas estudiadas, se realizó el ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) con expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Para ello, se utilizaron las cepas de *A. tumefaciens* que tenían los genes *STY*, *HEC*, *SPT* y *CRC* clonados a las mitades N-terminal y C-terminal de la proteína YFP.

Cuatro días antes de la infiltración, las cepas de *A. tumefaciens* fueron refrescadas mediante triple estría en placas Petri con medio LB suplementado con kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) y rifampicina (100 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron a 28 °C durante 3 días.

Un día antes de la infiltración, una colonia de *A. tumefaciens* crecida en la placa fue inoculada en 50 ml de medio LB líquido con kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) y rifampicina (100 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó en agitación a 28 °C durante 24 horas.

A la mañana siguiente, estos cultivos se transvasaron a tubos falcon de 50 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos con 10 ml de solución de infiltración (1M MgCl_2 , 0.1 M

MES pH 5.6, 100 mM acetosiringona y H₂O Mili-Q) y se dejaron recuperar horizontalmente durante 1.5 horas en oscuridad y agitación suave (28 rpm). Posteriormente, se realizó una dilución 1:20 de los cultivos con solución de infiltración y se midió la OD₆₀₀. Los cultivos fueron diluidos a una OD de 0.4 en un volumen final de 20 ml con solución de infiltración. Posteriormente, éstos fueron incubados de manera horizontal en oscuridad y agitación suave (28 rpm) durante 1.5 horas.

Por último, se prepararon las mezclas de cultivos correspondientes (5 ml cultivo A; 5 ml cultivo B; 1 ml p19) y se procedió a infiltrar el envés de hojas jóvenes y sanas de *N. benthamiana* con la ayuda de jeringuillas de 5 ml, realizando 3 réplicas biológicas. Pasados tres días, se tomaron secciones de las hojas infiltradas y se analizaron mediante el microscopio confocal AxioObserver 780 (Zeiss).

3.4.2. Esterilizado de semillas

El esterilizado de semillas de *A. thaliana* se realizó con el objetivo de eliminar los posibles microorganismos contaminantes que contienen éstas, para asegurar su correcta germinación y crecimiento en una placa de medio MSS con ácido giberélico (GA3).

Las semillas fueron esterilizadas por el método de los alcoholes. Para llevarlo a cabo, primero pesamos de 30 a 50 mg de semillas y las colocamos en un tubo eppendorf. Seguidamente, aplicamos 900 µl de solución de esterilizado (EtOH 70%, 0.005% Tritón X-100) y se incubó durante 3 minutos con agitación continua. Pasado este tiempo, la solución de esterilizado fue eliminada y se aplicó 900 µl de EtOH 96%, incubándose 1 minuto con agitación continua. Posteriormente, las semillas se depositaron en un papel estéril, doblado previamente generando una concavidad en el centro, y se dejó secar el alcohol. Una vez secas, con la ayuda de pinzas y una punta estéril, las semillas se repartieron de manera uniforme por una placa Petri de 15 cm de tamaño con medio MSS con giberelinas. Todo el procedimiento fue llevado a cabo en cabina de flujo y bajo condiciones de esterilidad.

Las placas Petri fueron selladas con Micropore™ y se incubaron en oscuridad y 4 °C de temperatura durante 3 días. Por último, pasados estos días, fueron llevadas a la cámara de cultivo in vitro de plantas, la cual posee una temperatura de 25 °C (ver apartado 3.2.5. Condiciones de cultivo *in vitro*).

3.4.3. Selección de semillas transgénicas

Para seleccionar transformantes primarios (T1) con la construcción 35S:*HEC3*, las semillas fueron esterilizadas y sembradas en placas Petri con medio MSS suplementado con higromicina (40 mg/L). Pasadas dos semanas desde su siembra, los transformantes se seleccionaron por la coloración verde de sus hojas y la mayor elongación de su raíz y se traspasaron a alveolos de plástico para ser cultivados en el invernadero.

3.5. Detección de la actividad β -glucuronidasa (GUS)

3.5.1. Tinción GUS rápido

Con el objetivo de conocer las plantas que presentaban actividad β -glucuronidasa en los genes de interés para realizar el posterior cruce, se recogieron muestras de flores de cada planta a estudiar en placas de 96 pocillos (Thermo Scientific) y se aplicó la solución de coloración (100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Na₂HPO₄, Tritón 10%, 100 mM Ferro, 100 mM Ferri, 0.5 M EDTA, 100 mM X-Gluc y H₂O Mili-Q) hasta cubrir la muestra. Se incubó durante toda la noche a 37 °C durante toda la noche.

A la mañana siguiente se aclaró el tejido con series de EtOH (20%, 35%, 50% y 70%, durante 30 minutos cada paso) para eliminar la clorofila y se observó la señal en una lupa binocular SZ60 (Olympus).

3.5.2. Tinción GUS lento

La tinción de GUS lento fue realizada con el objetivo de comprobar el patrón de expresión de los genes *STY* y *HEC* en los diferentes cruces realizados.

Para realizarla, primeramente, se recogieron inflorescencias de las plantas a estudiar y se prefijaron con acetona fría al 90% a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las muestras fueron lavadas con tampón de lavado (100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Na₂HPO₄, Tritón 10%, 100 mM Ferro, 100 mM Ferri y H₂O Mili-Q) durante 5 minutos en hielo y, seguidamente, se añadió la solución de tinción (100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Na₂HPO₄, Tritón 10%, 100 mM Ferro, 100 mM Ferri, 100 mM X-Gluc y H₂O Mili-Q), proporcionando vacío durante 20 minutos. Las muestras se incubaron a 37 °C en oscuridad durante toda la noche.

A la mañana siguiente, se realizaron series de EtOH (20%, 30% y 50%) a temperatura ambiente durante 30 minutos cada uno para decolorar el tejido. Se realizó una fijación con FAE (50% EtOH, 3.7% formaldehído, 5% ácido acético glacial y H₂O

Mili-Q) durante 1 hora y se cambió por EtOH 70%, el cual se puede almacenar a 4 °C desde 1 día o hasta el momento de su visualización.

En el día elegido para la visualización de las muestras, se continuó con el aclaramiento del tejido mediante series de EtOH (70%, 80%, 90% y 2x 100%), siendo de 30 minutos cada paso. Posteriormente, los tejidos fueron aclarados con hidrato de cloral (72 g hidrato de cloral, 11 ml glicerol 100% y hasta 100 ml con H₂O destilada) a temperatura ambiente durante toda la noche. A la mañana siguiente, las inflorescencias completas fueron observadas en un macroscopio DMS 1000 con iluminación diascópica (Leica).

La visualización de las flores por separado se realizó, mediante el montaje de las muestras con un portaobjetos y un cubreobjetos, en un microscopio Nikon Eclipse E-600 acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1) y un ordenador con el software NIS-Elements F3.0.

3.6. Análisis fenotípico de mutantes y líneas transgénicas

3.6.1. Fotografía a bajo aumento

Las fotografías a bajo aumento, como son las de roseta o de planta entera, se tomaron mediante una cámara digital Leica. Además, se utilizó una lupa binocular MacroFluo MZ16F (Leica) para realizar las fotos de inflorescencias y flores, tanto de los parentales como de los cruces y el macroscopio DMS 1000 con iluminación diascópica acoplado a un ordenador con el software LAS X (Leica), para conseguir las fotos de los frutos y de las inflorescencias de la tinción de GUS.

3.6.2. Técnicas de microscopía

3.6.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para llevar a cabo el análisis de flores por microscopía electrónica de barrido (SEM), primero se realizó la recogida y fijación de las muestras en FAE (50% EtOH, 3.7% formaldehído, 5% ácido acético glacial y H₂O Mili-Q), realizando vacío en tres pulsos de 10 minutos cada uno, y, después de cambiar la solución por una fresca, se dejó durante toda la noche. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas y se mantuvieron en etanol 70% a 4°C hasta el día de su análisis.

El día antes de la observación, las muestras fueron incubadas con etanol 80% durante 30 minutos, etanol 90% durante 30 minutos y tres veces con etanol 100%, siendo la última justo antes de ir al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universitat

Politécnica de València. Allí se realizó el punto crítico de las muestras, es decir, el cambio de etanol 100% a CO₂ con la preservación estructural del tejido. Esto fue llevado a cabo en un secador de punto crítico CPD300 (Leica). Al finalizar el proceso, las muestras fueron pegadas en una cinta adhesiva de carbón activo y convenientemente diseccionadas. Éstas fueron sombreadas con partículas de oro (espesor de 4,7 Å/s) en un recubridor SCD 005 (Bal-Tec), mediante dos pulsos de 45 segundos en dos inclinaciones diferentes.

El día siguiente, las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) modelo ULTRA 55 (Zeiss).

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de la interacción entre *SHI/STY* y *HEC*

Con el objetivo de identificar la naturaleza de la interacción entre *SHI/STY* y *HEC*, se estudiaron tres hipótesis posibles que podrían explicar las coincidencias fenotípicas observadas entre los mutantes correspondientes: (1) que *SHI/STY* regulen transcripcionalmente a *HEC*; (2) que *HEC* regule transcripcionalmente a *SHI/STY*; (3) que *HEC* y *SHI/STY* actúan de manera conjunta, quizás a través de la formación de complejos transcripcionales.

Para comprobar qué hipótesis era correcta, se realizaron cruces entre líneas de sobreexpresión de un gen y el doble mutante del otro grupo. Además, se analizó la expresión de los genes mediante el cruce de líneas reporteras de un gen con mutantes de sobreexpresión y pérdida de función del otro grupo. Durante el principio de este Trabajo Final de Máster se observaron problemas de germinación en las semillas utilizadas, que habían sido generadas previamente y almacenadas durante tiempos largos, por lo que en algunos casos tuvimos que utilizar líneas que presentaban fenotipos más débiles de los descritos en la bibliografía y que fueron las únicas disponibles.

Los cruces con las líneas de sobreexpresión se caracterizaron en la primera generación filial (F1), pero en el cruce con el doble mutante la observación fenotípica se realizó en la segunda generación filial (F2).

4.1.1. Hipótesis 1: *SHI/STY* regula la expresión de los genes *HEC*

La primera opción posible es que *SHI/STY* regule la expresión de los genes *HEC*. Si esto fuera así, la sobreexpresión de *STY1* debería alterar los patrones de expresión

de los genes *HEC*, y, si esta alteración fuera la causa de al menos parte de las alteraciones fenotípicas observadas en las líneas 35S:*STY1*, las mutaciones *hec* en este fondo deberían atenuar su fenotipo. Por otro lado, si la interacción de *HEC* y *SHI/STY* se limitara a que los genes *HEC* estuvieran aguas abajo de *SHI/STY*, la sobreexpresión de *HEC* debería producir los mismos efectos independientemente de la presencia o no de los genes *SHI/STY*. Siguiendo esta lógica, se realizaron los siguientes cruzamientos:

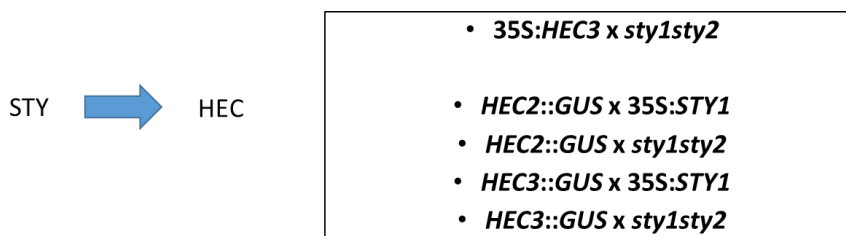


Figura 9. Cruces realizados para comprobar la hipótesis de que los genes *STY* regulan a los genes *HEC*.

La caracterización fenotípica del cruce 35S:*HEC3*x*sty1sty2* no se pudo llevar a cabo por problemas en la germinación de la primera generación filial (F1) debido al oídio. Actualmente, se han obtenido las semillas de la segunda generación filial (F2) de este cruce. Cabe esperar que, si esta hipótesis fuera cierta, este cruce tendría el fenotipo de sobreexpresión de *HEC3*.

La expresión de los genes *HEC2* y *HEC3* se comprobó mediante el cruce de líneas reporteras de *HEC2* y *HEC3* con los mutantes de sobreexpresión y de pérdida de función de los genes *SHI/STY*. Cabe esperar que, si *SHI/STY* es capaz de regular la expresión de los genes *HEC*, el patrón de expresión de *HEC* será diferente en los diferentes mutantes.

En la Figura 10 se puede observar los resultados de la tinción GUS en el fenotipo silvestre, en el mutante de sobreexpresión 35S:*STY1* y en los mutantes de pérdida de función *sty1sty2* y *sty1 sty2 shi lrp srs5*. Si el factor de transcripción *STY1* es capaz de regular la expresión de *HEC2*, en los mutantes se debería observar una desregulación de ésta. Sin embargo, no se observa diferencia de localización de la expresión de *HEC2* entre los diferentes mutantes respecto del fenotipo silvestre, ya que se observa señal en el tracto de transmisión, el estigma y los óvulos, patrón silvestre de la expresión de este gen similar al publicado por Gremski et al. (2007) y Ballester et al. (2021) (Figura 2).

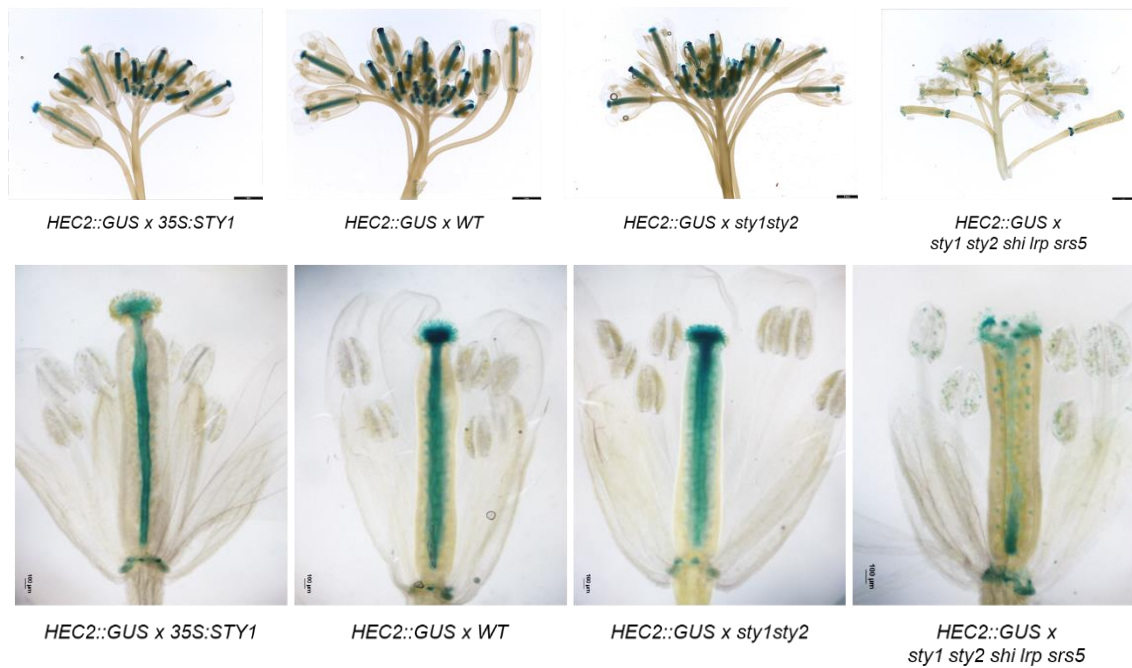


Figura 10. Patrón de expresión de *HEC2::GUS* en fondo silvestre, 35S:*STY1*, *sty1sty2* y *sty1 sty2 shi lrp srs5* en inflorescencia y flor en estadio de antesis. Escala: 1 mm en inflorescencias; 100 μ m en flores en antesis.

En el quintuple mutante *sty1 sty2 shi lrp srs5* se puede notar una disminución de la expresión de *HEC2* respecto de los otros fenotipos, posiblemente debido a los defectos severos que presenta este mutante en el estigma, tracto de transmisión y septum. Otra posible explicación sería que los genes *SHI/STY* contribuyan al mantenimiento de los niveles de expresión de los genes *HEC*.

La Figura 11 muestra el patrón de expresión de *HEC3* en los mutantes de sobreexpresión 35S:*STY1*, en el que se observa un fenotipo débil, y de pérdida de función *sty1sty2*. El patrón de expresión en los fondos 35S:*STY1* y *sty1sty2* no cambia respecto al observado en el fondo silvestre. La expresión sigue observándose en el estilo y los funículos de los óvulos, siendo el mismo patrón de expresión que los publicados por Gremski et al. (2007) y Ballester et al. (2021) (Figura 1).

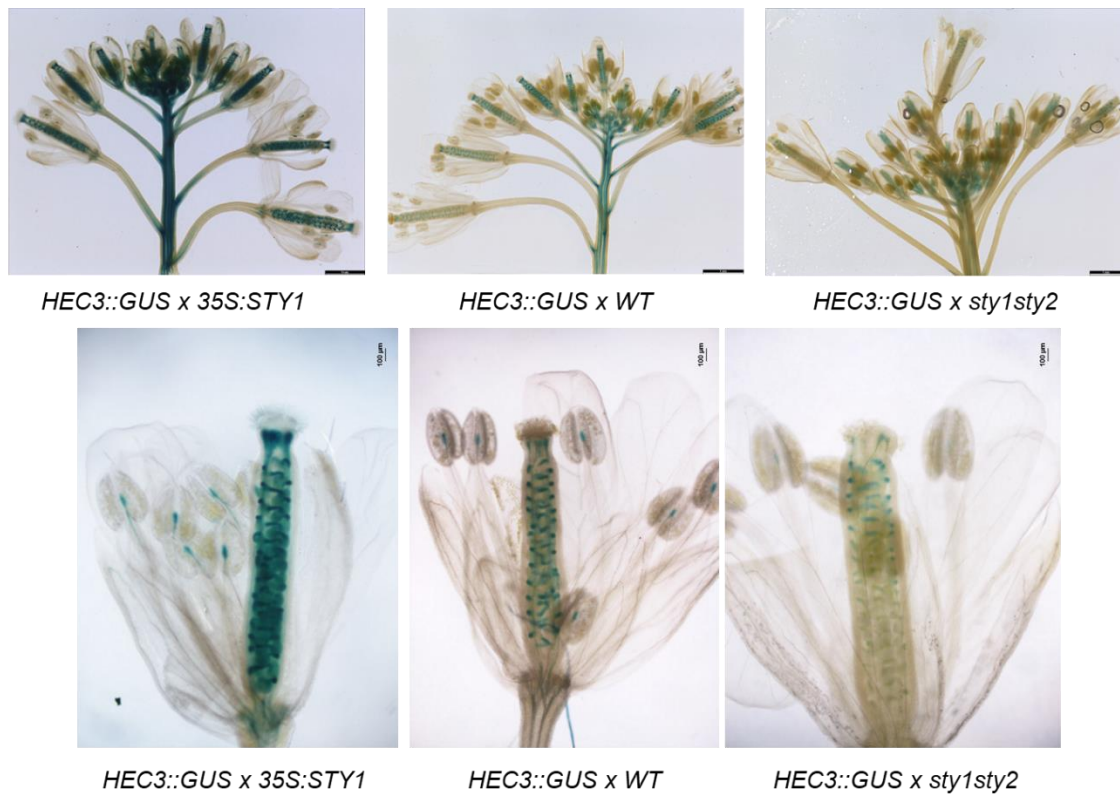


Figura 11. Patrón de expresión de *HEC3::GUS* en fondo silvestre, *35S:STY1* y *sty1sty2* en inflorescencia y flor en estadio de antesis. Escala: 1 mm en inflorescencias; 100 µm en flores en antesis.

A pesar de no observar un cambio en la localización de la expresión de *HEC3*, sí se puede denotar un cambio en su nivel en los tres fenotipos. Puede ser que *STY1* no cambie el patrón de expresión, pero sí el nivel de expresión de *HEC3*. Este hecho se debería comprobar con una PCR cuantitativa a tiempo real dirigida a observar el nivel de expresión de *HEC3* en los tres fenotipos.

El patrón de ambos genes *HEC* es similar tanto en los fondos de sobreexpresión y de pérdida de función de los genes *SHI/STY*, lo cual implica que los fenotipos de los mutantes de sobreexpresión y de pérdida de función de *SHI/STY* no son debidos a una expresión ectópica o a un déficit de expresión de *HEC*, respectivamente, aunque no podríamos descartar un efecto cuantitativo. De todos modos, debido al débil fenotipo de la línea de sobreexpresión de *STY1* utilizada en este experimento, para saber si los datos obtenidos son significativos, se debería realizar el mismo análisis con una línea de fenotipo más fuerte. Por lo tanto, la hipótesis de que *SHI/STY* regula a *HEC* puede ser cuestionada y no parece la más probable.

4.1.2. Hipótesis 2: *HEC* regula la expresión de los genes *SHI/STY*

La segunda hipótesis es que *HEC* regule la expresión de los genes *SHI/STY*. Para que esta premisa sea correcta, la sobreexpresión de *HEC3* debería alterar el patrón de expresión de los genes *STY* y, si este hecho fuera el causante de parte de las alteraciones fenotípicas observadas en las líneas 35S:*HEC3*, las mutaciones *sty* en este fondo deberían atenuar su fenotipo. Además, si *HEC* regula a *SHI/STY*, la sobreexpresión de los genes *SHI/STY* debería producir los mismos efectos sin depender de la presencia o ausencia de los genes *HEC*. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se realizaron los siguientes cruzamientos:

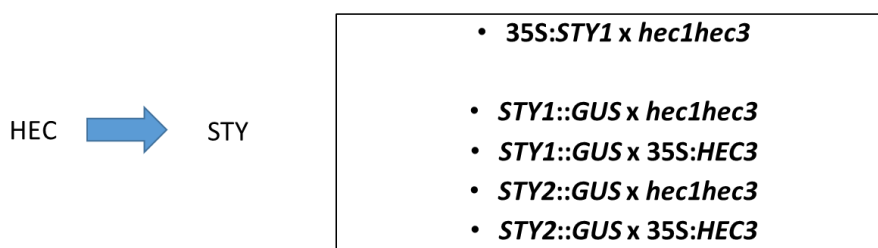


Figura 12. Cruces realizados para comprobar la hipótesis de que los genes *HEC* regulan a los genes *STY*.

La caracterización fenotípica del cruce 35S:*STY1*x*hec1hec3* no se pudo llevar a cabo por problemas en la germinación de las semillas de la primera generación filial (F1). El cruce se volvió a realizar y, actualmente, se encuentra hecho el cruce de la segunda generación filial (F2) en la planta F1. Cabe esperar que, si esta hipótesis fuera cierta, este cruce tendría el fenotipo de sobreexpresión de *STY1*.

El patrón de expresión del gen *STY1* se comprobó mediante el uso de líneas reporteras en los fondos genéticos de sobreexpresión constitutiva de *HEC3* y de pérdida de función de *HEC1* y *HEC3* (Figura 13). En ambos fondos se observa un patrón de expresión de *STY1* que no presenta ninguna diferencia significativa con el del fondo silvestre, ya que la expresión se detecta en todos los fondos en el estigma, el estilo, el ovario (funículos, tegumento externo, óvulos y septum) y las anteras, patrón similar al descrito por Kuusk et al. (2002) y Estornell et al. (2018). El nivel de expresión también parece similar en los tres fenotipos, aunque se aprecia que es mayor en el estigma y el estilo que en el resto del gineceo.

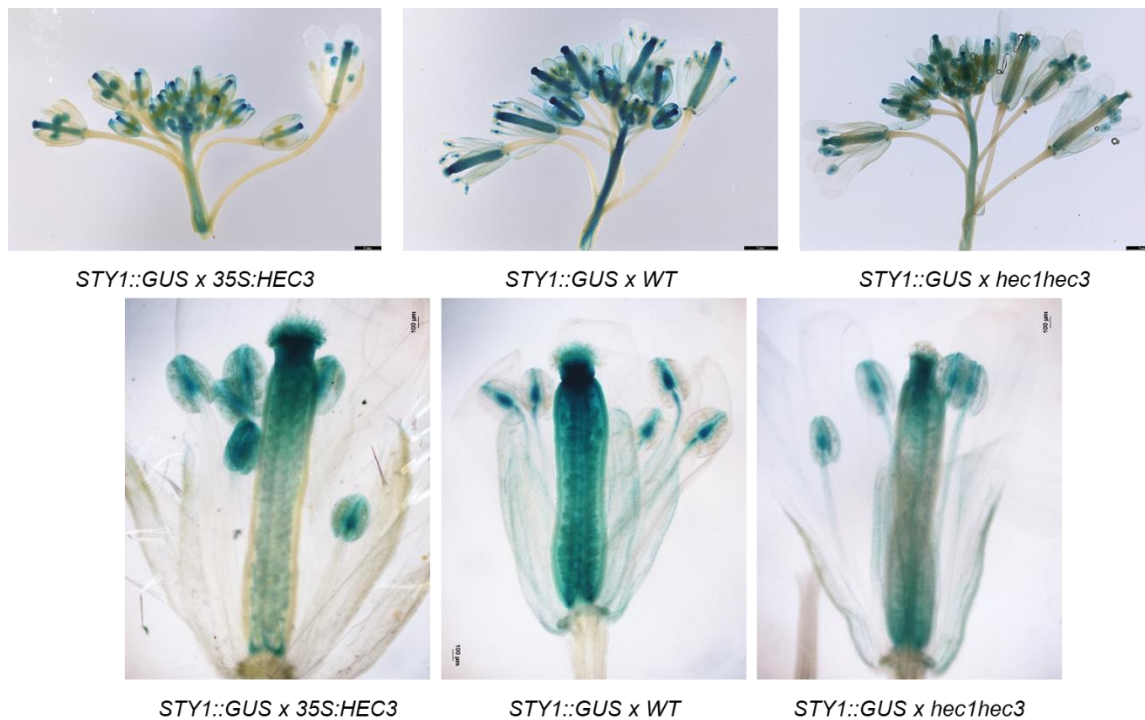


Figura 13. Patrón de expresión de *STY1::GUS* en fondo silvestre, *35S:HEC3* y *hec1hec3* en inflorescencia y flor en estadio de antesis. Escala: 1 mm en inflorescencias; 100 µm en flores en antesis.

El patrón de expresión de *STY2* en los fondos mutantes se puede observar en la Figura 14. En los estadios tempranos se puede notar una fuerte expresión en el estilo y en el estigma. En el estadio de antesis, al producirse la polinización, la expresión desaparece del estigma y se encuentra solo en el estilo y en la parte apical de las anteras, patrón similar al descrito por Kuusk et al. (2002) y Estornell et al. (2018). No se observan diferencias significativas en el nivel de expresión en los diferentes fenotipos.

El patrón descrito es similar en los tres fenotipos, pero en el fondo de sobreexpresión de *HEC3* se observa expresión ectópica de *STY2* en el replum y en los sépalos. Este hecho debería ser comprobado con un experimento de hibridación *in situ* con una sonda dirigida a *STY2*.



Figura 14. Patrón de expresión de *STY2::GUS* en fondo silvestre, *35S:HEC3* y *hec1hec3* en inflorescencia y flor en estadio de antesis. Escala: 1 mm en inflorescencias; 100 µm en flores en antesis.

Como se puede observar en las Figuras 14 y 15, la línea de sobreexpresión de *HEC3* utilizada presenta un fenotipo muy débil, debido a la baja tasa de germinación de las semillas *35S:HEC3* por su largo tiempo de almacenaje. Por este motivo, los resultados obtenidos en este fondo genético podrían no ser extrapolables, y sería conveniente volver a realizar el experimento con líneas de sobreexpresión de *HEC* con un fenotipo más fuerte.

En este experimento se ha obtenido un patrón de expresión de ambos genes *STY* similar en los fondos de sobreexpresión y pérdida de función de los genes *HEC* y en el fondo silvestre. La expresión ectópica de *STY2* observada en el fondo mutante *35S:HEC3* parece no ser la responsable del fenotipo del mutante *35S:HEC3*, ya que la localización de esta expresión no parece explicar las alteraciones mostradas por Gremski et al. (2007) en la parte apical del gineceo, como, por ejemplo, la diferencia de longitud de las papilas estigmáticas. Esta expresión ectópica debería ser comprobada mediante hibridación *in situ*.

Si se compara el patrón de expresión de cada gen *STY* en fondos mutantes de pérdida de función *hec1hec3* con el obtenido en el genotipo silvestre, se observa que son muy similares y, por lo tanto, el fenotipo *hec1hec3* parece no ser debido a

alteraciones en la expresión de *STY*. Por consiguiente, la hipótesis de que *HEC* regule a *SHI/STY* puede ser cuestionada y no parece que sea la más probable.

4.1.3. Hipótesis 3: *HEC* y *SHI/STY* actúan de manera conjunta

La tercera hipótesis comprende la actuación conjunta entre *SHI/STY* y *HEC* para dirigir el desarrollo del estilo y del estigma. Para comprobar esta hipótesis se realizó el cruce de la doble sobreexpresión *HEC3* y *STY1* y su posterior caracterización fenotípica. Además, se realizó la caracterización fenotípica del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*, generado anteriormente en el laboratorio.

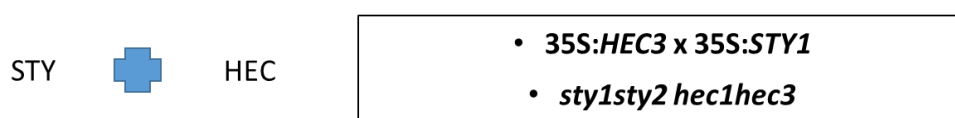


Figura 15. Cruces realizados para comprobar la hipótesis de la acción conjunta entre los genes *STY* y *HEC*.

4.1.3.1. Caracterización fenotípica del mutante 35S:*HEC3*x35S:*STY1*

Primero se observó la arquitectura general de las plantas (Figura 16). Se puede observar como la roseta del parental 35S:*STY1* y la de la doble sobreexpresión 35S:*HEC3*x35S:*STY1* son más reducidas que las del parental 35S:*HEC3* y de la planta silvestre (Col-0). Además, la roseta de 35S:*HEC3* presenta epinastia y tiene hojas alargadas, características que no se ven reflejadas en la doble sobreexpresión. En cuanto al tamaño, se puede denotar que la doble sobreexpresión de *STY1* y *HEC3* genera una planta más pequeña en comparación con los parentales y la planta silvestre. Este fenotipo puede ser denominado como sinérgico.



Figura 16. Morfología general de la planta resultante del cruce de la doble sobreexpresión de STY y HEC. Fotografía a bajo aumento de: 35S:*HEC3*x35S:*STY1*, 35S:*HEC3*, 35S:*STY1* y Col-0 (silvestre). Escala: 1 cm

Como ambos genes son capaces de actuar en el estadio de anthesis, se analizaron las inflorescencias y flores en anthesis de la doble sobreexpresión de *STY1* y *HEC3* y de los parentales en la lupa binocular (Figura 17). El parental 35S:*HEC3* utilizado presenta un engrosamiento del estilo, un aumento de las papilas estigmáticas y una pequeña elongación del ginóforo. En el parental 35S:*STY1* se puede observar el acortamiento del estilo y la expresión ectópica de células estilares en la valva. La doble sobreexpresión de *STY1* y *HEC3* genera un engrosamiento del estilo y un incremento de las papilas estigmáticas respecto de los mutantes simples. Además, en este fenotipo se suprime la expresión ectópica de células estilares en la valva que se observa en el mutante simple 35S:*STY1*. Esta observación está respaldada por el fenotipo de los mutantes simples de sobreexpresión de los genes *STY1* y *HEC3* (Figuras 3 y 6) en la parte apical del gineceo, ya que mientras en el mutante 35S:*STY1* se encuentran afectados el estilo y el estigma, en el mutante 35S:*HEC3* solo se observan afecciones fenotípicas en el estigma. Al sobreexpresar de forma conjunta *STY1* y *HEC3*, estos podrían interactuar y actuar en la especificación del estigma, disminuyendo la acción de *STY1* en la especificación del estilo.

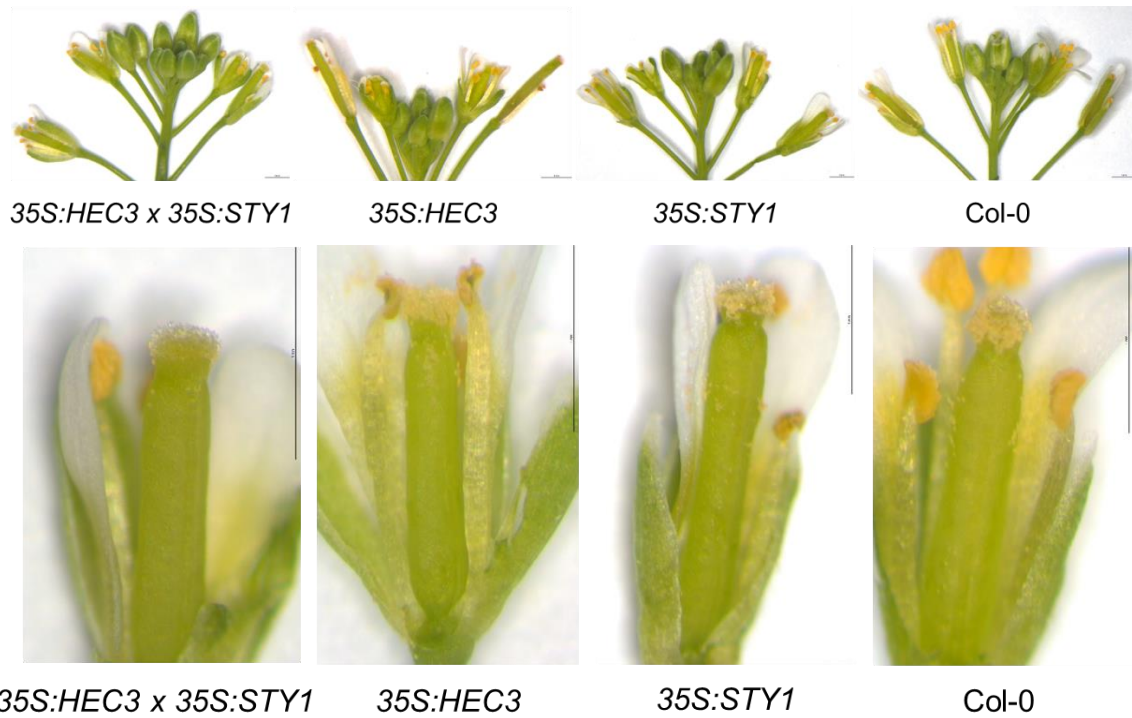


Figura 17. Morfología de la inflorescencia y de flor en anthesis de la doble sobreexpresión de *STY* y *HEC*. Fotografía a bajo aumento en lupa binocular de: 35S:HEC3x35S:STY1, 35S:HEC3, 35S:STY1 y Col-0 (silvestre). Escala: 1 mm

El fenotipo de la doble sobreexpresión observado en la lupa binocular se confirmó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de flores en anthesis del cruce y de ambos parentales (Figura 18).

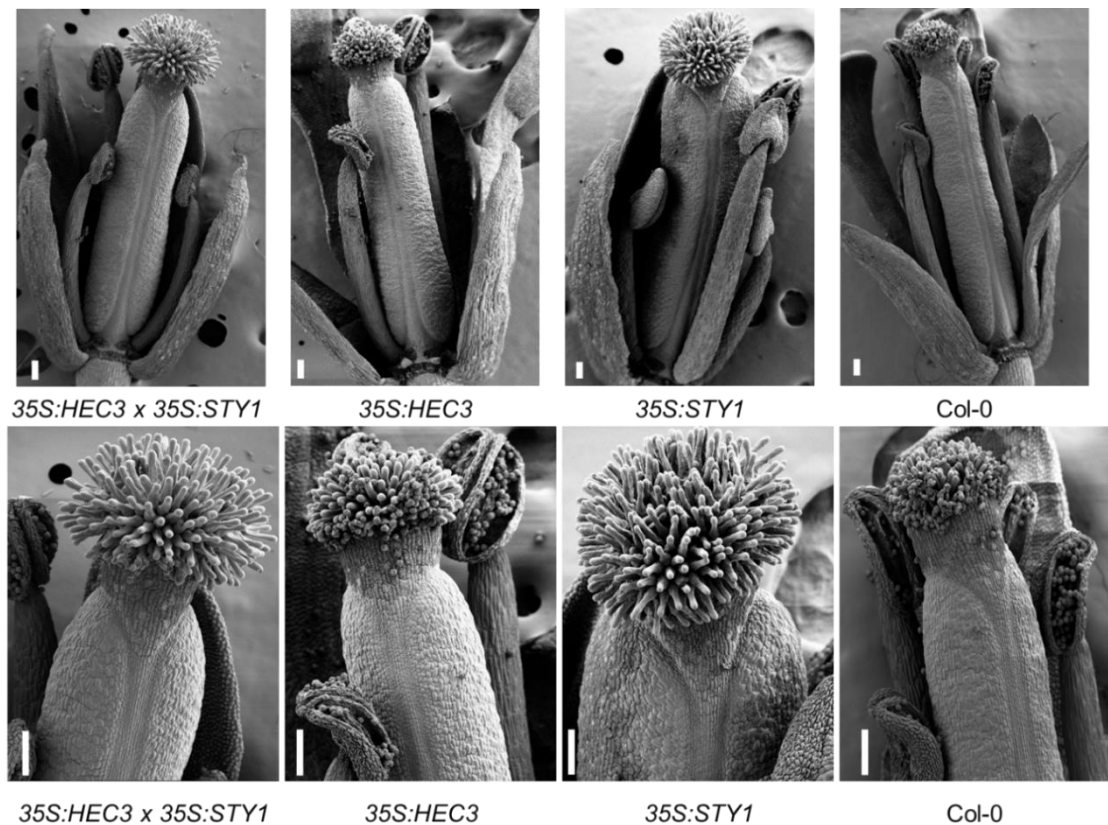


Figura 18. Morfología de la flor en anthesis y detalle de la parte apical del gineceo de la doble sobreexpresión de *STY* y *HEC* mediante microscopía electrónica de barrido. Fotografía de: 35S:*HEC3*x35S:*STY1*, 35S:*HEC3*, 35S:*STY1* y Col-0 (silvestre). Escala: 100 μ m

Los frutos de la doble sobreexpresión fueron analizados mediante toma de fotos en el macroscopio (Figura 19). Los frutos silvestres presentan una forma alargada y aplanada, mientras que los frutos de 35S:*STY1* son más cortos y tienen una morfología más plana y ensanchada. Además, estos presentan un estilo corto y se puede observar un engrosamiento en la parte apical de la valva debido a las células estilares expresadas de manera ectópica. Los frutos de 35S:*HEC3* son más alargados y estrechos que los silvestres. Los frutos de la doble sobreexpresión *STY1* y *HEC3* son más pequeños y curvados que los parentales, generándose un efecto sinérgico. En la parte apical del fruto se puede observar un engrosamiento del estilo y un aumento del tamaño del estigma respecto de los parentales y los frutos silvestres. Además, el estilo de estos frutos no presenta expresión ectópica de células estilares en las valvas, característica de los frutos del parental 35S:*STY*.

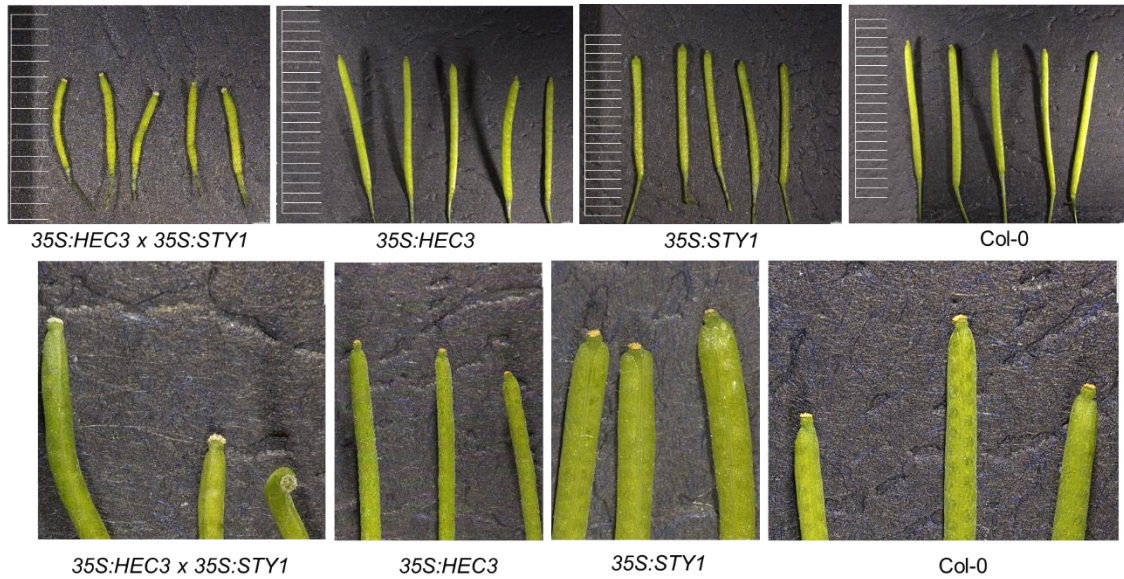


Figura 19. Morfología de los frutos de la doble sobreexpresión de *STY* y *HEC*. Fotografía a bajo aumento en macroscopio de: 35S:*HEC3*x35S:*STY1*, 35S:*HEC3*, 35S:*STY1* y Col-0 (silvestre). Escala: 1 mm

Los datos obtenidos en la caracterización fenotípica del mutante doble de sobreexpresión *STY1* y *HEC3* apoyan la hipótesis de la actuación conjunta entre *SHI/STY* y *HEC*, debido al evidente efecto sinérgico observado en el gineceo al sobreexpresar ambos genes, ya que el cruce 35S:*HEC3*x35S:*STY1* presenta un fenotipo fuerte, aunque los parentales sean líneas de fenotipo débil. Sería interesante repetir este cruce con líneas de fenotipo severo, para así poder observar mayores afecciones fenotípicas debido a ambas sobreexpresiones.

4.1.3.2. Caracterización fenotípica del mutante *sty1sty2hec1hec3*

Dentro de la hipótesis de la acción conjunta entre *SHI/STY* y *HEC* también se analizó el fenotipo del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*. Primero se observó la roseta (Figura 20). Todas las rosetas presentan un tamaño similar, siendo un poco más grande la del cuádruple mutante. En la roseta de *hec1hec3* se puede observar su forma redonda, mientras que las hojas de roseta de *sty1sty2* son más serradas, patrón característico de este mutante (Kuusk et al., 2002). La roseta del mutante *sty1sty2hec1hec3* presenta hojas redondeadas y serradas, combinando los dos fenotipos parentales. Este fenotipo puede ser debido a que *SHI/STY* y *HEC* no actúan conjuntamente en la roseta, es decir, tienen funciones diferentes, y que los caracteres de serrado de la hoja y redondez están controlados de manera diferente.

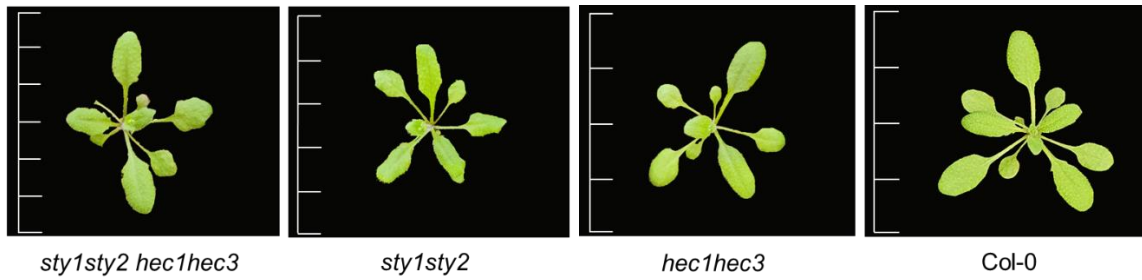


Figura 20. Morfología de la roseta del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*. Fotografía a bajo aumento de: *sty1sty2hec1hec3*, *sty1sty*, *hec1hec3* y Col-0 (silvestre).

La arquitectura general de la planta también fue estudiada (Figura 21), pero no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de la planta cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*.

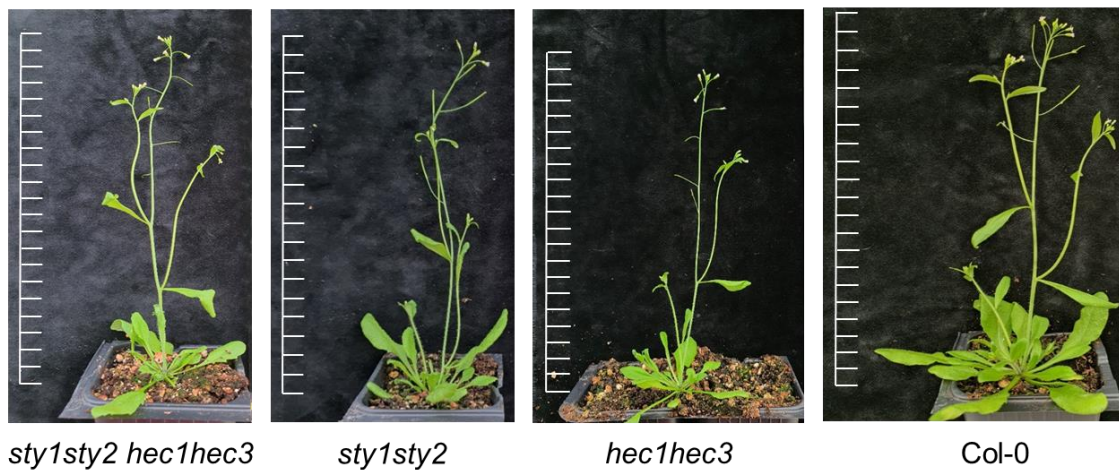


Figura 21. Morfología general del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*. Fotografía a bajo aumento de: *sty1sty2hec1hec3*, *sty1sty*, *hec1hec3* y Col-0 (silvestre).

Por el hecho de que los genes *SHI/STY* y *HEC* se expresan en el estadio de antesis, se analizaron en la lupa binocular inflorescencias y flores en antesis del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*, de los parentales *sty1sty2* y *hec1hec3* y del ecotipo silvestre (Figura 22).

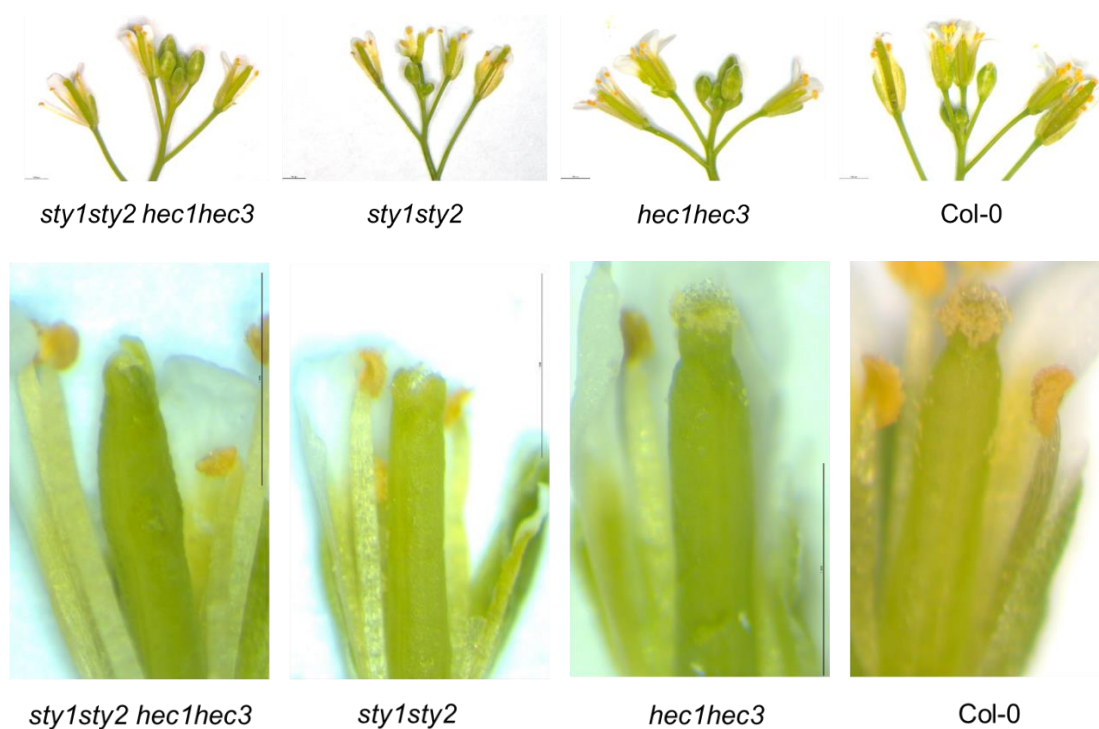


Figura 22. Morfología de la inflorescencia y de flor en anthesis del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*. Fotografía en lupa binocular de: *sty1sty2hec1hec3*, *sty1sty*, *hec1hec3* y Col-0 (silvestre). Escala: 1 mm

En la parte apical del gineceo del mutante *hec1hec3* se puede observar el alargamiento del estilo y las papilas estigmáticas son más pequeñas respecto del ecotipo silvestre. Por otro lado, el mutante *sty1sty2* presenta un estilo corto con dos protuberancias que generan una cavidad central donde se encuentran las papilas estigmáticas. Sin embargo, en el cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3* se puede observar una parte apical muy afectada en la que se encuentran dos protuberancias y parece que no se desarrolla el estilo ni el estigma.

La Figura 23 muestra los fenotipos de flores en anthesis del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*, de los parentales *sty1sty2* y *hec1hec3* y del ecotipo silvestre analizados en el microscopio electrónico de barrido. Los fenotipos observados en los parentales se corresponden con los descritos anteriormente. Se puede notar que las dos protuberancias de la parte apical del mutante *sty1sty2hec1hec3* provienen del replum, pero se observa un cambio en el patrón celular en el que se encuentran células con depósitos de cera similares a las estilares. Por lo tanto, en el cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3* sí que se especifican y se desarrollan células estilares, pero no se puede completar la estructura cilíndrica y el gineceo queda abierto por su parte apical. Este fenotipo podría ser debido a defectos en la polaridad apical-basal del gineceo,

debido al papel de juegan ambos genes en la biosíntesis y el transporte de auxinas (Gremski et al., 2007; Eklund et al., 2010). Además, en este mutante no se observan papilas estigmáticas. Los diferentes fenotipos observados implican que se necesita la expresión de los genes *SHI/STY* y *HEC* y su actuación conjunta para dirigir el desarrollo del estilo y del estigma.

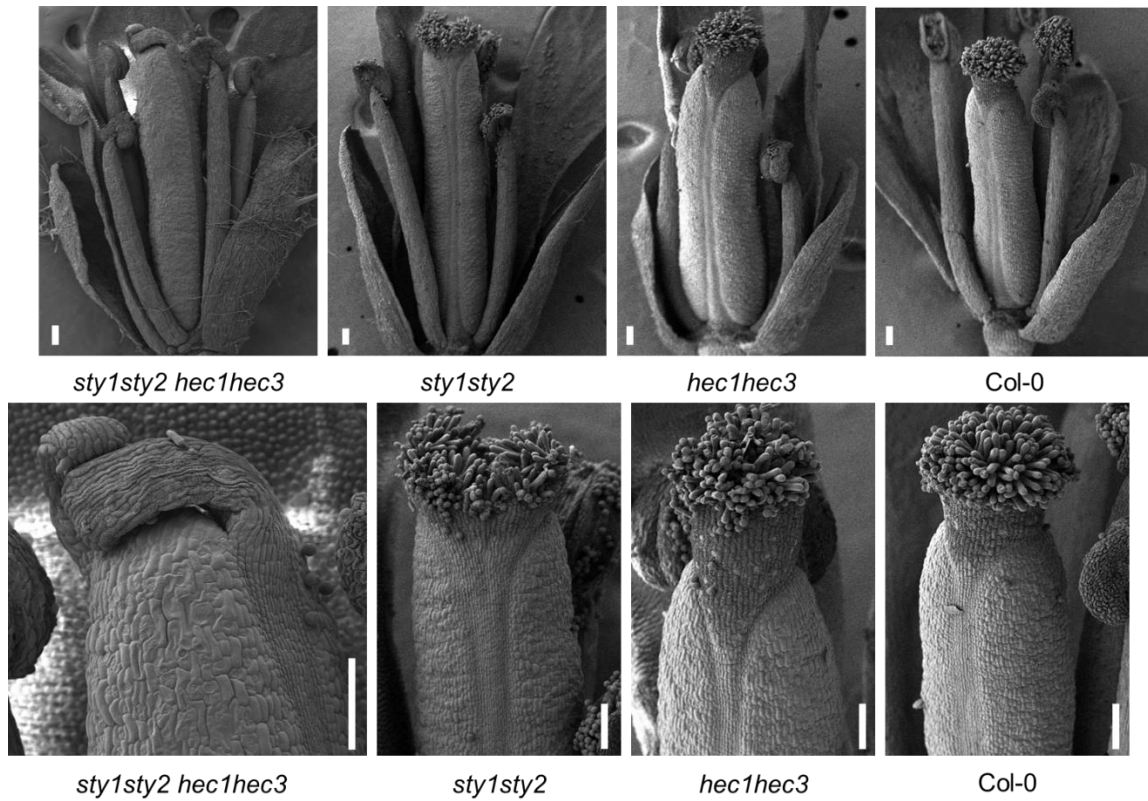


Figura 23. Morfología de la flor en antesis y detalle de la parte apical del gineceo del mutante *sty1sty2hec1hec3* mediante microscopía electrónica de barrido. Fotografía de: *sty1sty2hec1hec3*, *sty1sty2*, *hec1hec3* y Col-0 (silvestre). Escala: 100 μ m

El cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3* también presenta defectos en las anteras. En el estadio de antesis se observa una menor dehiscencia de las anteras del cuádruple mutante respecto de los parentales y del ecotipo silvestre (Figura 24).

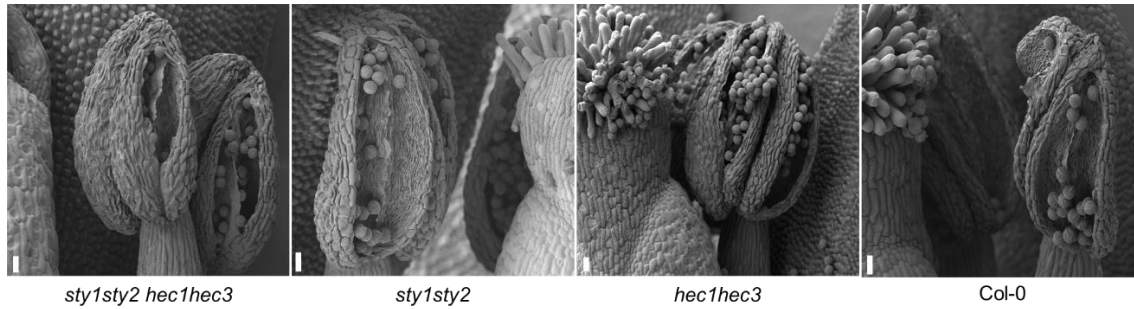


Figura 24. Morfología de las anteras del mutante *sty1sty2hec1hec3* mediante microscopía electrónica de barrido. Fotografía de: *sty1sty2hec1hec3*, *sty1sty2*, *hec1hec3* y Col-0 (silvestre). Escala: 20 μ m

En algunas especies de solanáceas, como *Brunfelsia australis*, *Nicotiana obtusifolia* y *Solanum lycopersicum*, se ha descrito que el gen ortólogo de *HEC3* se expresa en las anteras, indicando un posible rol en la dehiscencia de las anteras de esta familia, posiblemente relacionado con la del gen *IND*, parálogo específico de las brasicáceas (Ortiz-Ramírez et al., 2018). En mis prácticas de grado, se realizó la caracterización fenotípica del cuádruple mutante *hec1hec2hec3ind* en *A. thaliana*, donde se observó que la dehiscencia de las anteras se producía correctamente. Por lo tanto, la menor dehiscencia de las anteras en el cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3* podría ser debida a la pérdida de función de los genes *STY* (Puertes-Espadas, 2021).

Los frutos del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*, de los parentales *sty1sty2* y *hec1hec3* y del ecotipo silvestre también fueron analizados (Figura 25). Se observan los mismos fenotipos en la parte apical que en la flor en anthesis. Se aprecia una reducción del tamaño de los frutos del mutante *hec1hec3* con respecto a los de *sty1sty2* y los silvestres, mientras que los frutos del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3* presentan un tamaño más reducido que los de *hec1hec3*, generándose un fenotipo sinérgico respecto de los parentales. Cabe destacar que las silicuas del mutante cuádruple no son capaces de formar semillas y, por lo consiguiente, no se pueden utilizar de parental femenino en un cruce.

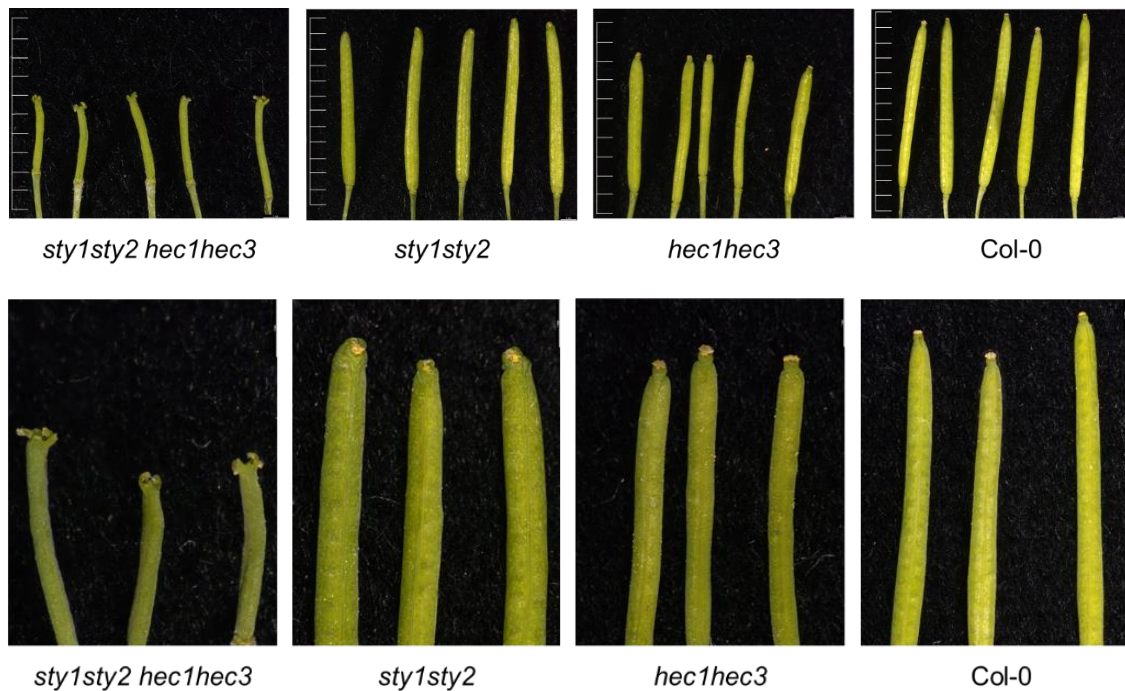


Figura 25. Morfología de los frutos del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*. Fotografía a bajo aumento en macroscopio de: *sty1sty2hec1hec3*, *sty1sty2*, *hec1hec3* y Col-0 (silvestre). Escala: 1 mm

Los datos obtenidos tanto en la caracterización fenotípica de la doble sobreexpresión de *HEC3* y *STY1* como en la del mutante cuádruple *sty1sty2hec1hec3* apoyan la hipótesis de que *SHI/STY* y *HEC* actúan de manera conjunta en la formación y desarrollo del estilo y el estigma de *Arabidopsis thaliana*.

4.1.4. Comprobación de la interacción entre *STY* y *HEC*

Como los resultados obtenidos en los diferentes cruces realizados parecían apoyar la hipótesis de que *SHI/STY* y *HEC* actúan de manera conjunta sin haber regulación transcripcional entre ellos, un escenario probable es que lo hicieran formando un complejo transcripcional. Para ello, se decidió comprobar esta posible interacción mediante complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC). Ésta se basa en la fusión de una mitad de una proteína fluorescente a una de las proteínas diana y la otra mitad a la segunda proteína diana. Una vez clonadas, las construcciones se agroinfiltran en *Nicotiana benthamiana*, para 3 días después ser observado el resultado en el microscopio confocal. Por sí solas, las mitades de la proteína fluorescente no son capaces de dar fluorescencia, pero si las proteínas diana interaccionan, la proteína fluorescente se puede reconstituir y se puede observar fluorescencia en el microscopio.

En este experimento se utilizó como control positivo la interacción ya conocida YFP^C -FUL/ YFP^N -SOC y como control negativo la interacción YFP^N -AGA/ YFP^C -SOC. Asimismo, se agroinfiltraron como control negativo todas las fusiones con YFP^N utilizadas para comprobar que no tenían autofluorescencia.

El primer experimento fue realizado con el objetivo de conocer si los factores de transcripción STY1 y STY2 eran capaces de interactuar con HEC1 y HEC3. En la Figura 26 se puede observar señal de YFP en núcleos de las interacciones YFP^N -STY1/ YFP^C -HEC1, YFP^N -STY2/ YFP^C -HEC1, YFP^N -STY1/ YFP^C -HEC3 y YFP^N -STY1/ YFP^C -HEC3. Este hecho indica que los factores de transcripción STY1 y STY2 son capaces de interactuar con HEC1 y HEC3, apoyando la hipótesis de que *SHI*/*STY* y *HEC* interactúan para dirigir el desarrollo del estilo y del estigma.

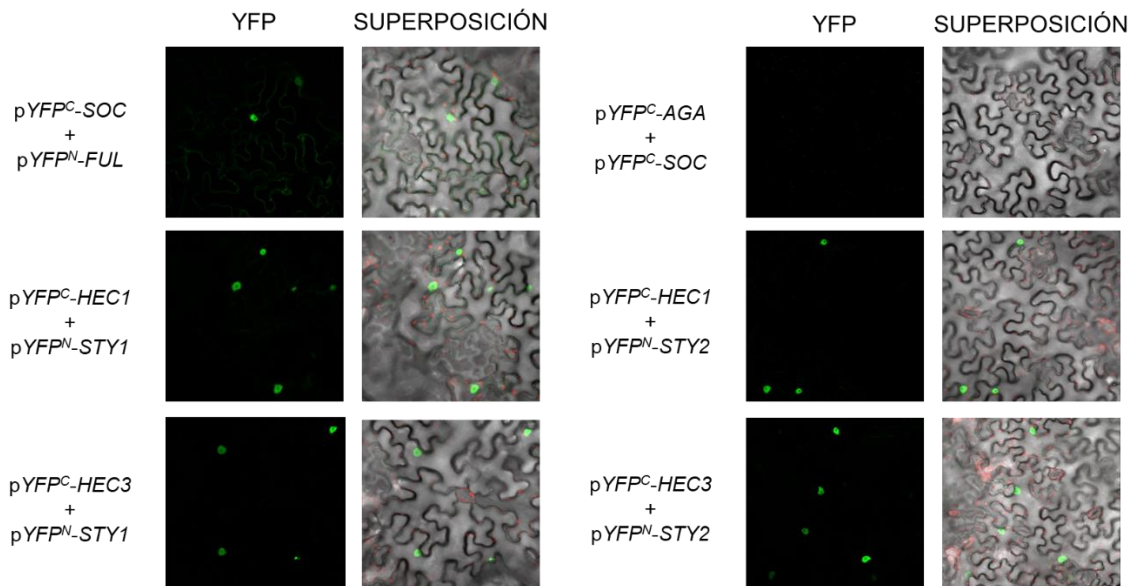


Figura 26. Estudio de la interacción proteína-proteína entre *STY* y *HEC*.

Se realizó otro experimento de BiFC para averiguar si los factores de transcripción STY1 y STY2 eran capaces de homodimerizar y heterodimerizar (Figura 27). Vemos como se observa señal YFP en núcleos de la interacción entre ambos factores, indicando que son capaces de heterodimerizar, y en la interacción de STY1 con él mismo, que implica que es capaz de homodimerizar. Sin embargo, no se observa señal YFP en la interacción YFP^N -STY2/ YFP^C -STY2, indicando que no es capaz de formar homodímeros.

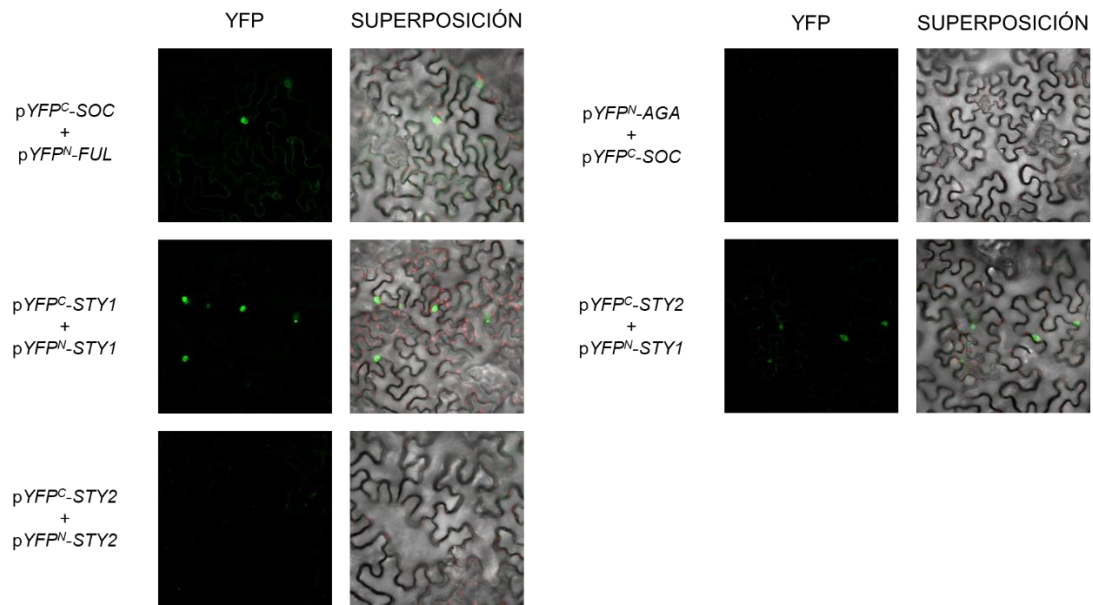


Figura 27. Estudio de la interacción proteína-proteína entre *STY1* y *STY2*.

Ballester (2016) comprobó que HEC1 y HEC3 eran capaces de formar tanto homodímeros como heterodímeros entre ellos.

La veracidad de estas interacciones se debería comprobar mediante una co-inmunoprecipitación (COIP) o un ensayo de doble híbrido en levaduras. En este Trabajo Final de Máster se generaron las clonaciones de *STY1* y *STY2* con las etiquetas *FLAG*, *HA*, *MYC* e *YFP*, con el objetivo de realizar una COIP con otras construcciones de los genes *HEC* con las mismas etiquetas previamente realizadas en el laboratorio. Esta comprobación no ha sido posible realizarla por problemas de tiempo.

Una vez comprobada la interacción entre *STY* y *HEC*, debido a las observaciones de Eklund et al. (2010) y Gremski et al. (2007) en las que *STY* y *HEC*, respectivamente, son capaces de alterar la biosíntesis y el transporte de auxinas, se podría realizar un ensayo de luciferasa con el objetivo de observar si el heterodímero *STY/HEC* es capaz de regular la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis y transporte de auxinas, como, por ejemplo, *AUX1*, *PIN*, *YUCCA2*, *YUCCA4* y *YUCCA8*.

4.2. Evaluación de la formación de un complejo de mayor orden a partir del heterodímero STY/HEC

Como hemos visto en la caracterización fenotípica y de expresión de los cruces y en los experimentos de BiFC, los factores de transcripción STY y HEC son capaces de interactuar y formar un heterodímero con el fin de dirigir el desarrollo del estilo y del estigma. Este dato junto con la interacción de STY con NGA descrita por Navarrete (2011) y el descubrimiento del heterotetrámero HEC-NGA-IND-SPT descrito por Ballester et al. (2021), nos llevó a preguntarnos si se podría formar un complejo de mayor orden a partir del heterodímero STY-HEC.

Con el fin de comprobar si STY era capaz de formar un heterodímero con el factor de transcripción SPT, factor importante en la formación de la parte apical del gineceo, se realizó un experimento de BiFC (Figura 28). Se puede observar señal de la proteína fluorescente YFP en todas las interacciones probadas: YFP^N -STY1/ YFP^C -SPT y YFP^N -STY1/ YFP^C -SPT. De este modo, tanto STY1 como STY2 pueden formar heterodímeros con SPT. El hecho de que STY pueda formar heterodímeros con HEC y SPT, hace pensar que podría formar parte del heterotetrámero NGA-HEC-IND-SPT.

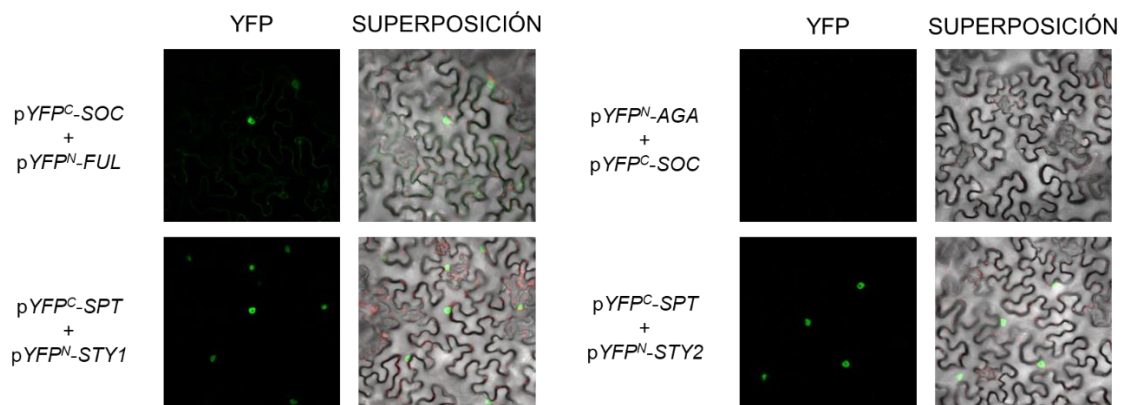


Figura 28. Estudio de la interacción proteína-proteína entre STY y SPT.

Otro experimento de BiFC fue realizado para comprobar la interacción entre STY y NGA (Figura 29). Se puede observar señal de la proteína fluorescente YFP en todas las interacciones probadas: YFP^N -STY1/ YFP^C -NGA1, YFP^N -STY2/ YFP^C -NGA1, YFP^N -STY1/ YFP^C -NGA3 y YFP^N -STY1/ YFP^C -NGA3. De este modo, STY1 y STY2 son capaces de formar heterodímeros con NGA1 y NGA3. La interacción de STY tanto con HEC con NGA por separado hace pensar que STY podría encontrarse en el primer paso (interacción NGA-HEC) del modelo propuesto por Ballester (2021). La veracidad de estas interacciones debería ser corroborada con una COIP o un ensayo de doble híbrido

en levaduras. Las construcciones de la COIP han sido generadas en este Trabajo Final de Máster, pero no se ha podido realizar el experimento por falta de tiempo.

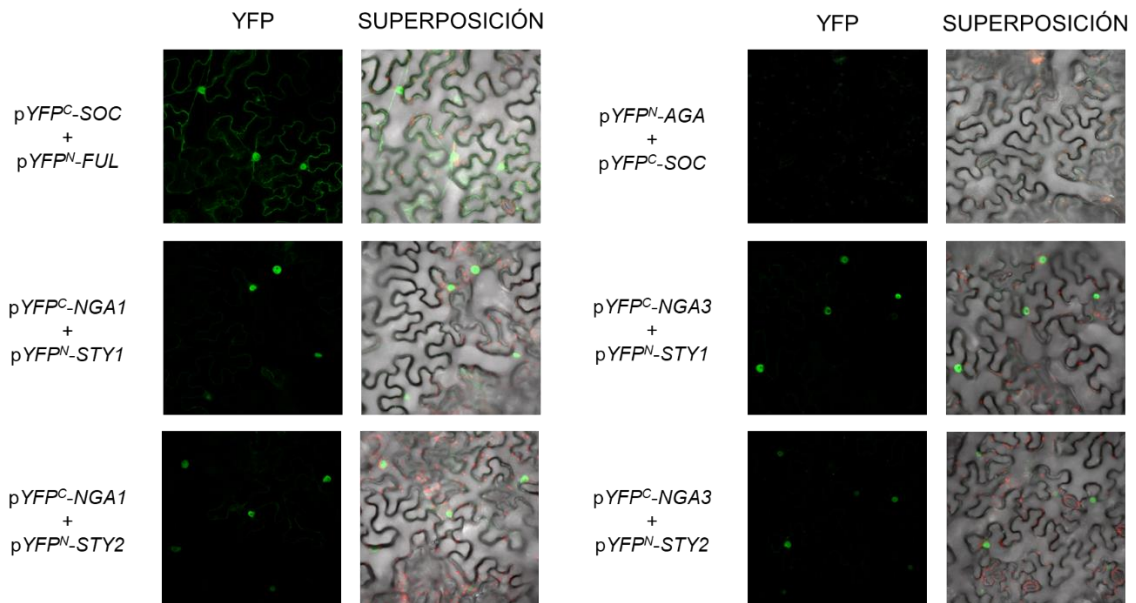


Figura 29. Estudio de la interacción proteína-proteína entre *STY* y *NGA*.

El patrón de expresión del gen *NGA1* fue analizado en flores en post-antesis (estadios 14-15) del mutante de doble sobreexpresión *35S:HEC3x35S:STY1* y en el mutante quádruple de pérdida de función *sty1sty2hec1hec3* mediante un experimento de hibridación *in situ* (Figura 30).

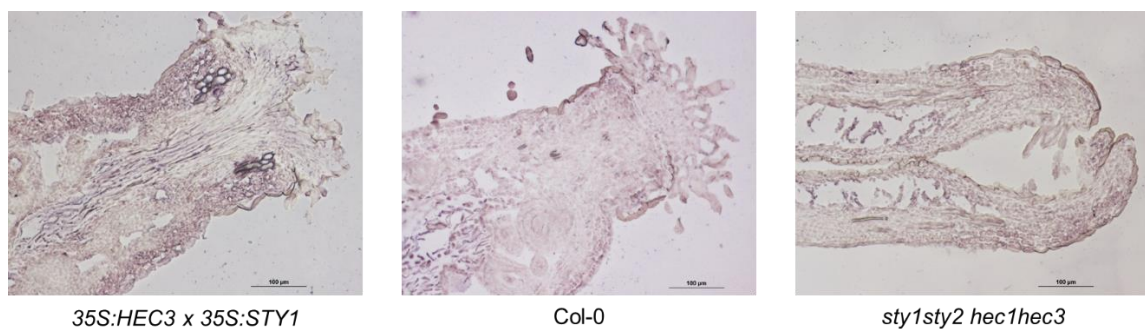


Figura 30. Patrón de expresión de *NGA1* en flores en estadio de post-antesis de la doble sobreexpresión de *STY* y *HEC* y el quádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*. Escala: 100 µm

La expresión de *NGA1* en el ecotipo silvestre se puede observar en el estilo, el estigma y en el tracto de transmisión. En el mutante de doble sobreexpresión *35S:HEC3x35S:STY1*, la expresión de *NGA1* también se encuentra en el estilo, el estigma y el tracto de transmisión, pero se observa expresión ectópica en las valvas del gineceo. En el quádruple mutante *sty1sty2hec1hec3* se puede ubicar la expresión de

NGA1 en el estilo, el estigma y el tracto de transmisión, pero no se observan diferencias en la localización de la expresión respecto del ecotipo silvestre.

Al no observar diferencias del patrón de expresión de *NGA1* en el cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3* en flores post antesis, se decidió comprobar su expresión en flores en estadio 11 (Figura 31). El patrón de expresión de *NGA1* en el ecotipo silvestre (Figura 31A) se observa en el estilo, en los óvulos y en el tracto de transmisión. La expresión en el cuádruple mutante presenta la misma localización que la del ecotipo silvestre (Figura 31B y 31C).

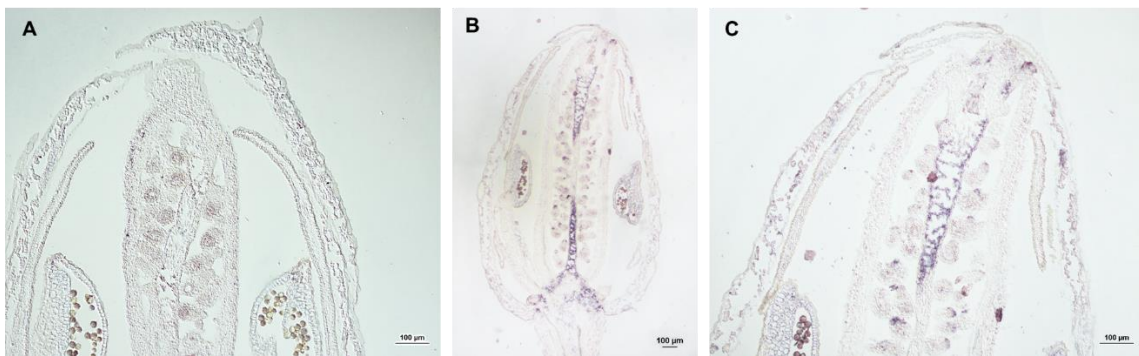


Figura 31. Patrón de expresión de *NGA1* en flores en estadio de pre-antesis del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*. (A) Col-0. (B)(C): *sty1sty2hec1hec3*. Escala: 100 µm

Además, para evaluar el patrón de expresión de *NGA3* se realizó el cruce *NGA3::GUS hec1hec3* x *sty1sty2hec1hec3*, pero no se pudieron obtener silicuas maduras del cruce, posiblemente debido a la baja dehiscencia de las anteras del cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3* al ser utilizado como parental masculino. Debido a la falta de estigma, este mutante tampoco podría ser utilizado como parental femenino.

Con el fin de comprobar si existe una desregulación del nivel de los genes *NGA* en el mutante cuádruple *sty1sty2hec1hec3*, se realizó una RT-qPCR dirigida a los genes *NGA1*, *NGA2*, *NGA3* y *NGA4*.

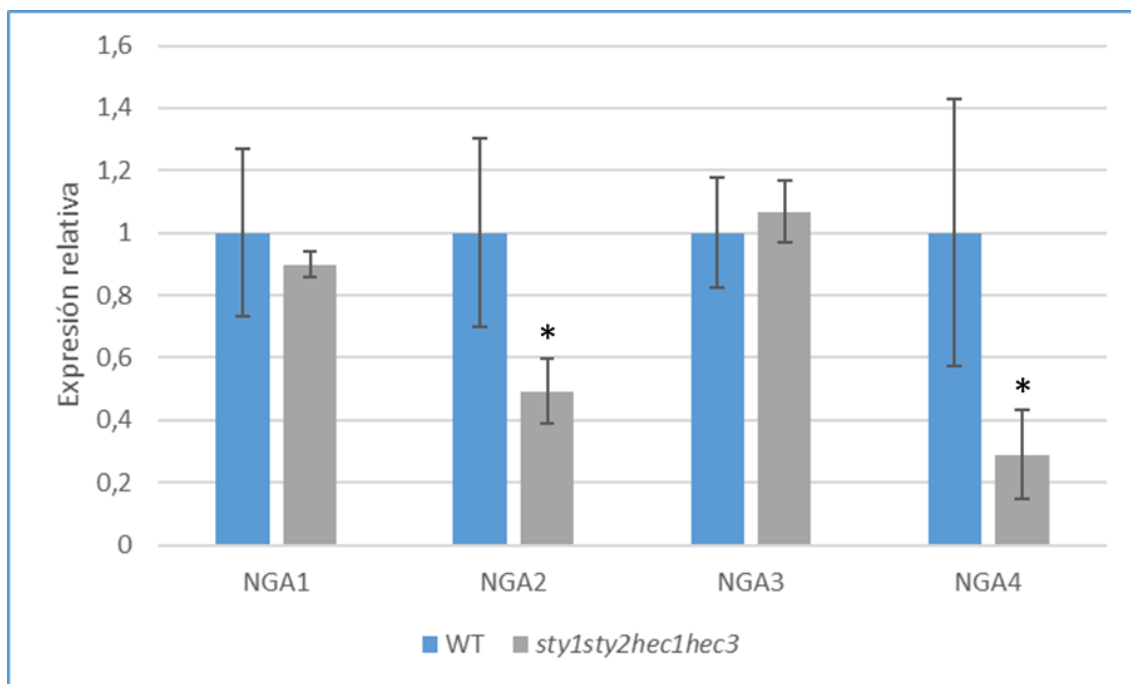


Figura 32. Niveles de expresión de los genes *NGA1*, *NGA2*, *NGA3* y *NGA4* en el cuádruple mutante *sty1sty2hec1hec3*. Se compararon los niveles de expresión en flores Col-0 (WT) y *sty1sty2hec1hec3* mediante RT-qPCR de los genes *NGA1*, *NGA2*, *NGA3* y *NGA4*. Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas. * $p < 0,05$

Como se puede observar en la Figura 32, existe una disminución significativa del nivel de expresión de *NGA2* y *NGA4* en el mutante *sty1sty2hec1hec3* respecto del ecotipo silvestre, implicando una regulación a la baja de los genes *NGA* en el mutante *sty1sty2hec1hec3*. La disminución de los niveles de *NGA* en este mutante podría contribuir al fenotipo severo que se puede observar en la parte apical de su gineceo. Aunque los datos obtenidos por Navarrete (2011) no muestran regulación directa entre *STY* y *NGA*, en los aportados por Ballester (2021) sí que se observa una disminución de la expresión de los genes *HEC* en el fondo mutante *nga*, sugiriendo una posible regulación transcripcional de *HEC* por parte de *NGA*. Por lo tanto, la disminución de la expresión de los genes *NGA* en el fondo *sty1sty2hec1hec3* podría ser debido a la ausencia de transcripción de los genes *STY* o por un efecto indirecto debido a la desregulación de otro gen que se encuentre involucrado de manera directa en la regulación de *NGA*.

5. Conclusiones

1. Los genes *STYLISH* (*STY*) y *HECATE* (*HEC*) presentan relación funcional.
2. El patrón de expresión de los genes *HEC* y *STY* no varía significativamente en fondos con expresión alterada de *STY* o *HEC*, respectivamente.
3. La doble sobreexpresión de los genes *STY* y *HEC* causa un aumento de las papilas estigmáticas, mientras que la pérdida de función de los genes *STY* y *HEC* implica que éstas no se formen.
4. Los genes *STY* y *HEC* actúan de manera conjunta en el desarrollo del estilo y del estigma de *Arabidopsis thaliana*.
5. Los factores de transcripción *STY* son capaces de formar heterodímeros con las proteínas involucradas en el complejo *HEC-NGA-IND-SPT*, fundamental en la formación del estigma de *A. thaliana*.
6. La interacción de *STY* con el complejo *HEC-NGA-IND-SPT* podría ser esencial para especificar y desarrollar el estigma de *A. thaliana*.

6. Bibliografía

- Alvarez J, Smyth DR. *CRABS CLAW* and *SPATULA*, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with *AGAMOUS*. *Development*. 1999 Jun;126(11):2377-86. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.126.11.2377>. PMID: 10225997.
- Ballester P, Martínez-Godoy MA, Ezquerro M, Navarrete-Gómez M, Trigueros M, Rodríguez-Concepción M, Ferrándiz C. A transcriptional complex of *NGATHA* and bHLH transcription factors directs stigma development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2021 Dec 3;33(12):3645-3657. doi: <https://doi.org/10.1093/plcell/koab236>. PMID: 34586419; PMCID: PMC8643694.
- Ballester P. Los genes *NGATHA*: análisis genético y molecular de su papel en la morfogénesis del gineceo de *Arabidopsis thaliana*. [Tesis doctoral no publicada]. Universitat Politècnica de València; 2016. doi: <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/72867>
- Baylis T, Cierlik I, Sundberg E, Mattsson J. *SHORT INTERNODES/STYLISH* genes, regulators of auxin biosynthesis, are involved in leaf vein development in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*. 2013 Feb;197(3):737-750. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.12084>. PMID: 23293954.
- Becker A. A molecular update on the origin of the carpel. *Curr Opin Plant Biol*. 2020 Feb;53:15-22. doi: 10.1016/j.pbi.2019.08.009. Epub 2019 Oct 15. PMID: 31622798.

- Dong Y, Wang YZ. Seed shattering: from models to crops. *Front Plant Sci.* 2015 Jun 24;6:476. doi: [10.3389/fpls.2015.00476](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00476). PMID: 26157453; PMCID: PMC4478375.
- Eklund DM, Ståldal V, Valsecchi I, Cierlik I, Eriksson C, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Sundström JF, Thelander M, Ezcurra I, Sundberg E. The *Arabidopsis thaliana* STYLISH1 protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis. *Plant Cell.* 2010 Feb;22(2):349-63. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064816>. Epub 2010 Feb 12. PMID: 20154152; PMCID: PMC2845406.
- Ellenberger T, Fass D, Arnaud M, Harrison SC. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev.* 1994 Apr 15;8(8):970-80. doi: <https://doi.org/10.1101/gad.8.8.970>. PMID: 7926781.
- Estornell LH, Landberg K, Cierlik I, Sundberg E. *SHI/STY* Genes Affect Pre- and Post-meiotic Anther Processes in Auxin Sensing Domains in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 2018 Feb 14;9:150. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00150>. PMID: 29491878; PMCID: PMC5817092.
- Fang D, Zhang W, Ye Z, Hu F, Cheng X, Cao J. The plant specific SHORT INTERNODES/STYLISH (SHI/STY) proteins: Structure and functions. *Plant Physiol Biochem.* 2022 Dec 20;194:685-695. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.018>. Epub ahead of print. PMID: 36565613.
- Ferrándiz C, Pelaz S, Yanofsky MF. Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:321-54. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.321>. PMID: 10872453.
- Ferrandiz C, Sessions A. Nonradioactive in situ hybridization of RNA probes to sections of plant tissues. *CSH Protoc.* 2008 Feb 1;2008:pdb.prot4943. doi: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4943>. PMID: 21356774.
- Girin T, Paicu T, Stephenson P, Fuentes S, Körner E, O'Brien M, Sorefan K, Wood TA, Balanzá V, Ferrándiz C, Smyth DR, Østergaard L. INDEHISCENT and SPATULA interact to specify carpel and valve margin tissue and thus promote seed dispersal in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2011 Oct;23(10):3641-53. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.111.090944>. Epub 2011 Oct 11. PMID: 21990939; PMCID: PMC3229140.
- Gremski K, Ditta G & Yanofsky MF. The *HECATE* genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 2007;134(20):3593-3601. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.011510>
- Hao Y, Zong X, Ren P, Qian Y, Fu A. Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Transcription Factors Regulate a Wide Range of Functions in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 1;22(13):7152. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22137152>. PMID: 34281206; PMCID: PMC8267941.
- Heim M, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey OC. The Basic Helix–Loop–Helix Transcription Factor Family in Plants: A Genome-Wide Study of Protein Structure and Functional Diversity. *Mol. Biol. Evol.* 2003 May; 20(5): 735–747. doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msg088>

- Herrera-Ubaldo H, de Folter S. Gynoecium and fruit development in *Arabidopsis*. *Development*. 2022 Mar 1;149(5):dev200120. doi: 10.1242/dev.200120. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35226096.
- Hewitt EJ, Eden A. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *The Analyst*. 1953;78:329-330.
- Kathare PK, Xu X, Nguyen A, Huq E. A COP1-PIF-HEC regulatory module fine-tunes photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2020 Sep;104(1):113-123. doi: <https://doi.org/10.1111/tpj.14908>. Epub 2020 Jul 11. PMID: 32652745; PMCID: PMC7959245.
- Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Körber H, Redei GP, Schell J. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(21):8467-71. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.21.8467>. PMID: 2554318; PMCID: PMC298303.
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Long JA, Fridborg I, Sundberg E. *STY1* and *STY2* promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis* gynoecium development. *Development*. 2002 Oct;129(20):4707-17. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.129.20.4707>. PMID: 12361963.
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Magnus Eklund D, Sundberg E. Functionally redundant *SHI* family genes regulate *Arabidopsis* gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant J*. 2006 Jul;47(1):99-111. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02774.x>. Epub 2006 Jun 1. PMID: 16740146.
- Liljegren SJ, Roeder AH, Kempin SA, Gremski K, Østergaard L, Guimil S, Reyes DK, Yanofsky MF. Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell*. 2004 Mar 19;116(6):843-53. doi: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00217-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00217-x). PMID: 15035986.
- Ma PC, Rould MA, Weintraub H, Pabo CO. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*. 1994 May 6;77(3):451-9. doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90159-7). PMID: 8181063.
- Navarrete ML. Análisis funcional de genes reguladores del desarrollo del fruto y su relación con las vías reguladas por auxinas. [Tesis doctoral no publicada]. Universitat Politècnica de València; 2011. doi: <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/10940>
- Ortiz-Ramírez CI, Plata-Arboleda S, Pabón-Mora N. Evolution of genes associated with gynoecium patterning and fruit development in Solanaceae. *Ann Bot*. 2018 May 11;121(6):1211-1230. doi: <https://doi.org/10.1093/aob/mcy007>. PMID: 29471367; PMCID: PMC5946927.
- Pabón-Mora N, Wong GK, Ambrose BA. Evolution of fruit development genes in flowering plants. *Front Plant Sci*. 2014;5(300):1-24. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00300>

- Puertes-Espadas A. Estudi de la redundància funcional d'un clado de factors de transcripció bHLH d'*Arabidopsis thaliana*. [Trabajo Final de Grado no publicado]. Universitat Politècnica de València; 2021. <http://hdl.handle.net/10251/171154>
- Redei GP. Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics*. 1962;47:443-460.
- Roeder AH, Yanofsky MF. Fruit development in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book*. 2006;4:e0075. doi: <https://doi.org/10.1199/tab.0075>. 2006 Feb 22. PMID: 22303227; PMCID: PMC3243326.
- Schuster C, Gailloch C & Lohmann JU. *Arabidopsis* HECATE genes function in phytohormone control during gynoecium development. *Development*. 2015; 142(19): 3343-3350. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.120444>
- Simonini S, Østergaard L. Female reproductive organ formation: A multitasking endeavor. *Curr Top Dev Biol*. 2019;131:337-371. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.10.004. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30612622.
- Sohlberg JJ, Myrenäs M, Kuusk S, Lagercrantz U, Kowalczyk M, Sandberg G, Sundberg E. *STY1* regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *Plant J*. 2006 Jul;47(1):112-23. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02775.x>. 2006 Jun 1. PMID: 16740145.
- Trigueros M, Navarrete-Gómez M, Sato S, Christensen SK, Pelaz S, Weigel D, Yanofsky MF, Ferrándiz C. The *NGATHA* genes direct style development in the *Arabidopsis* gynoecium. *Plant Cell*. 2009 May;21(5):1394-409. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.109.065508>. Epub 2009 May 12. PMID: 19435937; PMCID: PMC2700528.
- Zhu L, Xin R, Bu Q, Shen H, Dang J, Huq E. A Negative Feedback Loop between PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS and HECATE Proteins Fine-Tunes Photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2016 Apr;28(4):855-74. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00122>. Epub 2016 Apr 12. PMID: 27073231; PMCID: PMC4863390.

7. Anexos

7.1. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Relación del TFM “Estudio del papel de los factores de transcripción SHI/STY en la formación del estigma de *Arabidopsis thaliana*” con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030.

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.		X		
ODS 2. Hambre cero.	X			
ODS 3. Salud y bienestar.		X		
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.		X		
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.	X			
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

El conocimiento del papel de los genes *SHI/STY* en el desarrollo del gineceo es esencial, debido a que estos se encargan de formar el estigma de *A. thaliana*. Entender con profundidad el mecanismo de acción de todos los genes encargados del desarrollo de la parte apical del gineceo permitiría desarrollar diferentes estrategias biotecnológicas que favorezcan la polinización y la producción de semillas en un entorno cada vez más amenazado por el cambio climático y por el hambre en el mundo.