







UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

**Análisis funcional de los factores de transcripción  
*TOWER-OF-PISA1* y *TOWER-OF-PISA2* y su  
implicación en el desarrollo del gineceo de  
*Arabidopsis***

Memoria presentada por  
**MARINA TRIGUEROS GONZÁLEZ**  
para optar al grado de  
**DOCTOR**  
por la Universidad Politécnica de Valencia

Directora:  
**CRISTINA FERRÁNDIZ MAESTRE**







MINISTERIO  
DE CIENCIA  
E INNOVACIÓN



INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y CELULAR  
DE PLANTAS "Primo Yúfera"

Dña. CRISTINA FERRÁNDIZ MAESTRE, Doctora en Ciencias Biológicas y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia,

CERTIFICA que,

Dña. MARINA TRIGUEROS GONZÁLEZ, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que con el título "Análisis funcional de los factores de transcripción *TOWER-OF-PISA1* y *TOWER-OF-PISA2* y su implicación en el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis*", presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia a 19 de Mayo de 2008.

Fdo. Dr. Cristina Ferrándiz Maestre

UNIVERSIDAD POLITECNICA  
DE VALENCIA  
AVDA. DE LOS NARANJOS S/N  
46022-VALENCIA, ESPAÑA  
TEL.: +34 (9)6 387 78 56  
FAX: +34 (9)6 387 78 59  
<http://www.ibmcp.upv.es>



**Agradece a la llama su luz, pero no olvides el pie del candil que,  
constante y paciente, la sostiene en la sombra. (Rabindranath Tagore).**



## AGRADECIMIENTOS

A Cristina, porque sin ella esta Tesis no podría haberse realizado; por su apoyo, dirección y consejos: gracias. A Paco, por sus consejos y ayuda. Al laboratorio de Brendan Davies por hacer que mi estancia en Leeds fuera fantástica. A François, por leerse pacientemente este trabajo y por su “evaluation de la thèse“. A Marisa, por las *in situs* de *TOP1* y *TOP2*, y por otros resultados no publicados. A todos los servicios técnicos por facilitar el desarrollo de este trabajo. A todos aquellos que nos han facilitado semillas e información: M. Yanofsky, E. Sundberg, D. Smyth, Y. Zhao, R. Martienssen.

A los amigos del laboratorio 11 (para mi sigue siendo el 11): Ana, Majo, Antonio, Pedro y Noelia que han estado allí cuando los he necesitado, tanto científicamente como personalmente. A Carol, por su ayuda con las plantitas. A MD, por sus truquitos de microscopía. A Eugenio, por tener las secuencias tan rápido. A Roberto y Joanna, por su amistad dentro y fuera del laboratorio. A Jorge y M<sup>o</sup> Ángeles, por los descansitos merecidos y por las cervecitas en el Inma. Al Konsejo de sabios por ser...como ellos son; aunque ahora algunos estén lejos (Capa y Diego), siempre han estado en los buenos momentos (ej. Palacete Nohales) y han conseguido que olvidara los malos. A Vicente, por aguantarme más que nadie en el laboratorio, por los cafés, por los cigarrillos (creo que te debo varios paquetes...seguramente a Antonio también) y por las miles de referencias bibliográficas (sobre todo las de Nature).

A los amigos NO científicos, porque hay que desconectar de vez en cuando. Por supuesto, a mis padres, por dejarme elegir mi camino aunque no estuviera bien asfaltado.

A Hugo, que es sin duda quien ha hecho posible que esta tesis exista. Por estar conmigo en los buenos momentos pero sobre todo por estar en los malos. Por ayudarme a continuar y no tirar la toalla.

Y como seguro que me olvido de alguien, gracias a todos los demás.



La realización de esta tesis ha sido parcialmente financiada gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Consellería de Cultura i Educació de la Generalitat Valenciana.



**A mis padres**

**A Hugo**





**RESÚMENES**

---



---

**Análisis funcional de los factores de transcripción *TOWER OF PISA 1* y *TOWER OF PISA 2* y su implicación en el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis*.**

Los carpelos, organizados en un gineceo, presentan el mayor grado de complejidad anatómica y funcional de entre los órganos florales. El fruto deriva fundamentalmente del gineceo y es un órgano altamente especializado cuya función, una vez se produce la polinización y fertilización, es asegurar la maduración y la posterior dispersión de las semillas.

A pesar del gran progreso que ha tenido lugar en los últimos años, aún quedan por resolver numerosos interrogantes acerca de la morfogénesis del gineceo y la fructificación. Una manera obvia de contribuir al esclarecimiento de estas cuestiones es desvelar la participación de nuevos moduladores genéticos, cuyas alteraciones provoquen perturbaciones morfológicas visibles en el desarrollo del gineceo.

En esta Tesis Doctoral se ha pretendido profundizar en la comprensión de las vías genéticas implicadas en el desarrollo del gineceo, así como de la coordinación de dichas rutas. Para ello se ha realizado un esfuerzo para caracterizar funcionalmente dos miembros de una familia de factores transcripcionales con dominio B3, *TOP1* y *TOP2*, que parecían estar implicados en la diferenciación del gineceo y ser un factor común a varias de las vías ya descritas. Se ha intentado establecer cuáles son las relaciones genéticas y moleculares de estos genes con otros identificados previamente, y que actúan en distintos aspectos del desarrollo del gineceo y el fruto de *Arabidopsis*.

Para ello, se han caracterizado funcionalmente dichos genes mediante la obtención de líneas de pérdida y de ganancia de función de los mismos, y la caracterización fenotípica de dichos mutantes. Así, se ha comprobado que están implicados redundantemente en el desarrollo de las regiones apicales del gineceo, promoviendo la diferenciación de las células del estilo y el estigma. Se ha determinado que el patrón de expresión espacio-temporal de *TOP1* y *TOP2* coincide con las regiones afectadas en los mutantes de pérdida de función, es decir, el estilo y el estigma. También se ha detectado expresión en otras regiones del gineceo y otros órganos florales, así como en las hojas y raíces, en general coincidiendo con zonas de elongación y/o aparición de nuevos órganos, y con regiones que se han relacionado con elevadas concentraciones de auxinas.

Por otra parte, se han analizado las interacciones genéticas entre *TOP1*, *TOP2* y otros genes ya caracterizados implicados en el desarrollo del gineceo, mediante la generación de diversas combinaciones mutantes y la determinación de los patrones de expresión de *TOP1* en diferentes fondos mutantes. Así mismo, se ha determinado el efecto que las mutaciones *top1* y *top2* tienen sobre la expresión de los otros genes estudiados. Así, se ha comprobado que actúan junto a los genes *STY* y *SPT* en el desarrollo de las regiones apicales del gineceo, donde no se ha detectado una regulación directa entre ellos. Sí que se ha observado que *TOP* podría reprimir a *SPT* en otras regiones, como los óvulos y las semillas. Asimismo, se ha observado que *ETT* reprime la expresión de *TOP1* en regiones apicales del ovario. También se han observado que los genes *TOP* actúan de forma sinérgica con *LUG* en el desarrollo de los tejidos marginales, como el estilo, el estigma y el septum.

Por otra parte, se ha comprobado que los genes *TOP* podrían estar relacionados con la síntesis de auxinas, y que están implicados en el desarrollo del eje medio-lateral del gineceo de *Arabidopsis* activando directa o indirectamente a *IND*.

Y por último, mediante el escrutinio de una librería de doble híbrido, se ha determinado que los genes *TOP* interactúan físicamente con *YAB3* y *BRX-L4*, dos reguladores transcripcionales implicados en el establecimiento de la polaridad abaxial-adaxial del gineceo y en el crecimiento de la raíz respectivamente.

**Functional analysis of *TOWER OF PISA 1* and *TOWER OF PISA 2* transcriptional factors and their role in *Arabidopsis* gynoecium development.**

Carpels, the female floral organs that form the gynoecium, show the highest anatomical and functional complexity among the floral organs. The fruits are basically derived from the gynoecium, being a highly specialized organ which main roles are to ensure maturation and dispersal of the seeds.

In spite of the huge progress that has taken place in the last few years, there are still open questions about gynoecium morphogenesis and fruit development. An obvious way to contribute on unraveling these questions is to reveal new genetic modulators which mutations affect carpel development.

In this Doctoral Thesis, our aim was to obtain further insights on the genetic pathways involved in gynoecium development and how these different pathways are coordinated. An effort has been made to functionally characterize two B3 transcriptional factors, *TOP1* and *TOP2*, potentially involved in gynoecium development as a common factor to some of the pathways already described. We have tried to identify the genetic and molecular interactions of *TOP1* and *TOP2* with previously described genes involved in different *Arabidopsis* gynoecium and fruit development aspects.

For this purpose we have functionally characterized these genes obtaining loss- and gain-of-function lines and phenotypically characterizing them. We have shown that *TOP1* and *TOP2* are redundantly involved in the development of apical gynoecium tissues promoting style and stigma differentiation. We have analyzed *TOP1* and *TOP2* spatial and temporal pattern of expression, which overlaps with those regions defective in loss-of-function mutants, style and stigma. Expression has been also detected in other gynoecium tissues, the rest of the floral organs and in leaves and roots, generally associated with positions of primordia emergence or cell proliferation and with regions which have been reported as auxin maxima.

In addition, we have analyzed the genetic interactions of *TOP1* and *TOP2* with previously characterized genes involved in gynoecium development through generation and characterization of different mutant combinations, the determination of *TOP1* expression patterns in different mutant backgrounds, and, conversely, analyzing the effect of *top1* and *top2* mutations on the expression of different genes. Thus, we have determined that *TOP* genes act with *STY* and *SPT* directing style and stigma development, likely at the same level since no direct regulation has been observed among them, at least in the apical gynoecium context. In contrast, we have also shown that *TOP1* negatively regulates *SPT* in ovules and seeds. In addition, we have determined that *ETT* could restrict *TOP1* expression to apical gynoecium tissues. In addition, we have shown the *TOP* genes act synergistically with *LUG* in marginal tissue development: style, stigma and septum.

Our results indicate that *TOP* genes could be involved in auxin synthesis pathways, and that they could also be involved in medial-lateral gynoecium patterning development positively regulating *IND* direct or indirectly.

Finally, in a yeast two-hybrid assay we have determined that *TOP* genes physically interact with *YAB3* and *BRX-L4*, two transcriptional regulators with proposed roles in abaxial-adaxial polarity specification and root growth respectively.

### **Anàlisi funcional dels factors de transcripció *TOWER OF PISA 1* i *TOWER OF PISA 2* i la seua implicació en el desenvolupament del gineceu d'*Arabidopsis*.**

Els carpels, organitzats formant el gineceu, presenten el major grau de complexitat anatòmica i funcional d'entre tots els òrgans florals. El fruit deriva fonamentalment del gineceu i es tracta d'un òrgan altament especialitzat la funció del qual, una vegada s'ha produït la pol·linització i la fertilització, és la d'assegurar la maduració i la posterior dispersió de les llavors.

Malgrat l'avanç esdevingut als últims anys, encara hi resten nombrosos interrogants per resoldre al voltant de la morfogènesi del gineceu i de la fructificació. Una manera òbvia de contribuir a l'esclariment d'aquestes qüestions és la de descobrir la participació de nous moduladors gènics, les alteracions dels quals provoquen perturbacions morfològiques visibles en el desenvolupament del gineceu.

En la present Tesi Doctoral s'ha pretès apregonar en la comprensió de les vies genètiques implicades en el desenvolupament del gineceu i la seua coordinació. Així s'han dirigit els esforços en la caracterització funcional de dos membres d'una família de factors transcripcionals amb domini B3, *TOP1* i *TOP2*, que semblaven estar implicats en la diferenciació del gineceu i ser un factor comú a varies de les vies ja descrites. S'ha intentat establir quines són les relacions genètiques i moleculars d'aquests gens amb d'altres identificats prèviament, i que actuen en diferents aspectes del desenvolupament del gineceu i del fruit d' *Arabidopsis*.

Amb eixe objectiu, han estat caracteritzat funcionalment els gens esmentats mitjançant l'obtenció de línies de pèrdua i de guany de funció i la caracterització fenotípica d'eixos mutants. Així, ha estat comprovat que es troben implicats de forma redundat en el desenvolupament de les regions apicals del gineceu, promovent la diferenciació de les cèl·lules de l'estil i l'estigma. A més a més, ha quedat determinat que el patró d'expressió de *TOP1* i *TOP2* coincideix amb les regions afectades en els mutants de pèrdua de funció, és a dir, l'estil i l'estigma. També s'ha detectat la seua expressió en altres regions del gineceu i d'altres òrgans florals, així com en les fulles i les arrels, en general coincidint amb zones d'elongació i/o aparició de nous òrgans florals, i en regions que han estat relacionades amb elevades concentracions d'auxines.

D'altra banda, han estat analitzades les interaccions gèniques entre *TOP1*, *TOP2* i d'altres gens ja caracteritzats implicats en el desenvolupament del gineceu, mitjançant la generació de diverses combinacions mutants i la determinació dels patrons d'expressió de *TOP1* en diferents fons mutants. Així mateix, s'ha determinat l'efecte que les mutacions *top1* i *top2* tenen sobre l'expressió dels altres gens estudiats. D'aquesta manera, es comprova que actuen junt amb els gens *STY* i *SPT* en el desenvolupament de les regions apicals del gineceu, on no s'ha detectat una regulació directa entre ells. Sí que s'ha observat que *TOP* podria reprimir a *SPT* en altres regions com ara els òvuls i les llavors. A més a més, s'ha observat que *ETT* reprimeix l'expressió de *TOP 1* en regions apicals de l'ovari. També s'ha observat que els gens *TOP* actuen de forma sinèrgica amb *LUG* en el desenvolupament dels teixits marginals, com l'estil, l'estigma i el septum.

Els nostres resultats indiquen que els gens *TOP* podrien estar relacionades amb la síntesi d'auxines i que estan implicats en el desenvolupament de l'eix medi-lateral del gineceu d'*Arabidopsis* activant directament o indirectament a *IND*.

Finalment, mitjançant l'escrutini d'una llibreria de doble híbrid, s'ha determinat que els gens *TOP* interaccionen físicament amb *YAB3* i *BRX-L4*, dos reguladors transcripcionals implicats en l'establiment de la polaritat abaxial-adaxial del gineceu i en el creixement de l'arrel respectivament.



ÍNDICE.....	I
ABREVIATURAS.....	XVII
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. EL DESARROLLO VEGETAL.....</b>	<b>1</b>
<b><u>1-1. Formación del fruto a partir del meristemo.....</u></b>	<b>2</b>
<b>2. FACTORES HORMONALES QUE CONTROLAN EL DESARROLLO VEGETAL.....</b>	<b>4</b>
<b><u>2-1. Hormonas vegetales.....</u></b>	<b>4</b>
2-1-1. Las Auxinas.....	4
2-1-2. Otras hormonas vegetales.....	6
<b>3. EL DESARROLLO FLORAL. LAS FLORES COMO ÉXITO EVOLUTIVO.....</b>	<b>7</b>
<b><u>3-1. El carpelo como hoja modificada.....</u></b>	<b>7</b>
<b>4. EL DESARROLLO DEL FRUTO.....</b>	<b>8</b>
<b>5. <i>Arabidopsis thaliana</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO VEGETAL.....</b>	<b>9</b>
<b><u>5-1. Aspectos generales.....</u></b>	<b>9</b>
5-2. Morfología y ciclo vital.....	10
<b>6. <i>Arabidopsis thaliana</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DEL GINECEO.....</b>	<b>11</b>
<b><u>6-1. El gineceo de <i>Arabidopsis</i>.....</u></b>	<b>11</b>
<b><u>6-2. Desarrollo floral en <i>Arabidopsis</i>.....</u></b>	<b>15</b>
<b>7. FACTORES GENÉTICOS QUE CONTROLAN EL DESARROLLO DEL GINECEO EN <i>Arabidopsis</i>.....</b>	<b>17</b>
<b><u>7-1. Genes que intervienen en el desarrollo del gineceo.....</u></b>	<b>17</b>
7-1-1. De la hoja al carpelo : genes de identidad.....	17
7-1-2. División de territorios.....	18
7-1-3. Desarrollo de los dominios laterales o patrón medio-lateral.....	20
7-1-4. Desarrollo del tejido marginal.....	22
7-1-5. Patrón apical-basal.....	25
<b>8. NUEVAS FUNCIONES GÉNICAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DEL GINECEO. Los <i>TOP</i>, factores transcripcionales de la familia B3 implicados en el desarrollo del gineceo.....</b>	<b>31</b>

<b><u>8-1. Familia LAF.</u></b> .....	32
<b><u>8-2. Familia REM.</u></b> .....	33
<b><u>8-3. Familia ARF.</u></b> .....	34
<b><u>8-4. Familia RAV.</u></b> .....	35
8-4-1. La subfamilia TOP. ....	35
<b>II. ANTECEDENTES.</b> .....	<b>39</b>
1. AISLAMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LA LÍNEA <i>top1-1D</i> . ....	39
2. ANÁLISIS GENÉTICO DE LA LÍNEA <i>top1-1D</i> . ....	41
3. LA FAMILIA <i>TOP</i> . ....	43
<b>III. OBJETIVOS.</b> .....	<b>47</b>
1. OBJETIVO DE ESTA TESIS. ....	47
<b>IV. RESULTADOS.</b> .....	<b>51</b>
1. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LOS GENES <i>TOP</i> . ....	51
2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES <i>TOP</i> . ....	55
<b><u>2-1. Obtención de líneas de pérdida de función.</u></b> .....	55
2-1-1. Búsqueda de mutantes en colecciones disponibles.....	55
<u>Mutantes por inserción de elementos transponibles.</u> .....	55
<u>Mutantes por inserción de T-DNA.</u> .....	59
2-1-2. Descripción preliminar de los fenotipos de <i>top1-2</i> , <i>top1-3</i> , <i>top1-4</i> , <i>top2-1</i> y <i>top2-2</i> . ....	59
2-1-3. Estudio del efecto de las inserciones en los alelos de los genes <i>TOP1</i> y <i>TOP2</i> . ....	60
<b><u>2-2. Caracterización fenotípica de los mutantes de pérdida de función <i>top</i>.</u></b> .....	62
2-2-1. Descripción de las alteraciones en el gineceo de los mutantes <i>top</i> . ....	63
<u>Alteraciones en la longitud de los frutos de los mutantes <i>top</i>.</u> .....	63
<u>Morfología de las regiones apicales del gineceo de los mutantes <i>top</i>: estilo y papilas estigmáticas.</u> .....	65
2-2-2. Estudio comparativo de la ontogenia del gineceo silvestre y el gineceo de los mutantes <i>top</i> . ....	69
2-2-3. Estudio de los tipos celulares en el gineceo de los mutantes <i>top</i> . ....	69
<u>Estudio morfológico de las células de la epidermis del gineceo de los mutantes <i>top</i>.</u> .....	69
<u>Estudio de la organización interna del gineceo de los mutantes <i>top</i>.</u> .....	70



<u>Estudio del desarrollo vascular del gineceo de los mutantes <i>top</i></u> .....	72
<b>2-2-4. Descripción de las alteraciones en el desarrollo vegetativo de los mutantes <i>top</i></b> .....	75
<u>Alteraciones en el tallo</u> .....	75
<u>Alteraciones en cotiledones y hojas</u> .....	76
<u>Alteraciones en la raíz de los mutante <i>top</i></u> .....	78
<b><u>2-3. Estudio de la expresión de los genes <i>TOP</i></u></b> .....	80
<b>2-3-1. Localización del mRNA de <i>TOP1</i> y <i>TOP2</i> mediante hibridación <i>in situ</i></b> .....	80
<b>2-3-2. Generación de la construcción pMT5 (<i>TOP1</i><sub>pro</sub>::<i>GUS</i>) y análisis de expresión del gen delator en planta</b> .....	81
<u>Patrón en órganos reproductivos</u> .....	82
• Patrón durante el desarrollo de la flor y del fruto.....	82
• Patrón durante el desarrollo de los óvulos y semillas.....	84
<u>Patrón en órganos vegetativos</u> .....	84
• Patrón en cotiledones y hojas.....	84
• Patrón en la raíz.....	87
<u>Patrón en otras partes de la planta</u> .....	90
<b>2-3-3. Tratamiento con NPA y 2-4D de plantas de la línea pMT5</b> .....	91
<b>2-3-4. Expresión de <i>TOP1</i><sub>pro</sub>::<i>GUS</i> en fondo mutante <i>top1-3 top2-2</i></b> .....	92
<b><u>2-4. Obtención y caracterización de líneas de ganancia de función</u></b> .....	93
<b>2-4-1. Obtención y caracterización de las líneas de ganancia de función inducibles pMT2 y pMT4</b> .....	93
<u>Diseño de las construcciones pMT2 y pMT4 para la expresión inducible de <i>TOP1</i> y <i>TOP2</i> respectivamente y transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> con las mismas</u> .....	93
<u>Descripción del fenotipo sin inducción de las líneas pMT2 y pMT4</u> .....	94
<u>Comprobación de la eficiencia de las construcciones y determinación de la concentración de dexametasona óptima para la inducción de las construcciones</u> .....	95
<u>Determinación del momento óptimo en el desarrollo de las plantas en el que la inducción con dexametasona era más eficaz y estudio de los fenotipos de las líneas pMT2 y pMT4</u> .....	96

• Inducción en distintos estadios de desarrollo y comparación de fenotipos.....	96
<b>2-4-2. Obtención y caracterización de la línea de sobreexpresión pMT17.....</b>	<b>99</b>
<u>Descripción de las alteraciones en el gineceo de <i>pMT17</i>.</u> ....	100
• Estudio de los tipos celulares en el gineceo de <i>pMT17</i> .....	102
• Estudio de la organización interna del gineceo de <i>pMT17</i> .....	103
• Estudio del desarrollo vascular del gineceo de <i>pMT17</i> .....	106
<u>Descripción de las alteraciones en el desarrollo vegetativo de <i>pMT17</i>.</u> .....	106
• Alteraciones en el desarrollo vascular de hojas y cotiledones. ....	106
• Otras alteraciones.....	107
<b>3. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES GENÉTICAS DE <i>TOP1</i> Y <i>TOP2</i> CON OTROS GENES RELACIONADOS.</b> .....	<b>108</b>
<u><b>3-1. Análisis de las interacciones genéticas de los genes <i>TOP</i> con genes implicados en el desarrollo del eje apical- basal del gineceo de <i>Arabidopsis</i>.</b></u> ....	<b>108</b>
<b>3-1-1. Análisis de las interacciones con <i>STYLISH</i>.</b> .....	<b>109</b>
<u>Análisis de los fenotipos mutantes.</u> ....	110
<u>Análisis del patrón de los haces vasculares.</u> ....	112
<u>Análisis de la expresión de las líneas reportadoras <i>STYL<sub>pro</sub>::GUS</i> y <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> en distintos fondos mutantes.</u> ....	115
<b>3-1-2. Análisis de las interacciones con <i>LEUNIG</i>.</b> .....	<b>116</b>
<u>Análisis de los fenotipos mutantes.</u> ....	117
<u>Análisis del patrón de los haces vasculares.</u> ....	118
<u>Análisis de la expresión de la línea reportadora <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> en <i>lug-1</i>.</u> .....	119
<b>3-1-3. Análisis de las interacciones con <i>YUCCA</i>.</b> .....	<b>120</b>
<b>3-1-4. Análisis de las interacciones con <i>SPATULA</i>.</b> .....	<b>121</b>
<u>Análisis de los fenotipos mutantes.</u> ....	121
<u>Análisis del patrón de los haces vasculares.</u> ....	123
<u>Análisis de la expresión de las líneas reportadoras <i>SPT<sub>pro</sub>::GUS</i> y <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> en distintos fondos mutantes.</u> ....	125
<b>3-1-5. Análisis de las interacciones con <i>ETTIN</i>.</b> .....	<b>129</b>

<u>Análisis de los fenotipos mutantes</u> .....	130
<u>Análisis de la expresión de la línea reportadora <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> en el fondo mutante <i>ett-3</i></u> .....	131
<b><u>3-2. Análisis de las interacciones genéticas de los genes <i>TOP</i> con genes implicados en el desarrollo del eje medio-lateral del gineceo de <i>Arabidopsis</i></u></b> .....	132
3-2-1. Análisis de la lignificación del doble mutante <i>top1-3 sty1-1</i> .....	132
3-2-2. Análisis de las interacciones con <i>FRUITFULL</i> .....	135
3-2-3. Análisis de las interacciones con <i>SHATTERPROOF</i> .....	136
3-2-4. Análisis de las interacciones con <i>INDEHISCENT</i> .....	137
3-2-5. Análisis de las interacciones con <i>REPLUMLESS</i> .....	138
<b>4. RASTREO DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN EN LEVADURAS DE cDNA DE <i>Arabidopsis</i> MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO</b> .....	139
<b><u>4-1. Generación de las construcciones cebo <i>pMT22</i> y <i>pMT23</i> y levaduras recombinantes</u></b> .....	140
<b><u>4-2. Rastreo de la genoteca de doble híbrido y obtención de clones positivos</u></b> .....	140
4-2-1. YABBY3.....	142
4-2-2. BRX-L4.....	143
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	147
1. <i>TOP1</i> y <i>TOP2</i> son factores de transcripción con dominio B3.....	147
2. <i>TOP1</i> y <i>TOP2</i> actúan redundantemente en el desarrollo de las regiones apicales del gineceo.....	149
3. La implicación de los genes <i>TOP</i> en el desarrollo del eje apical-basal del gineceo de <i>Arabidopsis</i> .....	152
4. La implicación de los genes <i>TOP</i> en el eje medio- lateral.....	167
5. La implicación de los genes <i>TOP</i> en la polaridad abaxial-adaxial del gineceo..	173
6. La implicación de los genes <i>TOP</i> en el desarrollo de los meristemas. ....	173
7. Los genes <i>TOP</i> como integradores de señales en los distintos ejes a través de las auxinas.....	174
8. Otras posibles funciones de los genes <i>TOP</i> fuera del contexto del desarrollo del gineceo. ....	176
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	181

<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>185</b>
<b>1. MATERIAL BIOLÓGICO.....</b>	<b>185</b>
<b><u>1-1. Material vegetal.</u></b> .....	<b>185</b>
<b>1-1-1. Condiciones de cultivo de plantas.</b> .....	<b>186</b>
<u>1-1-1-1. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> en macetas.</u> .....	<b>186</b>
<u>1-1-1-2. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> en placas de Petri.</u> .....	<b>186</b>
<b><u>1-2. Microorganismos.</u></b> .....	<b>187</b>
<b>1-2-1. Cepas bacterianas.</b> .....	<b>187</b>
<b>1-2-2. Cepas de levadura.</b> .....	<b>187</b>
<b>1-2-3. Condiciones de cultivo de microorganismos.</b> .....	<b>187</b>
<b>1-2-4. Medios de cultivo.</b> .....	<b>188</b>
<b>2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....</b>	<b>188</b>
<b><u>2-1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.</u></b> .....	<b>188</b>
<b>2-1-1. Aislamiento DNA plasmídico.</b> .....	<b>188</b>
<u>2-1-1-1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>.</u> .....	<b>188</b>
<u>2-1-1-2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.</u> .....	<b>189</b>
<b>2-1-2. Aislamiento DNA genómico.</b> .....	<b>189</b>
<u>2-1-2-1. Quick DNA Prep for PCR.</u> .....	<b>189</b>
<u>2-1-2-1. Método de extracción de ácidos nucleicos para genotipado por PCR.</u> .....	<b>189</b>
<b><u>2-2. Extracción, purificación de RNA total y síntesis de cDNA.</u></b> .....	<b>190</b>
<b><u>2-3. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).</u></b> .....	<b>190</b>
<b>2-3-1. PCR tipo para introducir sitios de restricción.</b> .....	<b>190</b>
<b>2-3-2. PCR para realizar genotipados.</b> .....	<b>190</b>
<u>2-3-2-1. Mutantes <i>top</i>.</u> .....	<b>190</b>
<u>2-3-2-2. Otros mutantes.</u> .....	<b>191</b>
2-3-2-2-1. Utilizando dCAPS.....	<b>191</b>
2-3-2-2-2. Métodos ya publicados.....	<b>192</b>
<b>2-3-3. RT-PCR.</b> .....	<b>192</b>
<b><u>2-4. Técnicas de clonación.</u></b> .....	<b>193</b>
<b>2-4-1. Vectores plasmídicos utilizados.</b> .....	<b>193</b>
<b>2-4-2. Digestiones del DNA con enzimas de restricción.</b> .....	<b>194</b>

2-4-3. Extracción de DNA en gel. ....	195
2-4-4. Reacciones de ligación de DNA. ....	195
<b><u>2-5. Transformación de bacterias</u></b> .....	195
2-5-1.Preparación de células competentes y transformación por electroporación.....	195
<b><u>2-6. Secuenciación de DNA.</u></b> ....	196
<b>3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i></b> .....	196
<b><u>3-1.Generación de ribosondas marcadas con digoxigenina.</u></b> .....	196
<b><u>3-2. Cuantificación de las sondas.</u></b> .....	197
<b><u>3-3. Prehibridación e hibridación.</u></b> .....	198
<b><u>3-4. Inmunodetección colorimétrica de la señal.</u></b> .....	198
<b>4.BIOLOGÍA CELULAR/ ANÁLISIS FENOTÍPICO TÉCNICAS DE HISTOLOGÍA VEGETAL.</b> .....	199
<b><u>4-1. Observación y fotografía a bajo aumento.</u></b> .....	199
<b><u>4.2. Técnicas de microscopía.</u></b> ....	199
4-2-1. Microscopía óptica.....	199
4-2-2. Microscopía electrónica de barrido. ....	199
4-2-2-1. Criomicroscopio.....	199
4-2-2-2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) punto crítico.....	200
4-2-2-2-1. Preparación de muestras vegetales; fijación.....	200
4-2-2-2-2. Punto crítico y análisis de las muestras.....	200
<b><u>4-3. Histología.</u></b> .....	200
4-3-1. Inclusión de muestras en parafina.....	200
4-3-2. Inclusión de muestras en resina . ....	201
4-3-3. Obtención de cortes histológicos. ....	201
4-3-4.Tinciones.....	202
4-3-4-1. Tinción con floroglucinol.....	202
4-3-4-2. Tinción con azul de toluidina. ....	202
4-3-4-3.Aclarado con Hidrato de cloral para la observación de los haces vasculares. ....	202
4-3-4-4. Tinción GUS. ....	203
<b>5.TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS Y GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.</b> .....	205

<b><u>5-1. Diseño de la construcción <i>pMT17</i> para la expresión constitutiva de <i>TOP1</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>.</u></b> .....	205
<b><u>5-2. Diseño de las construcciones <i>pMT2</i> y <i>pMT4</i> para la expresión inducible de <i>TOP1</i> Y <i>TOP2</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>.</u></b> .....	205
<b><u>5-3. Diseño de la construcción <i>pMT5</i> para la expresión de <i>TOP1</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>.</u></b> .....	206
<b><u>5-4. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</u></b> .....	206
<b><u>5-5. Realización de cruzamientos.</u></b> .....	207
<b>6. TRATAMIENTOS DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS.</b> .....	207
<b><u>6-1. Tratamiento con dexametasona de las plantas <i>pMT2</i> y <i>pMT4</i>.</u></b> .....	207
<b><u>6-2. Tratamiento con NPA y 2-4D de la línea <i>PMT5</i>.</u></b> .....	208
<b>7. SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO.</b> .....	209
<b><u>7-1. Cepas de levadura</u></b> .....	209
7-1-1. Fenotipos. ....	209
7-1-2. Verificación del fenotipo <i>ade2</i> . ....	210
7-1-3. Genes delatores. ....	210
7-1-4. Ensayo de la expresión del gen <i>HIS3</i> . ....	210
7-1-5. Condiciones de cultivo de levaduras. ....	211
7-1-6. Medios de cultivo. ....	211
7-1-7. Aislamiento de DNA plasmídico de levadura. ....	212
7-1-8. Métodos de transformación de levaduras. ....	213
7-1-8-1. Protocolo rápido: Simple Yeast Transformation. ....	213
7-1-8-2. Transformación de levaduras mediante “Mating”. ....	213
7-1-9. Selección de recombinantes de levadura y eficiencia del “Mating”. ....	214
<b><u>7-2. Plásmidos</u></b> .....	215
<b><u>7-3. Cepas bacterianas</u></b> .....	216
7-3-1. Medios de cultivo. ....	216
<b><u>7-4. Diseño de las construcciones cebo para el sistema del doble híbrido.</u></b> .....	217
7-4-1. Construcción de los plásmidos cebo. ....	217
<b><u>7-5. Ensayo de la actividad de las proteínas codificadas por los genes delatores.</u></b> .....	217
7-5-1. Ensayo de la expresión del gen <i>HIS3</i> . ....	217

7-5-2. Ensayo de activación transcripcional de las proteínas cebo.....	217
7-5-3. Ensayo de la toxicidad de las proteínas cebo. ....	218
<u>7-6. Rastreo de la genoteca de expresión en levaduras de cDNA de Arabidopsis mediante el sistema del doble híbrido.</u> .....	218
<u>7-7. Comprobación de la interacción entre TOP1 y YAB3, TOP1 y BRX-L4, TOP4 y YAB3, TOP4 y BRX-L4.</u> .....	219
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	223
<b>IX. ANEXO 1. CEBADORES</b> .....	241
<b>X. ANEXO II. CONSTRUCCIONES</b> .....	247
<b>ÍNDICE FIGURAS</b> .....	IX
Figura I-1. Representación esquemática de las regiones funcionales del meristemo apical del tallo. ....	3
Figura I-2. Diferentes estadios del desarrollo de <i>Arabidopsis</i> . ....	10
Figura I-3. Ciclo vital de <i>Arabidopsis</i> . ....	11
Figura I-4. Micrografía electrónica de barrido coloreada de una flor de <i>Arabidopsis</i> .....	12
Figura I-5. Micrografía electrónica de barrido del gineceo de <i>Arabidopsis</i> en antesis.....	12
Figura I-6. Micrografía electrónica de barrido del gineceo de <i>Arabidopsis</i> .....	13
Figura I-7. Sección transversal de un fruto de <i>Arabidopsis</i> . ....	14
Figura I-8. Estadios de desarrollo del gineceo de <i>Arabidopsis</i> . ....	16
Figura I-9. Modelo de las interacciones genéticas que dirigen la especificación de las valvas, el margen de valva y el replum.....	22
Figura I-10. Modelo del desarrollo del eje apical-basal del gineceo de <i>Arabidopsis</i> basado en la hipótesis del gradiente de auxinas.....	27
Figura I-11. Fenotipos de varios mutantes afectados en el desarrollo del gineceo. ....	28
Figura I-12. Árbol filogenético de los miembros de la familia B3.....	32
Figura II-1. Fenotipo de la planta <i>top1-1D</i> . ....	39
Figura II-2. Atenuación del fenotipo en el fruto de la líneas <i>top1-1D</i> en las generaciones siguientes. ....	40
Figura II-3. Esquema explicativo de los fenotipos atenuados de los frutos <i>top1-1D</i> .....	40
Figura II-4. Fenotipos vegetativos de la línea <i>top1-1D</i> . ....	41

<b>Figura II-5. Esquema indicando la localización de la inserción del T-DNA del “activation tagging” en la línea <i>top1-1</i></b> .....	42
<b>Figura II-6. Recapitulación del fenotipo de <i>top1-1D</i> mediante la expresión ectópica de <i>TOP1</i></b> .....	42
<b>Figura IV-1. Localización de los genes <i>TOP</i> en los cromosomas de <i>Arabidopsis</i></b> .....	51
<b>Figura IV-2. Esquema de los dominios encontrados en las proteínas TOP</b> .....	51
<b>Figura IV-3. Esquema representativo de las regiones genómicas de <i>TOP1</i> y <i>TOP2</i></b> .....	52
<b>Figura IV-4. Árbol filogenético de la familia RAV</b> .....	53
<b>Figura IV-5. Alineamientos de secuencias proteicas</b> .....	54
<b>Figura IV-6. Esquema de la localización de las inserciones en la secuencia de los genes <i>TOP1</i> y <i>TOP2</i></b> .....	56
<b>Figura IV-7. Localización de las inserciones de T-DNA y del transposón En-1 en la secuencia de nucleótidos de <i>TOP1</i> y <i>TOP2</i></b> .....	58
<b>Figura IV-8. Localización de los cebadores utilizados en las RT-PCRs de los alelos mutantes de <i>TOP1</i>: <i>top1-3</i>, <i>top1-2</i> y <i>top1-4</i>, y de <i>TOP2</i>: <i>top2-1</i> y <i>top2-2</i></b> .....	61
<b>Figura IV-9. Análisis de la expresión de <i>TOP1</i> y <i>TOP2</i></b> .....	61
<b>Figura IV-10. Alineamiento de proteínas</b> .....	62
<b>Figura IV-11. Comparación de los tamaños de los 10 primeros frutos de los mutantes <i>top</i> frente a los del silvestre</b> .....	64
<b>Figura IV-12. Gráfica comparando el número de semillas por fruto y comparación de la morfología de las semillas de los distintos mutantes <i>top</i> frente a Col-0</b> .....	65
<b>Figura IV-13. Fenotipos de la región apical de los frutos de los mutantes <i>top</i></b> .....	67
<b>Figura IV-14. Defectos en la fusión de las regiones apicales del septum de los mutantes <i>top</i></b> .....	68
<b>Figura IV-15. Ontogenia de los carpelos silvestres comparada con los mutantes <i>top</i></b> .....	70
<b>Figura IV-16. Esquema de la zona de dehiscencia de un fruto silvestre</b> .....	71
<b>Figura IV-17. Secciones transversales de frutos teñidos con floroglucinol para la detección de lignina</b> .....	71
<b>Figura IV-18. Sección transversal de un fruto teñido con floroglucinol para la detección de lignina</b> .....	72



<b>Figura IV-19. Haces vasculares en gineceo silvestre en antesis</b> .....	72
<b>Figura IV-20. Haces vasculares en distintos gineceos <i>top</i> en antesis</b> .....	74
<b>Figura IV-21. Esquema del tallo de <i>Arabidopsis</i></b> .....	75
<b>Figura IV-22. Secciones transversales de tallo teñidas con azul de toluidina para la detección de lignina</b> .....	76
<b>Figura IV-23. Esquema de los haces vasculares en los cotiledones de plantas silvestres</b> .....	77
<b>Figura IV-24. Fenotipo de las hojas de roseta de los distintos mutantes <i>top</i></b> .....	78
<b>Figura IV-25. Raíces clareadas con hidrato de cloral y un esquema de las zonas de la raíz</b> .....	79
<b>Figura IV-26. Localización del mRNA de <i>TOP1</i> (A) y <i>TOP2</i> (B) mediante hibridación <i>in situ</i></b> .....	81
<b>Figura IV-27. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> durante el desarrollo de la flor y del fruto</b> .....	82
<b>Figura IV-28. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> durante el desarrollo de los óvulos y las semillas</b> .....	85
<b>Figura IV-29. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> en cotiledones</b> .....	86
<b>Figura IV-30. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> en cotiledones y en hojas</b> .....	87
<b>Figura IV-31. Esquemas de la raíz de <i>Arabidopsis</i></b> .....	88
<b>Figura IV-32. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> durante el desarrollo de la raíz</b> .....	88
<b>Figura IV-33. Esquema comparativo de la distribución de la auxinas y sus transportadores en la raíz de <i>Arabidopsis</i></b> .....	90
<b>Figura IV-34. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> en otras partes de la planta</b> .....	90
<b>Figura IV-35. Tratamientos de las plantas <i>pMT5</i> con auxinas (2-4D) y con inhibidores del transporte polar de las mismas (NPA)</b> .....	91
<b>Figura IV-36. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> en <i>top1-3 top2-2</i></b> .....	92
<b>Figura IV-37. Fenotipo de los frutos <i>pMT2</i> sin inducir con dexametasona</b> .....	94
<b>Figura IV-38. Fenotipo de los frutos <i>pMT4</i> sin inducir con dexametasona</b> .....	95
<b>Figura IV-39. Fenotipo de las hojas de roseta de plantas <i>pMT2</i> crecidas en distintas concentraciones de dexametasona</b> .....	96
<b>Figura IV-40. Comparación del fenotipo del fruto en la línea <i>pMT14-4</i> al tratar o no con dexametasona</b> .....	98
<b>Figura IV-41. Fenotipo de las hojas de roseta de las plantas <i>pMT17</i></b> .....	99

<b>Figura IV-42. Comparación de los tamaños de los 10 primeros frutos de las líneas <i>pMT17</i> frente a los del silvestre .....</b>	<b>100</b>
<b>Figura IV-43. Comparación de fenotipos de la plantas <i>pMT17-1</i> heterocigóticas y homocigóticas .....</b>	<b>101</b>
<b>Figura IV-44. Comparación del tamaño del estilo.....</b>	<b>102</b>
<b>Figura IV-45. Estudio de los tipos celulares del gineceo de <i>pMT17</i> .....</b>	<b>104</b>
<b>Figura IV-46. Patrón de lignificación de <i>pMT17</i> .....</b>	<b>105</b>
<b>Figura IV-47. Patrón de los haces vasculares en el gineceo de <i>pMT17</i>.....</b>	<b>107</b>
<b>Figura IV-48. Alteraciones en el patrón vascular en cotiledones.....</b>	<b>107</b>
<b>Figura IV-49. Otras alteraciones de las plantas <i>pMT17</i>.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura IV-50. Comparación <i>STY-TOP</i> .....</b>	<b>111</b>
<b>Figura IV-51. Defectos en la fusión del septum y de fertilidad.....</b>	<b>112</b>
<b>Figura IV-52. Alteraciones en las regiones apicales del gineceo de las distintas combinaciones de mutantes <i>top</i> y <i>sty</i> .....</b>	<b>113</b>
<b>Figura IV-53. Comparación de los tamaños de los 10 primeros frutos de los mutantes <i>top</i> frente a los <i>sty</i> y las distintas combinaciones <i>top sty</i> .....</b>	<b>114</b>
<b>Figura IV-54. Comparación del patrón de los haces vasculares de las distintas combinaciones mutantes <i>top sty</i> .....</b>	<b>114</b>
<b>Figura IV-55. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub> ::GUS</i> en distintos fondos mutantes <i>sty</i> .....</b>	<b>115</b>
<b>Figura IV-56. Patrón de expresión de <i>STY1<sub>pro</sub>::GUS</i> en distintos fondos mutantes <i>top</i> .....</b>	<b>116</b>
<b>Figura IV-57. Comparativa de los tamaños de los 10 primeros frutos de los mutantes <i>lug-1</i> y <i>top1-3 top2-2 lug-1</i> .....</b>	<b>117</b>
<b>Figura IV-58. Alteraciones en el gineceo de los mutantes <i>top lug</i> en comparación con las de <i>lug</i>.....</b>	<b>118</b>
<b>Figura IV-59. Comparación del patrón de los haces vasculares del mutante <i>lug</i> frente a <i>top1-3 top2-2 lug-1</i> .....</b>	<b>119</b>
<b>Figura IV-60. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub> ::GUS</i> en el fondo mutante <i>lug-1</i> .....</b>	<b>119</b>
<b>Figura IV-61. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub> ::GUS</i> en <i>35S::YUC1</i> .....</b>	<b>121</b>
<b>Figura IV-62. Alteraciones de las regiones apicales del gineceo de mutantes <i>top spt</i>.....</b>	<b>122</b>
<b>Figura IV-63. Comparación del tamaño de los 10 primeros frutos .....</b>	<b>123</b>

<b>Figura IV-64. Aspecto del septum tras la dehiscencia de las valvas en frutos .....</b>	<b>123</b>
<b>Figura IV-65. Alteraciones en los haces vasculares de los mutantes <i>top spt</i> .....</b>	<b>124</b>
<b>Figura IV-66. Patrón de expresión de <i>SPT</i> .....</b>	<b>126</b>
<b>Figura IV-67. Patrón de expresión de <i>SPT<sub>pro</sub>::GUS</i> en fondo silvestre y en fondo <i>top1-3</i> .....</b>	<b>127</b>
<b>Figura IV-68. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> en fondo silvestre, en fondo <i>spt-2</i> y en fondo <i>35S::SPT</i> .....</b>	<b>128</b>
<b>Figura IV-69. Fenotipo de dos plántulas <i>35S::TOP1 35S::SPT</i> .....</b>	<b>129</b>
<b>Figura IV-70. Alteraciones del gineceo del triple mutante <i>top1-3 top2-2 ett-3</i> .....</b>	<b>130</b>
<b>Figura IV-71. Patrón de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> en fondo <i>ett-3</i> .....</b>	<b>131</b>
<b>Figura IV-72. Secciones transversales de frutos teñidos con floroglucinol para la detección de lignina .....</b>	<b>133</b>
<b>Figura IV-73. Esquema de las posibles interacciones genéticas de los genes <i>TOP</i> y los genes que intervienen en el establecimiento del eje medio-lateral del fruto .....</b>	<b>134</b>
<b>Figura IV-74. Alteraciones del doble mutante <i>top1-3 ful-2</i> .....</b>	<b>135</b>
<b>Figura IV-75. Alteraciones del triple mutante <i>top1-3 shp1 shp2</i> .....</b>	<b>137</b>
<b>Figura IV-76. Patrón de expresión de <i>INDpro::GUS</i> en distintos fondos genéticos .....</b>	<b>137</b>
<b>Figura IV-77. Alteraciones del doble mutante <i>top1-3 rpl-1</i> .....</b>	<b>138</b>
<b>Figura IV-78. Confirmación de las interacciones proteína-proteína de TOP1 y TOP4 con YAB3 y BRX-L4 .....</b>	<b>142</b>
<b>Figura IV-79. <i>YAB3</i> y los genes <i>TOP</i> .....</b>	<b>143</b>
<b>Figura IV-80. Comparación de los patrones de expresión de <i>TOP1<sub>pro</sub>::GUS</i> y <i>BRX<sub>pro</sub>::GUS</i> .....</b>	<b>144</b>
<b>Figura V-1. Esporocarpos de <i>Marchantia polymorpha</i> .....</b>	<b>147</b>
<b>Figura V-2. Distintas posibilidades de interacción genética entre <i>TOP</i> y <i>STY</i> .....</b>	<b>153</b>
<b>Figura V-3. Secuencias promotoras de <i>YUC2</i> y <i>YUC4</i> .....</b>	<b>154</b>
<b>Figura V-4. Secuencia promotora de <i>TOP1</i> .....</b>	<b>156</b>
<b>Figura V-5. Distintas posibilidades de interacción genética entre <i>TOP</i> y <i>LUG</i> .....</b>	<b>157</b>
<b>Figura V-6. <i>STY</i> y <i>TOP</i> podrían convergen en el desarrollo de las regiones apicales del gineceo de <i>Arabidopsis</i> .....</b>	<b>158</b>
<b>Figura V-7. Esquema representativo de las alteraciones en las regiones mediales y laterales del gineceo en los mutantes <i>top</i> y <i>sty</i> y en las líneas de sobreexpresión de <i>TOP1</i> y <i>STY1</i> .....</b>	<b>159</b>

Figura V-8. Esquema de la posible convergencia de las actividades TOP, STY y SPT.....	159
Figura V-9. Distintos patrones de expresión en <i>ett</i> .....	164
Figura V-10. Esquema de la posible convergencia de las actividades TOP, STY y SPT en el desarrollo de las regiones apicales del gineceo de <i>Arabidopsis</i> .....	165
Figura V-11. Alteraciones en el gineceo de distintos mutantes y combinaciones mutantes.....	165
Figura V-12. Modelo del desarrollo del eje apical-basal del gineceo de <i>Arabidopsis</i> basado en la hipótesis del gradiente de auxinas de Nemhauser.....	167
Figura V-13. Esquema de los posibles gradientes locales de auxinas que de podrían formar durante el proceso de dehiscencia.....	169
Figura V-14. Modelo de las interacciones genéticas que dirigen la especificación de las valvas, el margen de valva y el replum según Dinneny.....	170
Figura V-15. Esquema de las posibles interacciones genéticas de los genes <i>TOP</i> y los genes que intervienen en el establecimiento del eje medio-lateral del fruto.....	170
Figura V-16. Interpretación de los fenotipos <i>top</i> , <i>ett</i> , <i>spt</i> y <i>35S::TOP</i> según el posible modelo propuesto por Nemhauser <i>et al</i> (2000) de gradientes de auxinas.....	175
Figura V-17. Esquema propuesto por Mouchel <i>et al</i> (2006) para la retroalimentación entre la biosíntesis de brasinoesteroides y la señal de auxinas a través de <i>BRX</i> en el crecimiento de la raíz.....	177
Figura VII-1. Cuantificación simultánea de varias ribosondas.....	197
ÍNDICE TABLAS.....	XIV
Tabla I-1. Etapas del desarrollo floral en <i>Arabidopsis</i> ,.....	15
Tabla I-2. Principales genes que participan en el desarrollo del gineceo.....	30
Tabla IV-1. Proteínas que interactúan con TOP1 y TOP4.....	141
Tabla VII-1. Genotipos, ecotipos y procedencia de las plantas de <i>Arabidopsis</i> utilizadas en este trabajo.....	185
Tabla VII-2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.....	187
Tabla VII-3. Antibióticos, herbicidas y sus concentraciones utilizadas.....	188
Tabla VII-4. Condiciones de PCR utilizadas para genotipar los mutantes <i>top</i> , así como los tamaños de las bandas esperadas en gel.....	190
Tabla VII-5. Condiciones de PCR utilizadas para genotipar otros mutantes por dCAPS.....	191

---

<b>Tabla VII-6. Otras referencias utilizadas para genotipar mutantes .....</b>	<b>192</b>
<b>Tabla VII-7. Programa de PCR utilizado en la RT-PCR.....</b>	<b>193</b>
<b>Tabla VII-8. Plásmidos utilizados en esta tesis.....</b>	<b>194</b>
<b>Tabla VII-9. Disolución GUS.....</b>	<b>204</b>
<b>Tabla VII-10. Concentraciones de dexametasona .....</b>	<b>208</b>
<b>Tabla VII-11. Cepas de levadura utilizadas en este trabajo .....</b>	<b>209</b>
<b>Tabla VII-12. Crecimiento de las distintas cepas de levadura en medios sintéticos de diferente composición.....</b>	<b>210</b>
<b>Tabla VII-13. Disolución 10X Dropout .....</b>	<b>212</b>
<b>Tabla VII-14. Plásmidos utilizados en experimentos de doble híbrido .....</b>	<b>215</b>
<b>Tabla VII-15. Cepa bacteriana utilizada en el experimento de doble híbrido .....</b>	<b>216</b>



**ABREVIATURAS**

3-AT: 3-amino-1,2,4-triazol	DEPC: dietilpirocarbonato
6-BAP :6-bencil-aminopurina	DL: día largo
%: por ciento	DMF: N,N-dimetilformamida
°C: grados centígrados	DMSO: dimetil sulfóxido
μF: microfaradios	DNA: ácido desoxirribonucleico
μg: microgramos	DNA-BD: dominio de unión a DNA del factor transcripcional GAL4
μJ: microjulios	DNasa: desoxirribonucleasa
μl: microlitros	dNTP: desoxinucleósidos trifosfato
μM: micromolar	dag: días postgerminación
Ω: ohmios	DIG: digoxigenina
A: adenina	dpa: días postantesis
aa: aminoácidos	Ed. o ed.: edición
AD: dominio de activación del factor transcripcional GAL4	Eds. o eds: editores
Amp: ampicilina	EDTA: etilen-diamino-tetraacetato sódico
Amp <sup>r</sup> : resistencia a ampicilina	EMS: etilmetanosulfonato
<i>Arabidopsis</i> : <i>Arabidopsis thaliana</i>	EST: “expressed sequence tags”
BAC: cromosoma artificial de bacteria	<i>et al.</i> : y otros
Basta: glufosinato de amonio	Fig.: figura
C: citosina	g: gramos
CaMV 35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor	G: guanina
cDNA: DNA complementario	h: horas
cm: centímetros	His: histidina
cM: centimorgans	IAA: ácido indolacético
Col-0: ecotipo Columbia	Kan : kanamicina
Cont.: continuación	Kan <sup>R</sup> o Kan <sup>R</sup> : resistencia a kanamicina
C-terminal: carboxilo terminal	kb: kilobases
DC: día corto	kg: kilogramos

## ABREVIATURAS

---

lacZ: $\beta$ -galactosidasa	p. ej. : por ejemplo
LB: medio Luria-Bertani	pM: picomolar
Ler: ecotipo Landsberg, portador de la mutación <i>erecta</i>	pp: páginas
leu: leucina	RNA: ácido ribonucleico
LiAC: acetato de Litio	RNA poli(A) <sup>+</sup> : RNA mensajero poliadenilado
lx: luxes	RNasa: ribonucleasa
m/v: masa por volumen	rNTPs: ribonucleósidos trifosfato
m: metros	rpm: revoluciones por minuto
M: molar	RT-PCR: retrotranscripción y PCR semicuantitativa
Mb: megabases	SD: medio mínimo sintético
mbar: milibares	SDS: n-dodecil sulfato sódico
MES: ácido 4-morfolino-etano-sulfónico	seg: segundos
mg: miligramos	SEM: microscopía electrónica de barrido (“Scanning Electron Microscopy”)
min: minutos	ssDNA: DNA de cadena simple
ml: mililitros	T: timidina
mm: milímetros	TAE: Tris-acético-EDTA
mM: milimolar	TBE: Tris-borato-EDTA
mRNA: RNA mensajero	TE: Tris-EDTA
MS: medio de Murashige y Skoog (incluyendo vitaminas)	Tet <sup>r</sup> : resistencia a tetraciclina
N: normal	tRNA: RNA de transferencia
ng: nanogramos	Trp: triptófano
nM: nanomolar	U: unidades
DO: densidad óptica	UTP: uridina trifosfato
pág.: página	UV: ultravioleta
Pa: pascales	v/v: volumen por volumen
pb: pares de bases	V: voltios
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	W: vatios
PEG: polietilen glicol	WT: silvestre
	X- $\alpha$ -Gal o X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónico



## **I. INTRODUCCIÓN**

---



El desarrollo puede definirse esencialmente como la formación de estructuras organizadas a partir de un grupo de células inicialmente muy simple (Wolpert, 2002). Implica procesos de diferenciación (generación de diversidad celular), morfogénesis (organización espacial de las células en tejidos y órganos), crecimiento (aumento de tamaño del organismo) y reproducción (producción de gametos). Estos fenómenos ocurren de forma coordinada y están sometidos en último término a un estrecho control genético para dar lugar a niveles de organización sucesivamente más complejos, desde el establecimiento de los ejes principales del embrión hasta la formación de órganos muy especializados en la posición precisa y en el momento adecuado. Pese a la enorme diversidad existente entre los seres vivos, muchos de los mecanismos que intervienen en el desarrollo son comunes a todos o a grandes grupos de ellos. Esto permite que los conocimientos adquiridos a partir de la investigación en unos pocos organismos modelo puedan extrapolarse a procesos similares que ocurren en otras especies aparentemente muy alejadas. En la actualidad los mayores esfuerzos en este campo se centran en la identificación y caracterización de las funciones génicas que subyacen a los distintos procesos del desarrollo.

### **1. EL DESARROLLO VEGETAL.**

Aunque los estudios en Biología del Desarrollo se han relacionado históricamente al reino animal, el desarrollo vegetal ha ido despertando un interés creciente debido, en parte, a las aplicaciones biotecnológicas que pueden derivarse de su mejor conocimiento.

Debido a que las plantas son organismos sésiles, su desarrollo es extremadamente plástico, característica que les confiere una gran versatilidad adaptativa frente a las condiciones cambiantes del ambiente. Sus patrones de crecimiento se ven profundamente influenciados por señales exógenas como la luz y la gravedad, información que se integra con los programas endógenos del desarrollo (Leyser, 2003). Otro reflejo, y a la vez causa, de esta plasticidad es la totipotencia que presentan casi todas las células vegetales, siendo capaces de desdiferenciarse y regenerar una planta completa si se someten a los estímulos hormonales adecuados (Lyndon, 1990).

La estructura de las plantas es relativamente simple, con unos 40 tipos celulares diferentes frente a los más de 100 que pueden aparecer en los tejidos animales. Las células vegetales están rodeadas por una pared celular rígida formada por polisacáridos y proteínas que impide las migraciones celulares. Sin embargo, la pared celular no aísla a las células de su entorno, ya que es permeable a moléculas pequeñas, incluso a algunas fitohormonas; y además, existen canales intercelulares llamados plasmodesmos que permiten el paso de otras mayores (Leyser, 2003). Esta comunicación intercelular es crítica durante el desarrollo vegetal ya que, en general, el destino celular está determinado por la posición que ocupan las células y no por su linaje, por lo que deben

ser capaces de recibir información precisa acerca de su posición espacial y las características de su entorno.

Por otra parte, el desarrollo vegetal es fundamentalmente postembrionario. En el embrión se establece un esbozo básico del plan corporal de la planta, pero los órganos que aparecen en el adulto se desarrollan a lo largo de su ciclo vital de forma continua e iterativa a partir de los meristemos (Lyndon, 1990). Los meristemos contienen células que se mantienen en estado indiferenciado (células madre o *stem cells*) y se dividen durante toda la vida del individuo, produciendo nuevas células que pueden diferenciarse para dar lugar a las distintas estructuras de la planta en las posiciones adecuadas. Son por tanto estructuras clave en el desarrollo, ya que van a generar todos los órganos, determinando la morfología final de éstos y la arquitectura general de la planta (Bowman, 1994).

### **1-1. Formación del fruto a partir del meristemo.**

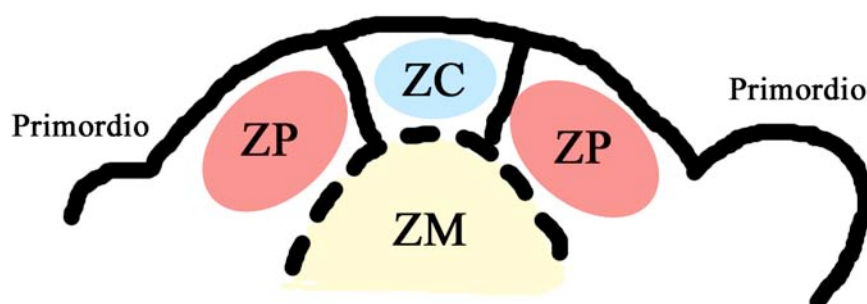
Este apartado pretende resumir los procesos mediante los cuales el gineceo, un órgano altamente especializado, se determina a partir de un meristemo que contiene células en estado indiferenciado.

Durante la embriogénesis se establecen los dos meristemos principales que van a generar el eje apical-basal de la planta: el meristemo apical del tallo (*Shoot Apical Meristem* o *SAM*), que dará lugar a las partes aéreas de la planta, y el meristemo apical de la raíz (*Root Apical Meristem* o *RAM*), que originará las raíces (Lyndon, 1990).

En el *SAM* se pueden distinguir tres dominios funcionales: la zona central, formada por células indiferenciadas y totipotentes; la zona periférica, a partir de la cual se forman los primordios de los distintos órganos; y la zona medular, que dará lugar al tallo en crecimiento (Fletcher, 2002). La zona periférica recibe un aporte constante de células procedentes de la zona central, y puede considerarse una región de transición en la que la totipotencia de las células comienza a restringirse. Es necesaria una continua comunicación entre las células vecinas de las distintas zonas para que las divisiones celulares se produzcan de forma coordinada y se mantenga una población constante de células indiferenciadas (Fig. I-1; (Fletcher, 2000).

Tras la germinación de la semilla y la emergencia de la plántula, se pueden distinguir dos fases durante el desarrollo de las partes aéreas: la vegetativa y la reproductiva. Durante el desarrollo vegetativo el *SAM* produce hojas y meristemos axilares asociados, que se distribuyen formando un patrón radial característico para cada especie y que recibe el nombre de filotaxis. Posteriormente la integración de señales ambientales como la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes, junto con señales endógenas como el incremento de la producción de algunas hormonas, fundamentalmente giberelinas, dispara la transición a la fase reproductiva (Chuck y Hake, 2005). A partir de este momento, el *SAM* se convierte en meristemo de

inflorescencia y los meristemos laterales dan lugar a meristemos florales, a partir de los cuales se desarrollan las flores.



**Fig. I-1. Representación esquemática de las regiones funcionales del meristemo apical del tallo.** ZC: zona central; ZP: zona periférica; ZM: zona medular. Tomado de Fletcher y Meyerowitz (2000), con modificaciones.

Los meristemos florales son estructuralmente muy similares al *SAM*, pero se diferencian de éste en dos aspectos fundamentales. Por un lado, los órganos que se producen a partir del meristemo floral se organizan generalmente en varios verticilos concéntricos. Además, mientras que la actividad del *SAM* es indeterminada en muchas especies y puede producir un número indefinido de órganos, la actividad del meristemo floral es determinada y deja de generar nuevas estructuras cuando se ha completado la formación de todos los órganos florales (Steeves y Sussex, 1989).

El fruto se desarrolla a partir del gineceo, el cuarto verticilo de la flor, (y en ocasiones incorpora también otros tejidos u órganos de la flor) en un proceso denominado fructificación, que se inicia con la fertilización de las semillas. Durante la fructificación se produce un aumento general de tamaño y la diferenciación de nuevas estructuras. Este crecimiento se alcanza mediante una fase inicial de divisiones celulares y la posterior expansión de las células. El desarrollo del fruto y la formación de las semillas son procesos coordinados que se inician cuando llegan al ovario una serie de señales desencadenadas por la polinización del gineceo y la posterior fertilización de los óvulos, como el aumento localizado de los niveles de auxinas y giberelinas (Gillaspy *et al.*, 1993) (Vivian-Smith y Koltunow, 1999). De hecho, es posible promover la fructificación mediante la aplicación exógena de estas hormonas. Sin estos estímulos el gineceo entra en fase de senescencia y degenera (García-Martínez, 1980) (Vercher, 1991), aunque existen excepciones como las plantas que producen frutos partenocárpicos, en las que los procesos de fertilización y fructificación están desacoplados de forma que son capaces de producir frutos sin semillas en ausencia de fertilización.

## 2. FACTORES HORMONALES QUE CONTROLAN EL DESARROLLO VEGETAL.

### 2-1. Hormonas vegetales.

Desde el descubrimiento de las primeras hormonas vegetales, se han atribuido muchas funciones a estos compuestos en la regulación fisiológica, las respuestas a estrés y el desarrollo de las plantas. Una de las diferencias principales frente a las hormonas animales es que, a diferencia de éstas, las hormonas vegetales no se sintetizan en un órgano particular y especializado y de ahí se transportan hacia los órganos de destino. Al contrario, en general todos los tejidos de las plantas son capaces de sintetizar hormonas y la mayoría de veces éstas actúan en las mismas células en las que se producen (Bishopp *et al.*, 2006).

Las hormonas vegetales también se denominan reguladores vegetales del crecimiento destacando que su función no se restringe sólo a determinados procesos fisiológicos. Por ejemplo, las auxinas aumentan el número de divisiones celulares; las giberelinas y los brasinoesteroides promueven la expansión celular; el ácido abscísico induce la dormancia; y el etileno es necesario para la maduración de los frutos frescos (Alabadí, 2008). Sin embargo, cada vez está más claro que las hormonas vegetales actúan en muchos casos como señales “instructivas” en el desarrollo de las plantas proporcionando por ejemplo, la información básica para decidir entre varios programas de desarrollo o en el establecimiento de dominios de identidad dentro en un tejido determinado (Alabadí, 2008).

A continuación se describen las características principales de algunos grupos representativos de fitohormonas. Se ha destacado el papel de las auxinas ya que tienen un papel instructivo fundamental durante los procesos de morfogénesis en las plantas y en concreto en la organización del gineceo.

#### **2-1-1. Las Auxinas.**

La más importante es el ácido indolacético (IAA). Se sintetizan principalmente en los primordios de las hojas, en las hojas jóvenes y en las semillas en desarrollo, y son transportadas hasta la raíz.

Las auxinas se han implicado en numerosos y diversos procesos de desarrollo en las plantas por lo que el acrónimo de la auxina IAA (Indole-3-Acetic Acid) podría servir también para “Influences Almost Anything” (Weijers y Jurgens, 2004). Entre dichos procesos se encuentran; el desarrollo del embrión (embriogénesis), siendo las auxinas importantes en la especificación de las células apicales del mismo, la iniciación de la raíz y la formación de los cotiledones (Friml, 2003); el desarrollo del patrón de la raíz, siendo un regulador principal en el desarrollo de las raíces laterales (Casimiro *et al.*, 2001); el desarrollo del patrón del tallo y los procesos de crecimiento; los procesos de organogénesis como la aparición de nuevas hojas, flores, órganos florales y raíces

laterales; y las respuestas direccionales de crecimiento, (revisado en (Michniewicz, 2007)). Las auxinas también están implicadas en el mantenimiento de la dominancia apical ya que la síntesis de auxinas desde el *SAM* inhibe la formación de meristemos laterales (Davies, 2004). Además, estas hormonas juegan un papel muy importante en la formación de los haces vasculares de los distintos órganos de la planta, como por ejemplo de los cotiledones y las hojas (Mattsson *et al.*, 1999) (Sieburth, 1999) (Turner, 2003), revisado por (Berleth *et al.*, 2000).

Las auxinas son necesarias para la iniciación del primordio floral. La interrupción de la biosíntesis de auxinas, de su transporte polar o de las vías de señalización mediadas por las mismas provoca que no se formen flores, mientras que su aplicación local es suficiente para desencadenar la formación de una flor en el ápice del tallo o una nueva hoja (Reinhardt *et al.*, 2000). Además, las auxinas juegan un papel esencial en la especificación del número e identidad de los órganos florales (Cheng *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007a; Cheng *et al.*, 2007b). Estas fitohormonas también tienen una función determinante en el establecimiento del eje apical-basal del fruto así como, en el desarrollo de las estructuras que conforman el mismo (estilo, estigma y ovario) (Dinny *et al.*, 2005) (Nemhauser *et al.*, 2000), e inducen la fructificación y estimulan el crecimiento del fruto (Davies, 2004).

La distribución de las auxinas en las plantas se produce a través de dos tipos de transporte distintos, un transporte rápido (no polar) a través del floema y un transporte polar (PAT, Polar Auxin Transport), más lento (célula-célula), en varios tejidos. El PAT ocurre principalmente a través de los transportadores polares de entrada de auxinas pertenecientes a la familia AUX1, y a los transportadores de salida pertenecientes a la familia PIN (Bennett *et al.*, 1996) (Gälweiler *et al.*, 1998) (Luschnig *et al.*, 1998). El PAT es necesario para la formación y el mantenimiento de gradientes locales de distribución de auxinas, muy importantes en procesos de organogénesis, desarrollo de patrones y respuestas diferenciales de crecimiento de las plantas (revisado en (Tanaka *et al.*, 2006). Por ejemplo, en las raíces las auxinas se acumulan debido a su transporte polar en las células fundadoras de los primordios laterales de la raíz, aunque todavía no se conoce la regulación exacta de estos eventos (Benkova *et al.*, 2003). Cuando el primordio comienza a formarse, la localización polar de *PIN1* cambia, generando una nueva dirección de flujo auxínico que definirá el crecimiento axial del órgano en desarrollo. La creación y mantenimiento del gradiente de auxinas con su máximo en el extremo distal del nuevo órgano es crucial para el correcto crecimiento del primordio (Benkova *et al.*, 2003). En las raíces laterales, el transporte de auxinas hacia el extremo distal de las mismas se dirige a través de las células internas y luego se distribuye hacia las capas celulares externas a través de la superficie del primordio (Benkova *et al.*, 2003). En cambio, en los órganos aéreos, las auxinas se transportan a través de las capas

externas hacia el extremo de los primordios en desarrollo y después hacia la parte interior del órgano (Benkova *et al.*, 2003).

Los inhibidores del PAT se han utilizado durante décadas para interferir en el flujo polar de auxinas, compitiendo directamente con las auxinas en la unión con sus transportadores, o provocando que las células sean incapaces de transportarlas. La aplicación de dichos inhibidores resulta en la acumulación de las auxinas cerca de la fuente de las mismas y su disminución en las células localizadas a cierta distancia (Nemhauser *et al.*, 2000).

### **2-1-2. Otras hormonas vegetales.**

#### **• Las Giberelinas.**

Las giberelinas son un grupo de diterpenos que se sintetizan en tejidos jóvenes del tallo y en las semillas en desarrollo (Davies, 2004). Están involucradas en el crecimiento del tallo a través del estímulo de la división y el crecimiento celular, así como en la inducción de la germinación de las semillas. Al igual que las auxinas participan en la iniciación de la fructificación y el crecimiento del fruto. Existe una comunicación entre las vías de señales de ambas hormonas, y se ha demostrado que las giberelinas pueden afectar a la biosíntesis y al transporte de las auxinas (Ogawa *et al.*, 2003). Sin embargo, al contrario que las auxinas, que parecen tener un papel crítico en el desarrollo del patrón temprano del gineceo, las giberelinas parece que tienen un papel más tardío durante la elongación del fruto tras la fertilización (Vivian-Smith y Koltunow, 1999).

#### **• Las Citoquininas.**

La mayoría de las citoquininas son derivados de bases púricas que se sintetizan en el ápice de la raíz y en las semillas en desarrollo. Estimulan la división celular en presencia de auxinas, y promueven la iniciación del tallo, el crecimiento de meristemas laterales y la expansión de las hojas mediante el aumento del tamaño celular. También inducen la fructificación, aunque en menor medida que las auxinas y las giberelinas (Kieber, 2002) (Mok y Mok, 2001) (Davies, 2004).

#### **• El Etileno.**

El etileno es un gas que se sintetiza en casi todos los tejidos en respuesta a situaciones de estrés, estimulando distintos mecanismos defensivos y alterando el crecimiento de la planta. Interviene también en la maduración del fruto (en frutos climatéricos como el tomate, el aguacate, la manzana y el plátano) y en la abscisión de las hojas y de los órganos florales (Davies, 2004) (White, 2002). También juega un papel, aunque minoritario, en la dehiscencia del fruto (Ferrándiz, 2002).

#### **• Los Brasinoesteroides.**

Los brasinoesteroides han sido las últimas fitohormonas identificadas. Estructuralmente son las hormonas más parecidas a las hormonas esteroides de los animales. Regulan la expresión de numerosos genes, contribuyendo a la regulación de la



división celular y a la diferenciación, y ayudando en el control de todos los programas de desarrollo que permitirán la morfogénesis. También regulan procesos específicos como la fotomorfogénesis, la escotomorfogénesis y la expansión celular en presencia de una pared celular potencialmente limitadora del crecimiento (Clouse, 2002). Diversos estudios han puesto de manifiesto la relación sinérgica entre las auxinas y los brasinoesteroides, revisado en (Hardtke, 2007; Hardtke *et al.*, 2007).

### **3- EL DESARROLLO FLORAL. LAS FLORES COMO ÉXITO EVOLUTIVO.**

En las Gimnospermas, el grupo más antiguo de plantas con semillas, los óvulos se presentan la mayoría de las veces como estructuras desnudas que se desarrollan en las axilas de órganos como las hojas. Por el contrario, en las más recientemente evolucionadas plantas con flores o Angiospermas, los óvulos se encuentran encerrados y protegidos por un órgano femenino especializado denominado carpelo. El término Angiosperma deriva del griego y significa semillas encerradas en un barco (*angion*, barco y *sperma*, semilla). Aparte de proteger a los óvulos, el carpelo confiere muchas ventajas a las plantas con flores. Los tejidos estigmáticos que se encuentran en el ápice del carpelo se han adaptado en diferentes especies para capturar eficientemente el polen transportado por los distintos vectores, incluyendo insectos, mamíferos, aves y el viento. Además, el carpelo es el soporte de los mecanismos selectivos que operan sobre el polen, como la auto-incompatibilidad que promueve la variabilidad genética en las nuevas generaciones. Tras la polinización, los tejidos del carpelo sufren una serie de cambios para convertirse en un fruto, que protege a las semillas y posteriormente contribuye a la diseminación de las mismas, mediante una gran variedad de mecanismos especializados en las diferentes especies. Por todas estas razones, el carpelo es sin duda, uno de los principales factores en el éxito evolutivo de las Angiospermas, que se refleja en las aproximadamente 300 000 especies descritas que viven en la actualidad (Scutt *et al.*, 2006).

#### **3-1.El carpelo como hoja modificada.**

La hipótesis propuesta por Goethe en 1790, en la que los órganos florales eran hojas modificadas, ha sido demostrada ampliamente durante las últimas dos décadas. Una de las evidencias que apoyan esta hipótesis es la completa transformación de los órganos florales en hojas en el cuádruple mutante *sepallata1 (sep1) sep2 sep3 sep4* (Ditta *et al.*, 2004) o la conversión ectópica de las hojas vegetativas en órganos florales mediante la expresión de los genes *SEP* y los genes florales homeóticos (Honma y Goto, 2001) (Pelaz *et al.*, 2001). Sin embargo, todavía no está claro a partir de que hojas modificadas derivan los carpelos, aunque diversas hipótesis apuntan hacia los esporófilos, es decir, las hojas portadoras de gametofitos (Scutt *et al.*, 2006).

### 4. EL DESARROLLO DEL FRUTO.

La diversidad morfológica de las flores se relaciona consecuentemente con la gran diversidad morfológica de los frutos. Una función muy importante de los frutos es la dispersión de las semillas que tienen en su interior, para garantizar la continuación de la especie (Lohmann y Weigel, 2004).

Existe un gran rango de texturas en los frutos, que van desde los frutos blandos y frescos, hasta los secos y duros en función de su estrategia de dispersión. Los frutos frescos normalmente son dulces, con colores brillantes y generalmente están adaptados para ser ingeridos por vertebrados que llevarán las semillas a una nueva localización antes de depositarlos en una pila de fertilizante. Por contra, el viento, el agua y la fuerza generada por la apertura de los frutos contribuye comúnmente a la distribución de las semillas de los frutos secos. Aunque por supuesto existen muchas excepciones, como los frutos secos con pinchos que se adhieren al pelo de los animales que pasan cerca para depositarse en otras localizaciones. Los frutos secos se clasifican en dehiscentes (del latín *dehiscere*, abrirse), en los que las paredes del ovario se abren para dispersar las semillas al medio; e indehiscentes, en los que las semillas se mantienen encerradas dentro del fruto y éste se separa de la planta. Muchos de los cultivos importantes como el guisante, las judías, lentejas, soja y la colza desarrollan frutos dehiscentes.

Tanto las cosechas de frutos frescos como las de frutos secos dehiscentes son de gran importancia agronómica, lo que ha propulsado que en los últimos años se haya incrementado la investigación en torno a los mismos. Comprender el proceso de dehiscencia no sólo es importante a nivel académico, ya que supone entender el origen del desarrollo de patrones complejos, como por ejemplo, los mecanismos mediante los que se especializan los distintos tipos celulares para llevar a cabo distintas funciones (Liljegren *et al.*, 2004). Si no también porque el proceso de apertura del fruto tiene una considerable importancia agronómica como en el caso de distintas leguminosas como la soja y algunas especies relacionadas con *Arabidopsis* como la colza. Por ejemplo, no es deseable que los frutos de las especies cultivadas se abran precozmente, pero una vez cosechados debe ser fácil separar las semillas (Lohmann y Weigel, 2004). Cada año los agricultores de colza pierden un 20% de la cosecha cuando los frutos se abren prematuramente (Child *et al.*, 1998). Además, las semillas que se “escapan” contaminan los campos adyacentes donde crecen otras plantas.

Gracias al enorme conocimiento de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* muchos de los trabajos realizados con el fin de conocer el proceso de dehiscencia se han llevado a cabo con esta planta. Además, como ya se ha mencionado, los frutos de *Arabidopsis thaliana* son secos y dehiscentes, al igual que se ha propuesto que era el fruto ancestral (Scutt *et al.*, 2006), lo que puede proporcionar mucha información acerca de los procesos clave en las vías morfogenéticas a lo largo de la evolución.

## **5. *Arabidopsis thaliana* COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO VEGETAL.**

### **5-1. Aspectos generales.**

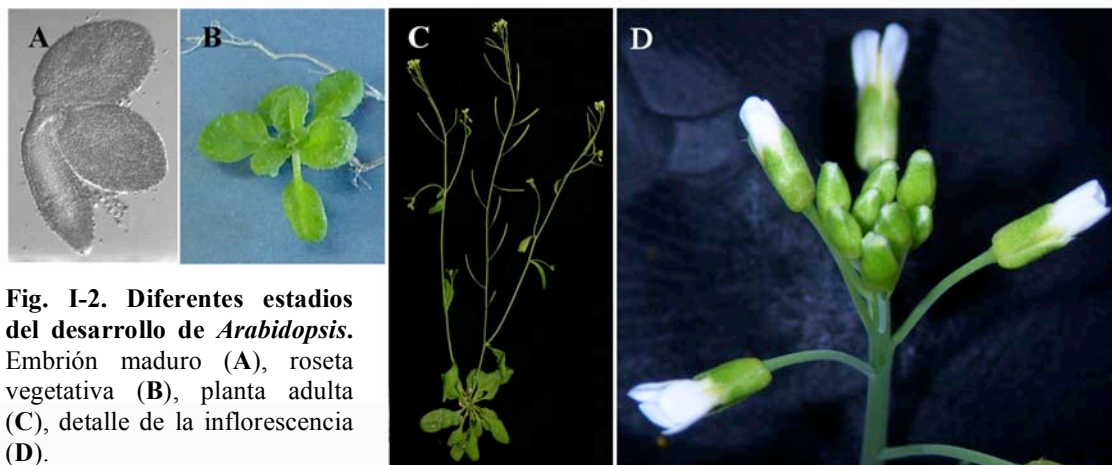
Hasta bien entrado el siglo XX, la mayoría de los estudios en plantas se realizaron utilizando especies de interés económico como el maíz, el tomate y el guisante, con el fin de mejorar sus cultivos. Sin embargo, estas plantas presentan muchos inconvenientes que dificultan su análisis y su manipulación en el laboratorio. Por este motivo, desde mediados de los años 80 se ha generalizado la utilización de *Arabidopsis thaliana* para la investigación del desarrollo vegetal (Somerville y Koornneef, 2002). *Arabidopsis* es una angiosperma dicotiledónea perteneciente a la familia de las crucíferas o brasicáceas, a la que también pertenecen especies como la col (*Brassica oleracea*), el rábano (*Raphanus sativus*) y las mostazas (*Sinapis sp.*; (Strasburger, 1994) ). Aunque no tiene valor económico, sus características la convierten en un organismo modelo muy apropiado para su estudio en el laboratorio. Presenta un tamaño pequeño, con alrededor de treinta centímetros de altura máxima, lo que permite siembras de alta densidad; su arquitectura es relativamente simple, y su ciclo vital, de unos dos meses, resulta corto para una planta con flores. Además es autógama, es decir, se autopoliniza sin intervención externa, y produce un gran número de semillas, lo que facilita la propagación de las diversas líneas. También resulta relativamente fácil realizar cruzamientos entre distintas plantas (Somerville y Koornneef, 2002).

*Arabidopsis* es una planta diploide cuyo genoma, que ha sido totalmente secuenciado (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), se organiza en cinco cromosomas y es muy apropiado para los estudios moleculares por su pequeño tamaño (125 Mb) y su escaso contenido en DNA repetitivo. Su uso intensivo en investigación ha propiciado la creación de bases de datos de dominio público en las que se ofrecen gran cantidad de herramientas informáticas, así como información acerca de mutantes, polimorfismos de DNA, protocolos de laboratorio, etc. Una de las más importantes es el TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org>).

Existen numerosas estirpes de *Arabidopsis* aisladas en localizaciones concretas y que presentan algunas diferencias morfológicas entre sí, que reciben el nombre de ecotipos o accesos y son tomados como referencia para definir la morfología normal (silvestre o *wild type*) de las plantas (Alonso-Blanco, 2000). Los más utilizados son Columbia-0 (Col-0) y Landsberg *erecta* (Ler), pese a que este último es homocigótico para la mutación *erecta*, que afecta de forma notable a la arquitectura general de la planta (Tsukaya *et al.*, 1995; Tsukaya *et al.*, 1993).

### **5-2. Morfología y ciclo vital.**

La embriogénesis establece finalmente un esbozo de la estructura corporal de la planta, con los dos meristemos principales establecidos, una radícula y dos cotiledones u hojas embrionarias cuya función principal es servir de órganos de reserva durante las primeras etapas tras la germinación (Figs. I-2A y I-3; (Bowman, 1994; Wolpert, 2002)).



**Fig. I-2. Diferentes estadios del desarrollo de *Arabidopsis*.** Embrión maduro (A), roseta vegetativa (B), planta adulta (C), detalle de la inflorescencia (D).

Durante toda la fase vegetativa, el *SAM* produce hojas separadas por entrenudos muy cortos, lo que da como resultado una roseta compacta (Figs. I-2B y I-3). La duración de esta etapa es, en general, proporcional al número final de hojas de la roseta y depende de las condiciones de cultivo y del ecotipo (Bowman, 1994).

Durante la fase reproductiva, a partir del meristemo de la inflorescencia se forma el tallo principal debido a un incremento de la longitud de los entrenudos (Figs. I-2C y I-3). Los meristemos laterales, asociados a las axilas de las hojas caulinares, generan ramificaciones del tallo. En los extremos del tallo principal se forman las inflorescencias, con las flores dispuestas en racimo (Figs. I-2D y I-3). La flor alcanza la madurez en el denominado estadio de antesis (Tabla I-1), en el que tiene lugar la autopolinización y la fertilización de los óvulos, que desencadenan el desarrollo de las semillas y la fructificación. Al final de la fase reproductiva, la planta se seca permitiendo la liberación de las semillas contenidas en sus frutos (Bowman, 1994; Wolpert, 2002).

El fruto seco y dehiscente de *Arabidopsis thaliana*, denominado silicua es el típico fruto de más de 3000 especies de la familia Brassicaceae (Rollins, 1993) por lo que mucho del conocimiento sobre *Arabidopsis* podría extrapolarse a otras especies dentro de esta familia u otras ya que, como se ha mencionado, el fruto de *Arabidopsis* recuerda al fruto ancestral.

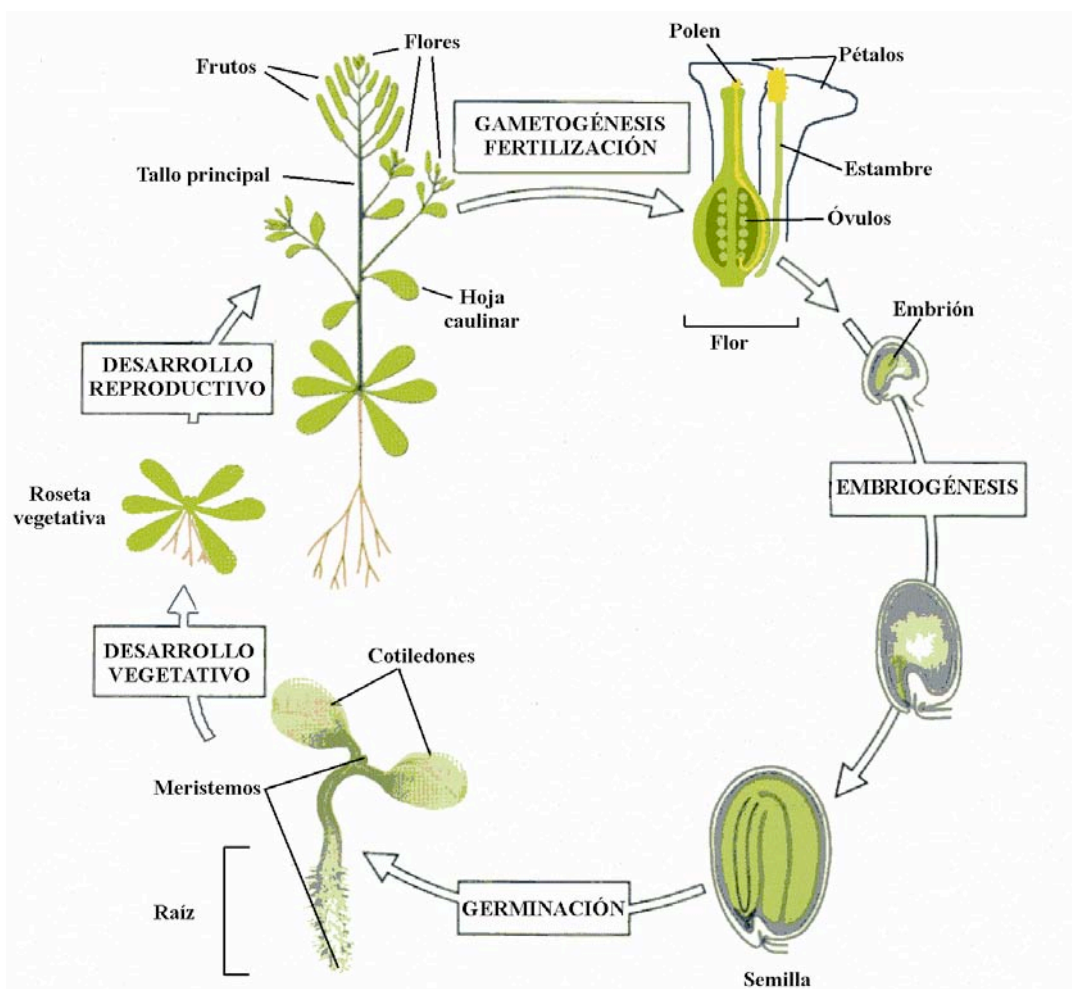


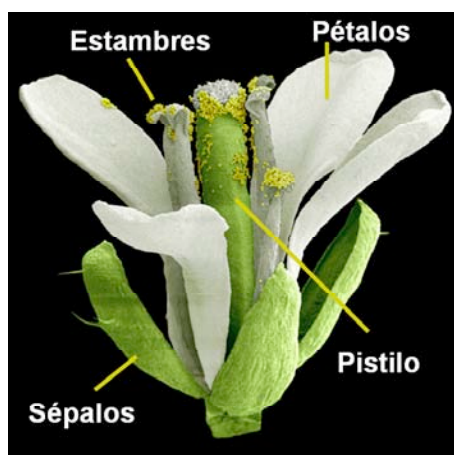
Fig. I-3. Ciclo vital de *Arabidopsis*. Se indican los principales eventos y las estructuras más relevantes de cada estadio. Modificado a partir de Wolpert *et al.* (2002).

## 6. *Arabidopsis thaliana* COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DEL GINECEO.

### 6-1. El gineceo de *Arabidopsis*.

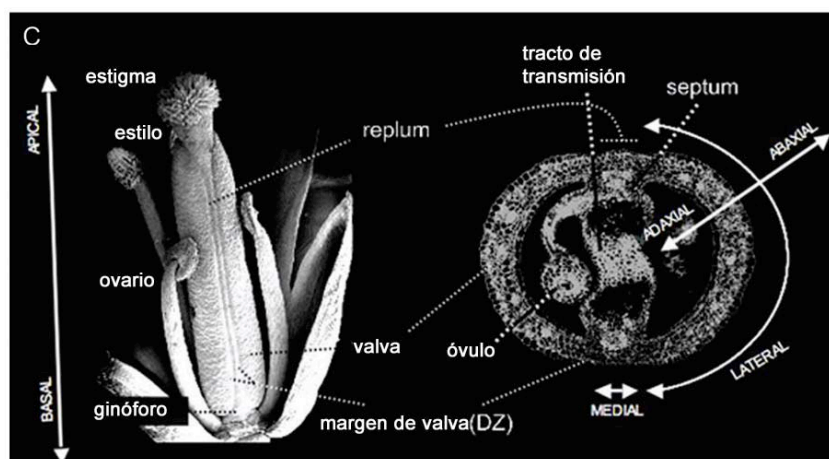
La flor de *Arabidopsis* mide unos 2 mm. y consta de cuatro verticilos concéntricos de órganos que presentan la organización típica de las crucíferas (Fig. I-4; Bowman, 1994). Los dos primeros verticilos están compuestos por cuatro sépalos y cuatro pétalos respectivamente. El tercero está formado por seis estambres, cada uno de los cuáles comprende un filamento y la antera, en la que se forma y madura el polen. Por último, en el cuarto verticilo dos carpelos fusionados dan lugar al gineceo, el órgano reproductor femenino.

El gineceo alcanza la madurez en el estadio de antesis, cuando ocurre la dehiscencia de las anteras y la flor está completamente abierta. En este estadio, todos los tejidos necesarios para la fertilización están desarrollados y los tejidos necesarios para la maduración y la posterior dehiscencia están presentes, aunque se desarrollarán completamente tras la formación del fruto.



**Fig. I-4. Micrografía electrónica de barrido coloreada de una flor de *Arabidopsis*.** Se señalan los 4 tipos de órganos principales. Tomado de *Science Photo Library* ([www.sciencephoto.com](http://www.sciencephoto.com)) con modificaciones.

En el gineceo en antesis, se pueden distinguir en un eje apical-basal, de arriba hacia abajo, el estigma, el estilo, el ovario y el ginóforo basal que une el ovario a la base de la flor (Fig. I-5 izquierda).



**Fig.I-5: Micrografía electrónica de barrido del gineceo de *Arabidopsis* en antesis (izquierda) y sección transversal del ovario (derecha).** Se indican los ejes de polaridad y los distintos tejidos. Modificado a partir de Balanzá *et al* (2006)

El estigma está compuesto de numerosas células epidérmicas alargadas que se denominan papilas estigmáticas (Sessions y Zambryski, 1995). Estas células están especializadas en la adherencia de los granos de polen y sólo pueden inducir la germinación del mismo en la fase de antesis (Nasrallah *et al.*, 1994). El estigma también representa el comienzo del tracto de transmisión, un tejido rico en polisacáridos especializado en dirigir el crecimiento del tubo polínico hacia los óvulos.

El tracto de transmisión está organizado en filas verticales de células conectadas por los extremos a través de plasmodesmos y secreta una matriz extracelular mucilaginosa. El tracto de transmisión continúa a lo largo del estilo y del septum del ovario para facilitar la fertilización de los óvulos (Sessions y Zambryski, 1995).

El estilo aparece como un cilindro corto y sólido con una morfología epidérmica distintiva (Bowman, 1994). Las células epidérmicas se disponen en filas cortas y tienen

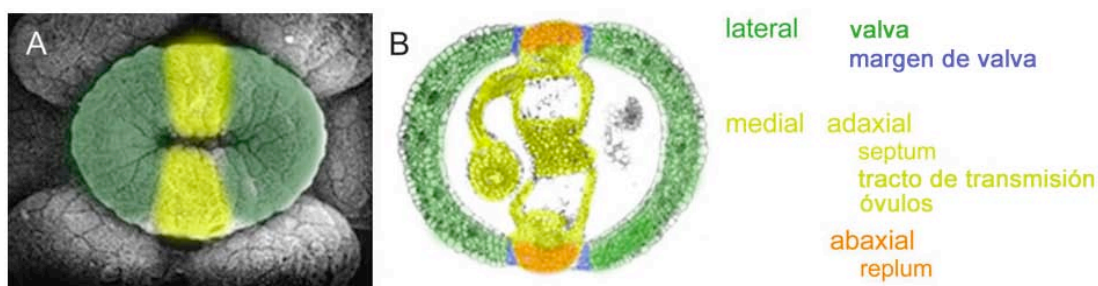


depósitos estriados de ceras. El centro del estilo está formado por células elongadas axialmente de tejido del tracto de transmisión rodeadas por un anillo de tejido vascular. Entre el centro y la capa única de epidermis se encuentran tres capas de tejido clorénquimático (Sessions y Zambryski, 1995). En anthesis existen estomas funcionales en el estilo (Sessions y Zambryski, 1995).

El ovario está compuesto por dos valvas conectadas externamente por los repla. Internamente está dividido en el plano medio por el septum, formando una cámara bilocular dentro de la cual se posicionan los óvulos. La pared externa de la valva muestra una clara diferencia entre las dos valvas y el replum (Bowman, 1994).

En una sección transversal del ovario se puede observar la distribución en el eje medio-lateral (Fig. I-5 derecha). Las valvas corresponden a las dos paredes del carpelo y se encuentran en las posiciones laterales. Dentro de la valva se pueden distinguir varias capas de células: el exocarpo o epidermis externa, que comprende una línea única de células intercalada con estomas inmaduros y sin abrir; tres capas de células del clorénquima que forman el mesocarpo; y por último el endocarpo, que consiste en dos capas de células diferenciadas: una capa de epidermis interna formada por células isodiamétricas con pared celular fina (*ena*) y una capa de pequeñas células subepidérmicas estrechamente alineadas que se elongan longitudinalmente (*enb*) (Sessions y Zambryski, 1995) (Spence *et al.*, 1996). Las valvas acaban en una columna de células pequeñas, que forman una depresión longitudinal, denominada margen de valva.

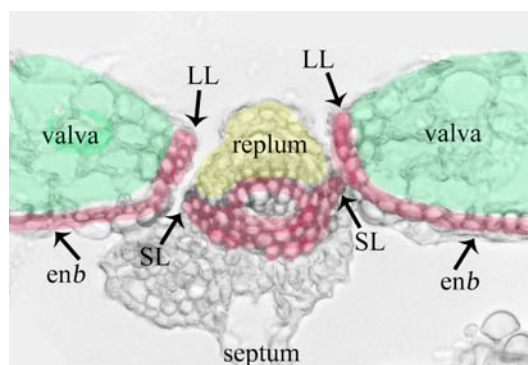
En las posiciones mediales del ovario se encuentran el replum (lado abaxial del septum), el septum, la placenta y los óvulos que de ella derivan. Todos estos tejidos mediales, junto con el estilo y estigma apicales se denominan en conjunto tejidos marginales ya que derivan de los márgenes del carpelo fusionado. Los tejidos marginales muestran polaridad abaxial/adaxial. Las posiciones abaxiales están ocupadas por el replum, y las adaxiales por el septum, el tracto de transmisión, la placenta y los óvulos (Balanzá *et al.*, 2006) (Fig. I-6).



**Fig. I-6: Micrografía electrónica de barrido del gineceo de *Arabidopsis* en estadio 7 (A).** Los dominios mediales se ha coloreado en amarillo y los dominios laterales en verde. Sección transversal del ovario de *Arabidopsis* en anthesis (B). Los diferentes tejidos se han coloreado para distinguir el tejido medial (o marginal) en amarillo/naranja y los tejidos laterales en verde/azul. Modificado a partir de Balanzá *et al* (2006).

Los óvulos son estructuras complejas que consisten en un nucelo central que contiene el saco embrionario, dos integumentos que engloban al nucelo, y un funículo que los conecta al tejido de la placenta (Bowman, 1994; Robinson-Beers *et al.*, 1992).

En los frutos maduros los diferentes tejidos se desarrollan para asegurar la dehiscencia, es decir, el proceso mediante el cual el fruto se abrirá para dispersar las semillas (Fig. I-7). Durante la maduración del fruto, en las valvas, las células del endocarpio (*enb*) forman depósitos de lignina, un polímero fenólico que proporciona rigidez a la pared celular. En los márgenes de la valva se diferencia la zona de dehiscencia. En ésta se distinguen dos capas de tejido. La zona lignificada (LL, Lignified Layer) se encuentra dentro del margen de valva, en la zona más cercana a la valva y está formada por una o dos capas de células estrechas que se lignifican. Esta zona se continúa con la capa *enb*, y junto a ésta provocará los mecanismos de tensión que separarán el replum de la valva en la dehiscencia del fruto (Spence *et al.*, 1996). En la zona del margen de valva cercana al replum se localiza la zona de separación (SL, Separation Layer), formada por células isodiamétricas. Las células de esta zona, durante la dehiscencia degeneran la lamela existente entre las paredes celulares y se separan unas de otras (Dinnyeny y Yanofsky, 2005) (Jenkins *et al.*, 1999) (Petersen *et al.*, 1996).



**Fig. I-7: Sección transversal de un fruto de *Arabidopsis*.** Se muestran los distintos tejidos que forman la zona de dehiscencia. El margen de valva, formado por la zona lignificada (LL) y la zona de separación (SL). Las valvas se han coloreado en verde y el replum en amarillo. Las células lignificadas se han coloreado en rojo.

El gineceo está recorrido longitudinalmente por cuatro haces vasculares principales, dos mediales y dos laterales. Los haces vasculares mediales corren longitudinalmente a lo largo de los repla suministrando nutrientes al tejido placentario y ramificándose hacia los óvulos. Estos haces vasculares se bifurcan al final del ovario para formar los vasos de xilema que se encuentran en el estilo. Las venas mediales se encuentran altamente lignificadas y puede que contribuyan también al proceso de dehiscencia (Balanzá *et al.*, 2006). Los haces laterales discurren por el centro de cada valva y terminan en el ápice, debajo del estilo, estando ontogénicamente relacionados con la vena media de la hoja (Sessions y Zambryski, 1995).



## **6-2.Desarrollo floral en *Arabidopsis*.**

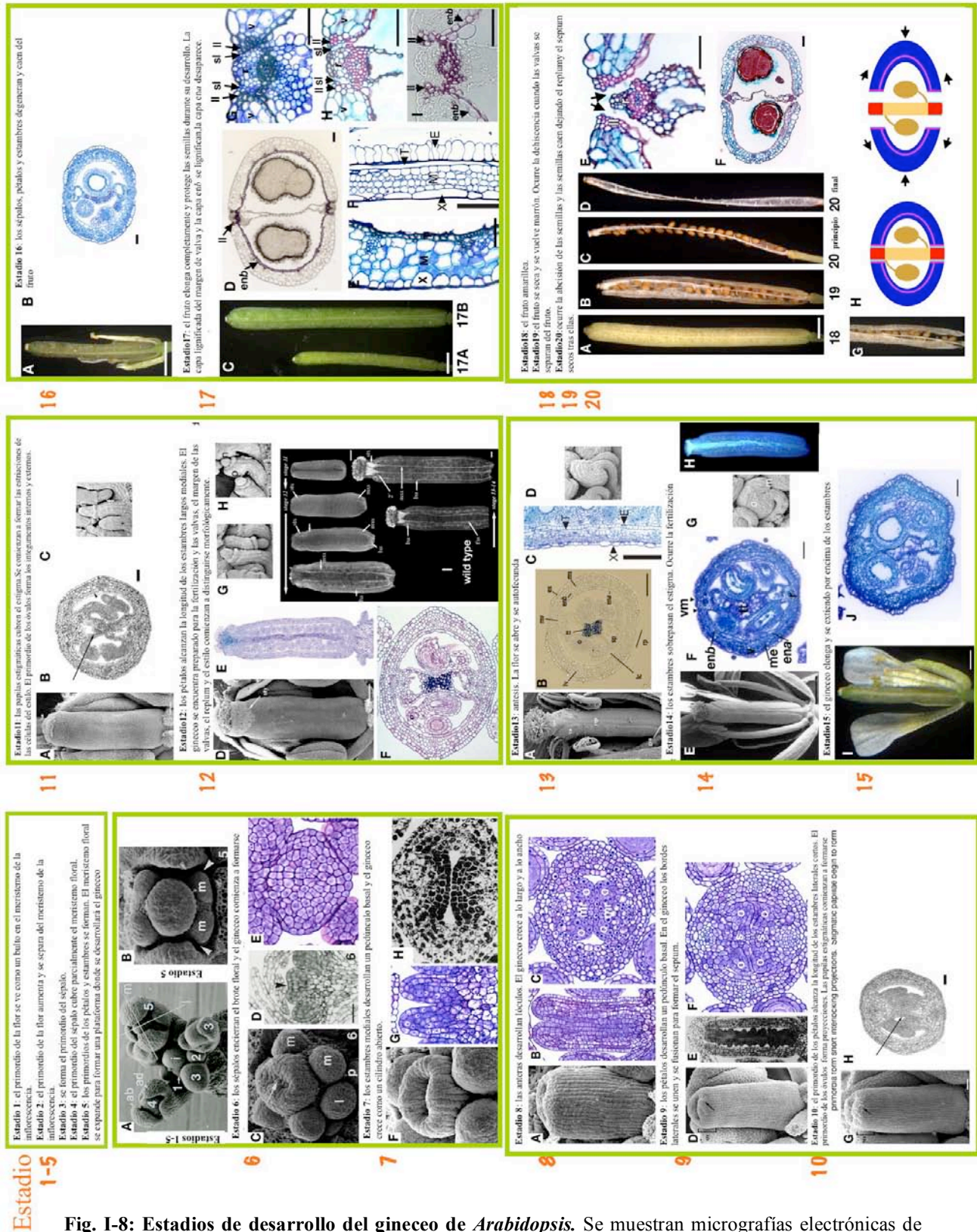
La morfogénesis floral y el desarrollo del gineceo han sido descritos en detalle. Smyth *et al* (Smyth *et al.*, 1990) dividieron el desarrollo temprano de la flor desde su inicio hasta anthesis en 13 estadios. Este estudio ha sido usado como referencia en la descripción de numerosos mutantes y para la caracterización de numerosos genes de *Arabidopsis*. En Ferrándiz *et al*, (1999) se utiliza esta división para detallar los principales eventos del desarrollo floral junto a observaciones adicionales de diversos autores. En la Tabla I-1 se describen los principales eventos del desarrollo floral con los marcadores que caracterizan el inicio de cada estadio y el progreso del desarrollo del gineceo.

**Tabla I-1. Etapas del desarrollo floral en *Arabidopsis***, con los marcadores morfológicos que caracterizan el inicio de cada estadio y el progreso del desarrollo del gineceo. Modificado a partir de Ferrándiz *et al*. (1999).

<b>Estadio</b>	<b>Marcador morfológico</b>	<b>Desarrollo del gineceo</b>
1	Aparición del meristemo floral.	
2	Formación del primordio de la flor y separación del meristemo de inflorescencia.	
3	Aparición de los primordios de los sépalos.	
4	Los sépalos sobrepasan el meristemo floral.	
5	Aparición de los primordios de los pétalos y los estambres.	
6	Los sépalos envuelven la yema floral.	Aparición del primordio del gineceo.
7	Los estambres desarrollan un pedúnculo basal.	Crecimiento del primordio del gineceo como un cilindro abierto.
8	Aparición de lóculos en los estambres.	Aparición de la placenta. Diferenciación de los haces vasculares principales
9	Los pétalos desarrollan un pedúnculo basal.	Aparición de los primordios de los óvulos. Diferenciación de las capas de los carpelos. Aparición de los haces vasculares laterales
10	Los pétalos se igualan con los estambres cortos.	Cierre del gineceo. Formación del septo.
11	Aparición de las papilas estigmáticas.	Diferenciación de la epidermis del estilo y las dos capas del endocarpo. Ramificación del haz vascular principal en el extremo del gineceo. Los óvulos desarrollan el funículo.
12	Los pétalos se igualan con los estambres largos.	Crecimiento general. Diferenciación del tracto transmisor.
13	Antesis.	Polinización.
14	Los estambres largos sobrepasan el estigma.	Fertilización. Suturas visibles a ambos lados del replum.
15	El estigma sobrepasa los estambres largos.	Lignificación del xilema.
16	Degeneración de pétalos y sépalos.	Expansión general.
17A	Caen los órganos de los tres verticilos externos de la flor.	Formación de la zona de separación (SL). Desarrollo de la cutícula externa del exocarpo; las células del endocarpo <i>b</i> ( <i>enb</i> ) forman el esclerénquima.
17B	La silicua alcanza su tamaño final.	Lignificación del <i>enb</i> y la LL.
18	La silicua amarillea.	Degeneración del <i>ena</i> y lignificación total del <i>enb</i> . El mesocarpo se seca.
19	Dehiscencia de las valvas.	
20	Las semillas caen.	

# INTRODUCCIÓN

En la figura I-8 se muestran los distintos estadios de desarrollo del gineceo. Adaptado de (Roeder, 2005).



**Fig. I-8: Estadios de desarrollo del gineceo de *Arabidopsis*.** Se muestran micrografías electrónicas de barrido, cortes histológicos, fotografías *in vivo* y fotografías en campo oscuro de los distintos estadios de desarrollo del gineceo de *Arabidopsis* con los marcadores morfológicos que caracterizan el inicio de cada estadio. Modificado a partir de Roeder (2005).

## **7. FACTORES GENÉTICOS QUE CONTROLAN EL DESARROLLO DEL GINECEO EN *Arabidopsis*.**

Gran parte del conocimiento actual sobre la genética molecular del desarrollo del gineceo deriva de la investigación en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Recientemente se han publicado revisiones muy completas describiendo la morfogénesis del carpelo y el desarrollo del fruto (Dinneny *et al.*, 2005) (Roeder *et al.*, 2005) y (Balanzá *et al.*, 2006). A continuación se hace un breve resumen de los últimos progresos en este campo intentado añadir los nuevos avances surgidos a partir de la publicación de las mismas.

### **7-1. Genes que intervienen en el desarrollo del gineceo.**

Durante los últimos años se han identificado varias mutaciones que afectan al desarrollo del gineceo. Algunas de ellas producen una pérdida de la identidad del carpelo mientras que otras afectan a la diferenciación de tejidos específicos del gineceo. La clonación de los genes correspondientes y la determinación de sus patrones de expresión mostró que en general, la pérdida de función afectaba principalmente a aquellos dominios en los que el gen se expresaba. A pesar de que en un principio diversos estudios sugerían que la mayoría de los tejidos se desarrollan de forma bastante independiente (Bowman *et al.*, 1999), cada vez está más claro que las conexiones funcionales entre ellos son más fuertes de lo que se anticipaba y que el desarrollo de los diferentes compartimentos a lo largo de los ejes de desarrollo implican a muchos reguladores comunes que están altamente coordinados.

Muchos de los genes que afectan al desarrollo del gineceo también tienen un papel en el desarrollo del patrón de las hojas. Curiosamente, la mayoría de los genes que tienen función tanto en el desarrollo del patrón de la hoja como del gineceo se identificaron en un principio por sus fenotipos en este último, sugiriendo que la redundancia debe ser más robusta en las hojas y reflejando probablemente una trayectoria evolutiva más corta de los papeles adquiridos por esos genes en el desarrollo del carpelo.

#### **7-1-1. De la hoja al carpelo : genes de identidad.**

Una hoja puede ser transformada en un carpelo expresando los correspondientes genes de identidad de órganos florales, específicamente *AGAMOUS* (*AG*) y uno o más de los genes *SEPALLATA* (*SEP*) (Honma y Goto, 2001). Al contrario, la pérdida de función simultánea de los genes redundantes *SEP* produce una completa ausencia de desarrollo del carpelo que en su lugar, se desarrolla como un órgano parecido a una hoja (Ditta *et al.*, 2004) (Pelaz *et al.*, 2000).

A pesar del papel principal de *AG* en la especificación de la identidad del carpelo, muchos de los tejidos típicamente carpelares, a excepción de los que se encuentran en la valva, se siguen desarrollando en ausencia de *AG*, como por ejemplo

ocurre en los carpelos ectópicos del doble mutante *apetala2 (ap2) ag* (Bowman *et al.*, 1991). Esta observación llevó a proponer que factores adicionales pueden especificar, al menos parcialmente, la identidad del carpelo en una ruta independiente de *AG*. Estos factores han sido identificados como *SHATTERPROOF 1 y 2 (SHP)*, un par de genes de la familia MADS, completamente redundantes y muy parecidos entre sí. Ambos están relacionados estrechamente con *AG* e involucrados principalmente en la especificación del margen de valva (ver a continuación) (Liljegren *et al.*, 2000). En el cuádruple mutante *ap2 ag shp1 shp2* todas las estructuras carpeloides desaparecen. Otros estudios complementarios han demostrado que las proteínas SHP y AG son altamente equivalentes a nivel funcional y que sus funciones diferentes durante el desarrollo derivan principalmente de sus distintos patrones de expresión (Pinyopich *et al.*, 2003).

Otros dos factores adicionales involucrados en la vía independiente de *AG* de especificación del carpelo son *SPATULA (SPT)* y *CRABS CLAW (CRC)*. *SPT* codifica un factor de transcripción tipo bHLH y se expresa en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo y reproductivo (Heisler *et al.*, 2001). *CRC* pertenece a la familia YABBY y sólo se expresa en los nectarios y en los carpelos (Bowman y Smyth, 1999). Los mutantes *spt* tienen defectos en el desarrollo de la mayoría de tejidos marginales de gineceo, mientras que el gineceo *crc* es más corto y ancho que el silvestre y se encuentra parcialmente sin fusionar en el ápice. El gineceo del doble mutante *crc spt* se desarrolla como dos órganos no fusionados con una cantidad muy reducida de óvulos y de tejido estilar y estigmático. Además, la pérdida de función de *SPT* y *CRC* en el doble mutante *ap2 ag* mimetiza el fenotipo mutante *ap2 ag shp1 shp2* (Alvarez y Smyth, 1999).

Recientemente se ha demostrado que *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, *YABBY3 (YAB3)* y *JAGGED (JAG)*, presentes todos en hojas y carpelos, activan conjuntamente a los genes *SHP* (Dinnyen *et al.*, 2005). Por lo tanto, los genes *SHP* deberían colocarse en la cima de la ruta de especificación de identidad del carpelo en paralelo con *AG*, y tanto *AG* como los *SHP* podrían activar directa o indirectamente a *SPT* y *CRC* de manera independientemente.

### **7-1-2. División de territorios.**

Una vez se ha especificado la identidad del órgano, el primordio del gineceo se divide en diferentes dominios. El patrón adaxial/abaxial se establece en los primeros estadios de desarrollo, al igual que ocurre durante el desarrollo de las hojas y todos los órganos laterales. Los genes *KANADI (KAN)*, que codifican factores de transcripción de la familia GARP (Eshed *et al.*, 1999) (Kerstetter *et al.*, 2001) se expresan inicialmente en los dominios abaxiales junto a los factores de respuesta a auxinas *ETTIN (ETT)* y *ARF4* (Sessions *et al.*, 1997) (Kerstetter *et al.*, 2001) (Pekker *et al.*, 2005). Así mismo, los genes abaxiales *YABBY* como *FIL* o *YAB3*, también se

restringen a los dominios abaxiales en el primordio del carpelo junto a *CRC*, otro miembro de la familia que, en cambio, no se expresa en las hojas (Bowman y Smyth, 1999) (Siegfried *et al.*, 1999). Los mutantes simples en cualquiera de estos *loci* tienen fenotipos débiles de adaxialización, pero la combinación de mutaciones provoca defectos severos en la polaridad, indicando que todas estas funciones actúan juntas para especificar el destino abaxial. De manera contraria, los genes *HD-ZIPIII* (class III homeodomain-leucine zipper) que, además de conferir la identidad adaxial tienen un papel en la iniciación de *SAM* y en su mantenimiento, se expresan en posiciones adaxiales. Aunque el efecto tanto de la pérdida como de la ganancia de función de estos genes para el desarrollo del gineceo no se ha descrito en detalle, parece que es menos fuerte que en las hojas, quizá indicando que otros factores adicionales pueden tener papeles predominantes en la determinación del destino adaxial (McConnell y Barton, 1998) (Alvarez *et al.*, 2006). Unos buenos candidatos para esta actividad son *NUBBIN* (*NUB*) y *JAG*, factores de transcripción C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zing finger (Dinneny *et al.*, 2006). Los mutantes simples *nub* no tienen fenotipo obvio, pero el doble mutante *jag nub* tiene alteraciones severas en el crecimiento de los órganos y abaxialización de los estambres y carpelos (Dinneny *et al.*, 2006).

Una particularidad significativa en la morfogénesis del carpelo es la temprana disposición de los mecanismos que dirigen la polaridad en el eje medio-lateral y la subsiguiente partición del primordio del gineceo en regiones laterales y mediales. Los dominios laterales darán lugar a las valvas mientras que los dominios mediales darán lugar a los tejidos marginales. La especificación del eje medio-lateral se refleja claramente en la expresión temprana y específica de diferentes genes en estos dos compartimentos. El dominio medial retiene cierta identidad meristemática, que se refleja en su capacidad de generar otros tejidos posteriormente. Así, varios de los genes *KNOX* involucrados en el mantenimiento del *SAM* se expresan en estos dominios, al igual que los genes “de frontera” *CUP-SHAPED COTYLEDONI* (*CUC1*) y *CUC2* (Long *et al.*, 1996) (Aida *et al.*, 1997) (Ori *et al.*, 2000) (Pautot *et al.*, 2001). El papel de estos genes en el desarrollo del gineceo todavía no está claro. Los mutantes de genes involucrados en el mantenimiento del meristemo tienen defectos muy severos en el desarrollo y normalmente no producen flores. Sin embargo, mediante regeneración de callo se han conseguido flores de los mutantes *cuc1* y *cuc2*, en los que el tejido marginal no se desarrolla completamente, lo que sugiere la importancia de la actividad meristemática en las regiones mediales (Ishida *et al.*, 2000).

Cabe destacar que muchos de los genes que dirigen la polaridad adaxial/abaxial también parece que actúan en el establecimiento de los dominios medio-laterales. *FIL*, *YAB3* y *CRC*, los genes *YABBY* abaxiales, están excluidos de los dominios mediales desde estadios tempranos del desarrollo del gineceo, aunque *CRC* se expresa

posteriormente en las regiones mediales abaxiales (Bowman y Smyth, 1999) (Siegfried *et al.*, 1999). En los dominios laterales se ha observado también la expresión específica de *JAG* y *NUB* (Dinneny *et al.*, 2004) (Dinneny *et al.*, 2006). Las actividades *CRC*, *JAG* y *NUB* son importantes en los dominios laterales para mantener el crecimiento en dichas regiones que luego darán lugar a la valvas.

El patrón de expresión de *KANI* se inicia también en el lado abaxial del primordio del gineceo. Sin embargo, cambia a las zonas mediales en estadios posteriores de desarrollo al contrario que en el caso de los genes *YAB* (Kerstetter *et al.*, 2001). Los mutantes *kan1 kan2* tienen un fenotipo extremo, con tejidos marginales adaxiales como los óvulos y el tracto de transmisión, a lo largo de toda la superficie abaxial del gineceo, indicando que, además del fenotipo adaxializado, las fronteras mediales-laterales se han perdido, lo que sugiere que la actividad *KAN* también puede ser necesaria en el mantenimiento de la especificación de los dominios laterales (Eshed *et al.*, 2001). Sin embargo, a pesar de estos datos, todavía se está lejos de conocer cómo se especifican los dominios laterales. Una hipótesis emergente es que las redes genéticas que mantienen las fronteras del *SAM* y de los primordios laterales se pueden trasladar al contexto del gineceo, y ambas actividades antagonistas y cooperativas fijarán la posición de los territorios mediales y laterales. Varios trabajos recientes sostienen esta hipótesis (Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007) (Dinneny *et al.*, 2005). El gen homeobox *REPLUMLESS* (*RPL*, también conocido como *BELLRINGER*, *PENNYWISE* y *VAAMANA*) pertenece a la familia *BELL* de factores de transcripción (Roeder *et al.*, 2003). *RPL* interacciona con los factores *KNOX* de la clase I en el mantenimiento del estado meristemático indiferenciado del *SAM* (Byrne *et al.*, 2003) (Smith y Hake, 2003) (Bhatt *et al.*, 2004). *RPL* también se expresa en los dominios mediales del gineceo desde estadios tempranos de desarrollo, donde se ha visto que reprime las actividades *FIL*, *YAB3* y *JAG* (Roeder *et al.*, 2003) (Dinneny *et al.*, 2005). Por otra parte, *ASYMMETRIC LEAVES 1* (*ASI*), miembro de la familia *Myb* (Byrne *et al.*, 2000b) se expresa en los dominios laterales del gineceo, mientras que algunos genes *KNOX* de la clase I se expresan en los dominios mediales (Byrne *et al.*, 2000a). Publicaciones recientes proponen que la actividad de *ASI* tiene un papel en la restricción de la expresión de los genes de *KNOX* de clase I en los dominios laterales del gineceo, manteniendo la relación antagonista observada en el primordio lateral del *SAM* (Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007).

### **7-1-3. Desarrollo de los dominios laterales o patrón medio-lateral.**

Los dominios laterales darán lugar a las valvas, incluyendo los márgenes de las valvas donde aparecerá eventualmente las zonas de dehiscencia. En los últimos años se han estudiado los principales factores que dirigen la formación del margen de valva (revisado en (Dinneny y Yanofsky, 2005) (Ferrándiz, 2002)). En los mutantes *shp1shp2* no se diferencian las zonas de dehiscencia, por lo que los frutos mutantes no

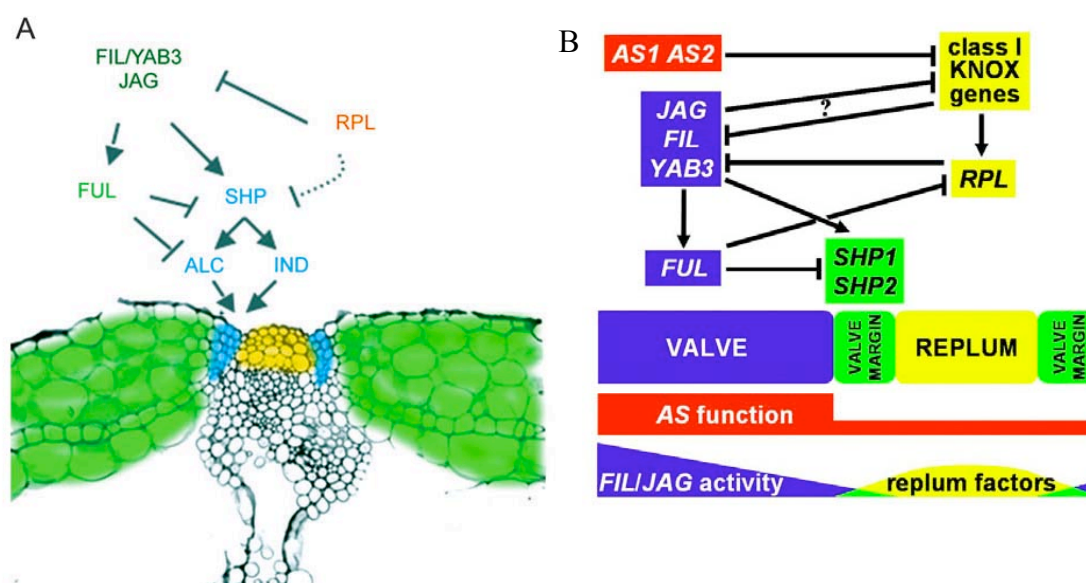
se abren al madurar (Liljegren *et al.*, 2000). Fenotipos similares de indehiscencia se encuentran en los mutantes en *INDEHISCENT (IND)* o *ALCATRAZ (ALC)*, dos factores de transcripción de la familia bHLH (Rajani y Sundaresan, 2001) (Liljegren *et al.*, 2004). En el mutante *fruitfull (ful)* se observan fenotipos de alguna forma opuestos, en los que las células pequeñas y lignificadas típicas de la zona de dehiscencia se encuentran ectópicamente en lugar de las células de la valva. Como consecuencia, los frutos no se elongan correctamente y se abren prematuramente por la presión interna de las semillas en crecimiento (Gu *et al.*, 1998). *SHP*, *IND* y *ALC*, que en frutos silvestres se expresan en el margen de la valva, se expanden ectópicamente en las valvas de los mutantes *ful* (Ferrándiz *et al.*, 2000) (Liljegren *et al.*, 2004). De forma similar, en los mutantes *rpl* el replum (la región medial abaxial del ovario) desaparece, adoptando identidad de margen de valva y expresando los correspondientes genes de margen de valva (Roeder *et al.*, 2003).

Recientemente (Dinny *et al.*, 2005) ha propuesto un modelo en el que se explica el desarrollo inicial de las valvas y del margen de valva en el ovario a través de las actividades de los genes que controlan la formación ambos. En el modelo se propone que las actividades de *FIL*, *YAB3* y *JAG* cooperarían para regular positivamente a *FUL* en la valva y a *SHP* en el margen de la valva. Las actividades *FIL/YAB/JAG* podrían estar formando un gradiente con máximo en la zona central de la valva y mínimo en los márgenes. Niveles altos de *FIL/JAG* en las valvas activarían la expresión de *FUL*, mientras que niveles bajos activarían la transcripción de los *SHP* en el margen de valva. *FUL*, por su parte, reprime la expresión de los genes *SHP* allí donde se expresa, reforzando la separación de la valva y los márgenes de la valva (Ferrándiz *et al.*, 2000). En el replum, *RPL* bloquea la actividad de *FIL/JAG*, impidiendo la activación de los *SHP* (Roeder *et al.*, 2003) (Dinny *et al.*, 2005). Por lo tanto, mediante la acción de *FUL* y *RPL*, la actividad *SHP* se restringe al margen de valva, en la que promueve la expresión de *IND* y *ALC*. Estos últimos son los factores principales responsables de la correcta diferenciación de los tejidos en la zona de dehiscencia (Liljegren *et al.*, 2000; Liljegren *et al.*, 2004; Rajani y Sundaresan, 2001).

Este modelo se puede completar con el trabajo antes mencionado (Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007) que implica a *ASI* presumiblemente en colaboración con *AS2*, que codifica una proteína con dominio LOB (Iwakawa *et al.*, 2002), en el desarrollo del patrón medio-lateral del fruto de *Arabidopsis* reprimiendo a los genes *KNOX*. *ASI* reprime al gen *BREVIPEDICELLUS (BP)* (también denominado *KNAT1*) que se expresa en el replum y en el margen de valva. *BP* interacciona con *RPL* en el replum y regula positivamente la expresión de éste. La sobreexpresión de *BP* en el gineceo provoca un aumento del tamaño del replum mientras que se reduce el tamaño de la valva, y además aumenta los defectos de los mutantes *ful*. Todos estos datos sugieren que *BP* juega un papel importante en el desarrollo del replum. En un trabajo muy



reciente se ha propuesto que los miembros de la familia *KNOX* de la clase I tienen funciones distintas durante el desarrollo del carpelo. Así, se ha observado que la inactivación de *KNAT6*, otro miembro de la familia *KNOX* de la clase 1, tiene un efecto opuesto a la de *BP* en el desarrollo del replum (Ragni *et al.*, 2008), en el triple mutante *knat6 bp pny* se rescatan las alteraciones del replum de *bp pny*. Asimismo, se ha sugerido que *PNY* restringe la expresión de *KNAT6* en el replum silvestre para promover la identidad del mismo ya que la expresión de *KNAT6*, que en condiciones silvestres se expresa en el margen de valva, colapsa en mutantes *pny* en los que el replum está ausente. Sin embargo, *PNY* no es requerido *per se* para la especificación del replum ya que las combinaciones mutantes *as1 rpl*, *shp1 shp2 rpl*, *fil rpl* y *knat6 pny* desarrollan un replum normal (Ragni *et al.*, 2008) (Roeder *et al.*, 2003) (Dinneny *et al.*, 2005) (Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007). Estos datos sugieren que existen otros factores redundantes implicados en la especificación de la identidad del replum. Ya que *knat6 bp* tiene un replum normal, *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, miembro de la familia *KNOX* de la clase I que se expresa en el replum (Long *et al.*, 1996), podría ser uno de dichos factores (Ragni *et al.*, 2008).



**Fig. I-9:** (A) Modelo de las interacciones genéticas que dirigen la especificación de las valvas (verde), el margen de valva (azul) y el replum (naranja) según Dinneny *et al* (2005). (B) Modelo de la interacciones genéticas que dirigen la formación del eje medio-lateral del ovario de *Arabidopsis*, incluyendo a los genes *KNOX* y a *AS1* y *AS2* según Alonso-Cantabrana *et al* (2007). Los tres dominios se especifican por gradientes opuestos de factores antagonistas; los factores de la valva (*FIL/JAG*, azul) y los factores del replum (genes *KNOX*, amarillo). El margen de valva se forma en la región donde se expresan tanto los factores del replum como de la valva. La función de *AS* (rojo) es reprimir a los genes *KNOX* impidiendo que se expresen en las valvas y manteniendo su expresión bajo ciertos niveles en el replum y en el margen de valva.

#### 7-1-4. Desarrollo del tejido marginal.

Los tejidos marginales, como el replum, el septum, el tracto de transmisión, la placenta, el estilo y el estigma, derivan de las regiones mediales del primordio del



gineceo. Varios genes están involucrados en la especificación de dichos tejidos, como se deduce de los fenotipos asociados a las mutaciones en esos genes. Como se ha mencionado anteriormente, los genes asociados al meristemo como los genes *CUC* se expresan en esas regiones y parecen tener alguna función en el desarrollo del tejido marginal ya que en los dobles mutantes *cuc1 cuc2* el septum no se fusiona correctamente (Ishida *et al.*, 2000).

Sin embargo, todavía no se ha identificado todavía ninguna mutación que impida completamente la formación de tejido marginal. Una de las disrupciones más severas corresponde a las mutaciones en el correpresor transcripcional *LEUNIG (LUG)*. En los mutantes *lug* el gineceo está parcialmente sin fusionar en las regiones apicales, formando unos apéndices filamentosos en los extremos de las valvas. Los mutantes *lug* también tienen defectos en la fusión del septum y en el desarrollo de los óvulos. Las mutaciones que afectan a *AINTEGUMENTA (ANT)* un gen que codifica un factor de transcripción de la familia AP2/ERF causan fenotipos similares aunque más débiles en el desarrollo del gineceo (Krizek *et al.*, 2000). De nuevo, el papel de *LUG* y *ANT* no se restringe al desarrollo del carpelo, sino que también participan en la expansión de la lámina de la hoja y en la regulación negativa de *AG* en el primer y segundo verticilo de las flores (Liu y Meyerowitz, 1995) (Conner y Liu, 2000) (Cnops *et al.*, 2004) (Krizek *et al.*, 2000). El desarrollo del tejido marginal es dependiente totalmente de las actividades cooperativas de *ANT* y *LUG*, ya que en el doble mutante *ant lug* no existe replum, estilo, septum ni tejidos placentarios (Liu *et al.*, 2000). Un tercer factor que parece contribuir en esta vía es *SEUSS (SEU)*, que al igual que *LUG* codifica un correpresor transcripcional. Los mutantes *seu* tienen fenotipos en el gineceo parecidos aunque más débiles al de los mutantes *lug*. Las proteínas *LUG* y *SEU* son capaces de interactuar físicamente y se ha propuesto que actúan cooperativamente en la regulación de sus dianas (Franks *et al.*, 2002) (Sridhar *et al.*, 2004). De hecho, el doble mutante presenta fenotipos en el desarrollo más severos, como una reducción importante en el tamaño de las flores y en la altura de las plantas, una disminución significativa en el número de órganos florales, y transformaciones homeóticas. Generalmente, el cuarto verticilo de la flor no se desarrolla mientras que los órganos del primer verticilo son carpeloides, aunque aberrantes, desarrollando órganos filamentosos que carecen completamente de tejidos marginales. Además de *ANT/LUG/SEU*, otros trabajos apuntan a que los genes *YABBY* también participan en esta vía. Primero, los carpelos del doble mutante *fil ant* se parecen tanto a los de *ant lug* como a los de *lug seu* (Nole-Wilson y Krizek, 2006). Segundo, parece que *FIL* es un regulador negativo de *AG* en los verticilos externos de la flor (Chen *et al.*, 1999). Tercero, el ortólogo de *LUG* en *Antirrhinum*, *STYLOSA*, interactúa físicamente con las proteínas *YABBY* (Navarro *et al.*, 2004). Por último *ANT*, *LUG* y *SEU* parecen estar involucrados en el mantenimiento de la polaridad adaxial-abaxial regulando

positivamente la expresión y/o actividad de *FIL* (Franks *et al.*, 2006; Nole-Wilson y Krizek, 2006). Sin embargo, queda por explicar si los fenotipos mencionados anteriormente reflejan un papel para *ANT/LUG/SEU/YAB* en la especificación de la identidad de los tejidos marginales o alternativamente pueden ser la consecuencia de una disminución en la capacidad de proliferación de la región medial, incapaz entonces de crecer y diferenciarse.

Posibles efectores aguas abajo de la vía de *ANT/LUG/SEU/YAB* son los miembros de la familia de genes *STY/SHI*, que codifican factores de transcripción tipo zinc-finger y que exhiben un nivel inusual de redundancia. *STYLISH 1 (STY1)* es el único miembro de la familia que tiene fenotipo observable como mutante simple. Estas alteraciones afectan al desarrollo del estilo. Las mutaciones en los otros ocho miembros de la familia *SHI* no tienen defectos fenotípicos pero aumentan el fenotipo de *sty1* de forma gradual (Kuusk *et al.*, 2006). Los mutantes múltiples en *sty1* y otros genes relacionados de la familia *SHI* tienen muy reducidos los tejidos del estilo y estigma, el gineceo sin fusionar en el extremo apical y los septa incompletos, recordando a los mutantes *lug* y muy parecidos a lo que ocurre en los múltiples mutantes *ANT/LUG/SEU/YAB* (Fridborg *et al.*, 1999) (Kuusk *et al.*, 2002) (Kuusk *et al.*, 2006). Además de estos defectos en el desarrollo del gineceo, los mutantes *sty/shi* también presentan alteraciones en el desarrollo de las hojas, que tienen los márgenes aserrados y una pérdida parcial de la polaridad adaxial-abaxial. Las mutaciones *lug* son epistáticas sobre los fenotipos *sty* y además la sobreexpresión de *STY1* es capaz de rescatar los fenotipos *lug*, colocando los genes *STY/SHI* genéticamente aguas abajo de *LUG*. Además, se ha propuesto que las proteínas *STY/SHI* median la señalización por auxinas (ver más adelante), lo que proporcionaría un nexo funcional adicional entre *STY* y el complejo *ANT/LUG/SEU/YAB*, ya que *LUG* y *SEU* también han sido relacionados con las respuestas a auxinas (Navarro *et al.*, 2004) (Pfluger y Zambryski, 2004). La sobreexpresión de *STY1* provoca además el desarrollo ectópico de células epidérmicas del estilo y la proliferación de los haces vasculares del mismo a lo largo de las valvas, apoyando la idea de que los genes *STY/SHI* están involucrados en la especificación de la identidad del estilo en vez de controlar simplemente la proliferación celular. Sin embargo, éstas posibilidades no son mutuamente excluyentes, ya que las plantas *35S:STY1* tienen un fenotipo adicional en las hojas que desarrollan láminas adicionales en los peciolo.

*SPT*, como ya se ha mencionado, es otro gen involucrado en el desarrollo del carpelo. *SPT* se expresa en los dominios laterales durante el desarrollo del gineceo y es otro factor principal involucrado en la diferenciación de los tejidos marginales. En los mutantes *spt*, el tracto de transmisión no se forma y otros tejidos marginales como el estilo, estigma y replum se encuentran reducidos (Alvarez y Smyth, 1999). *SPT* también ha sido propuesto como mediador de la señalización por auxinas ya que la inhibición

química del transporte polar de auxinas restaura el desarrollo normal del gineceo en los mutantes *spt* (Heisler *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha observado una fuerte interacción sinérgica de las mutaciones *spt* y *sty/shi* (Kuusk *et al.*, 2002; Kuusk *et al.*, 2006). Recientemente se han descrito tres nuevos factores de transcripción tipo bHLH, relacionados filogenéticamente con *IND*, y también involucrados en el desarrollo de los tejidos marginales del gineceo de *Arabidopsis*, los genes *HECATE* (*HEC*) (Gremski *et al.*, 2007). *HEC1*, *HEC2* y *HEC3* tienen funciones que solapan parcialmente. Dependiendo de la cantidad de pérdida de función de los genes *HEC* las plantas exhiben un grado variable de infertilidad, defectos en el septum, en el tracto de transmisión y en el desarrollo del estigma y de los estambres. Se ha demostrado que las proteínas *HEC* interaccionan físicamente con *SPT*, indicando que los genes *HEC* en coordinación con *SPT* podrían regular el desarrollo de los tejidos marginales. Por otra parte, la expresión ectópica de los genes *HEC* provoca el desarrollo de inflorescencias parecidas a las de mutantes *pinformed*, sugiriendo un papel de los genes *HEC* en el control de patrón del gineceo mediado por auxinas.

En un estudio reciente se ha descrito el primer gen específicamente necesario para el desarrollo del tracto de transmisión en *Arabidopsis*, *NO TRANSMITTING TRACT* (*NTT*) (Crawford *et al.*, 2007), que codifica un factor de transcripción zinc finger tipo C2H2/C2HC. En los mutantes *ntt* los tubos polínicos crecen más despacio que en el silvestre y/o terminan de forma prematura provocando una reducción de la fertilidad en dichos mutantes. Este hecho parece ser debido a que en los mutantes *ntt* no se desarrolla correctamente la matriz extracelular, formada principalmente por polisacáridos, que facilitan el movimiento de los tubos polínicos. Estos datos apoyan la hipótesis de que el tracto de transmisión aumenta la eficiencia de la fertilización facilitando el crecimiento de los tubos polínicos.

#### **7-1-5. Patrón apical-basal.**

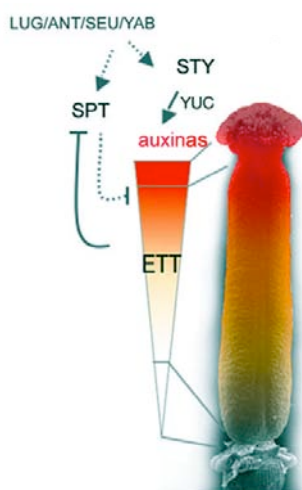
Muchos de los genes implicados en el desarrollo de los tejidos marginales, descritos en el apartado anterior, también tienen un papel en la determinación de las regiones apicales del gineceo. Así, *SPT* y *STY/SHI* se han considerado como los principales factores implicados en dirigir el desarrollo de dichas regiones, quizá junto a los *HEC*. Además de los mutantes *spt* o *sty/shi*, otros mutantes presentan una distribución alterada de los tejidos a lo largo del eje apical-basal. Las mutaciones en *ETT*, que codifica un factor de respuesta a auxinas (ARF), provocan defectos severos en el patrón del eje apical-basal del gineceo, con un aumento de las regiones apicales (estilo/estigma) y basales (ginoforo) y un ovario muy reducido (Sessions *et al.*, 1997; Sessions y Zambryski, 1995). El papel de *ETT* en la formación del ovario está en gran medida mediado por la represión de la expresión de *SPT* en este dominio. Las mutaciones *spt* son epistáticas a las de *ett*, suprimiendo el desarrollo ectópico de los tejidos apicales y adaxiales observado en los mutantes *ett* (Heisler *et al.*, 2001).

Además, se ha demostrado que *ETT* regula negativamente la expresión de los genes *HEC* en la zona abaxial del gineceo de forma parecida a lo que hace con *SPT* (Gremski *et al.*, 2007). Otros mutantes afectados en el transporte o en la señalización de auxinas como *pinoid* o *pinformed*, también presentan regiones apicales y basales alargadas y ovarios reducidos (Bennett *et al.*, 1995; Okada *et al.*, 1991). Además la inhibición química del transporte polar de auxinas provoca defectos muy similares y modifica, de forma diferente, los fenotipos de los mutantes afectados en el eje apical-basal. Así, por ejemplo, aumenta las mutaciones *ett* débiles y suprime los fenotipos de *spt* (Nemhauser *et al.*, 2000). Gracias a estas evidencias se ha propuesto que el patrón apical-basal del gineceo es dependiente de un gradiente de auxinas, a lo largo del primordio del gineceo (Nemhauser *et al.*, 2000). Las auxinas se sintetizarían en el extremo apical del gineceo y se transportarían basipétalmente formando un gradiente decreciente. De acuerdo con esta hipótesis, niveles elevados de auxinas inducirían la diferenciación del estilo y estigma, niveles intermedios formarían el ovario y niveles bajos el ginóforo basal. La inhibición del transporte en el gineceo provocaría la acumulación de auxinas en las zonas de síntesis, hipotéticamente las zonas apicales, y la disminución de las mismas en las regiones basales (Nemhauser *et al.*, 2000).

El modelo del gradiente de auxinas explicaría el patrón apical-basal del gineceo pero todavía no están claros ni los mecanismos de acción de los genes involucrados ni si el gradiente existe realmente. Una aportación importante a este modelo sería el reciente descubrimiento de (Sohlberg *et al.*, 2006) en el que se involucra a los genes *STY1/SHI* en la regulación de la síntesis de auxinas. En este trabajo se ha identificado a *YUCCA4*, un gen que codifica un enzima clave en la ruta biosintética de las auxinas, como diana primaria de la activación de *STY1*. Los genes *STY1* y *STY2* se expresan en las regiones apicales del gineceo en desarrollo, fuentes de auxinas según el modelo propuesto por (Nemhauser *et al.*, 2000). Además tanto los niveles de auxinas activas como los metabolitos de las mismas se encuentran reducidos en las distintas combinaciones de mutantes *sty/shi*. Un dato más que apoya este modelo es que varios genes *YUCCA* se expresan también en las regiones apicales del gineceo en desarrollo, y cuando se mutan estos genes aparecen fenotipos severos en la morfogénesis del carpelo (Cheng *et al.*, 2006).

Con todos estos datos en (Balanzá *et al.*, 2006) se ha especulado sobre un modelo que colocaría la síntesis de auxinas dependiente de *YUCCA* directamente bajo el control de los genes *STY/SHI* en el extremo apical del gineceo en desarrollo. *SPT* mediaría las respuestas a elevados niveles de auxinas para dirigir la diferenciación del estilo, estigma y tracto de transmisión y/o participar en la formación de un gradiente de auxinas regulando su transporte polar. Ambas hipótesis derivan de la observación de que los fenotipos *spt* se suprimen mediante la inhibición química del transporte polar de auxinas, que aumenta su concentración en las regiones apicales. *ETT*, además de la

regulación espacial de la expresión de *SPT*, respondería a niveles intermedios de auxinas para establecer el tamaño de la región central en el gineceo, donde se desarrollaría el ovario. *ETT*, miembro de la familia de ARFs, podría ser el factor que interpretara los gradientes de auxinas durante el desarrollo del gineceo y la traducción de ellos en la activación/represión de los genes diana. La regulación estrecha que se ha encontrado a través del desarrollo floral tanto del mRNA de *ETT* como a nivel de proteína sugiere la importancia de *ETT* como posible sensor fino de las instrucciones morfogénicas de las auxinas. *ETT* es diana de la degradación directa por ta-siRNA (Hunter *et al.*, 2006) y además, aguas arriba de las secuencias líder del transcrito 5' de *ETT* se han encontrado pequeñas ORF (Open ReadinG Frame, pautas abiertas de lectura) que se ha demostrado que reducen tanto la estabilidad del mRNA como la tasa de traducción de la ORF principal de *ETT* que se encuentra aguas abajo (Nishimura *et al.*, 2005). Sin embargo, todavía se sabe poco sobre la naturaleza de las dianas de *ETT*.



**Fig. I-10: Modelo del desarrollo del eje apical-basal del gineceo de *Arabidopsis* basado en la hipótesis del gradiente de auxinas** de Nemhauser *et al* (2002). Los niveles de auxinas (representadas en rojo) serían mayores en las regiones apicales, dirigiendo la formación del estilo y del estigma; los niveles intermedios promoverían el desarrollo del ovario; y los niveles bajos dirigirían la formación del ginóforo. La síntesis de auxinas en las posiciones “fuente” se encontraría bajo el control de los genes *STY/SHI*, mientras que la traducción de las instrucciones de las auxinas a diferenciación de tejidos podría estar mediada por la acción de *SPT* y *ETT* en sus respectivos dominios. Modificado a partir de Balanzá *et al* (2006).

A partir de lo que se conoce hasta el momento acerca del desarrollo del patrón de gineceo se puede sacar una conclusión clara: las auxinas están relacionadas con las principales vías que dirigen la polaridad en el gineceo. Sin embargo todavía no se sabe ni cómo se traduce la señal de las auxinas en la regulación de los genes ni la naturaleza específica de sus dianas, que en último caso dirigirán la diferenciación específica de los tejidos. Incluso no está resuelto del todo el patrón preciso de la acumulación de las auxinas, aunque en los últimos años se han realizado diversos intentos para visualizar la localización y concentración de las auxinas durante el desarrollo del gineceo (Aloni *et al.*, 2006; Aloni *et al.*, 2003; Avsian-Kretchmer *et al.*, 2002; Benkova *et al.*, 2003; Heisler *et al.*, 2005). En la figura I-11 se muestra los fenotipos de los mutantes de los principales genes implicados en el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis*



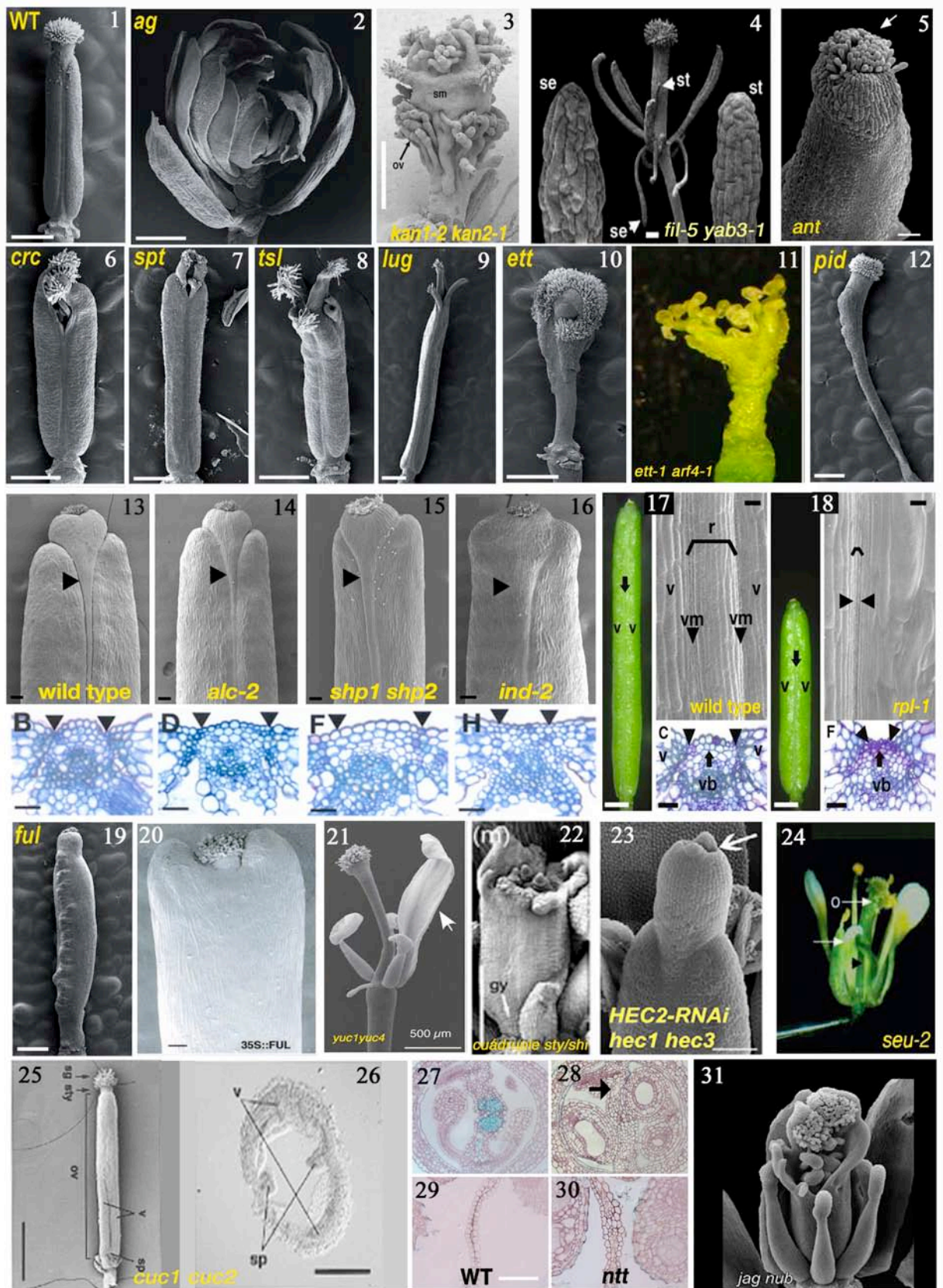


Fig. I-11: Fenotipos de varios mutantes afectados en el desarrollo del gineceo.

**Fig. I-11: (página anterior) Fenotipos de varios mutantes afectados en el desarrollo del gineceo.**

(1) Silvestre (**Wt**), (2) *agamous* (**ag**) en estadio 13 muestra el patrón (sépalos, pétalos, pétalos) sin estructuras carpeloides. Escala 0,5 mm. A partir de Ferrándiz *et al* (1999). (3) Fenotipo de pérdida de función KANADI tomado de Eshed *et al* (2001). *kan1 kan2* desarrollan septum externo y óvulos alrededor de la circunferencia abaxial del ovario y en su extremo apical. ov: óvulos, sm: septum. Escala 0,5 mm. (4) Fenotipo de la flor *fil-5 yab3-1* mutante. Se muestra la zona apical de los sépalos filamentosos (se, izquierda) y de los estambres (st, derecha). Escala 200  $\mu$ m. Tomado de Siegfried *et al* (1999). (5) Gineceo de mutante *ant-9* en estadio 12 tomado de Liu *et al* (2000). El mutante muestra papilas estigmáticas en menor cantidad y más cortas que el silvestre (flecha). (6) *crabs claw* (**cre**) en estadio 15. A partir de Ferrándiz *et al* (1999). (7) *spatula* (**spt**) en estadio 16. A partir de Ferrándiz *et al* (1999). Escala 0,5 mm. (8) *tousled* (**tsl**) en estadio 15. A partir de Ferrándiz *et al* (1999). Escala 0,5 mm. (9) *leunig* (**lug**) en estadio 17B. A partir de Ferrándiz *et al* (1999). Escala 0,5 mm. (10) *ettin* (**ett**) en estadio 15. A partir de Ferrándiz *et al* (1999). Escala 0,5 mm. Morfología típica del gineceo del doble mutante *ett-1 arf4-1* (11) tomado de Pekker *et al* (2005). (12) *pinoid* (**pid**) en estadio 16. A partir de Ferrándiz *et al* (1999). Escala 0,5 mm. Comparación del margen de valva tomado de la tesis de A. Roeder (2005). (13) Silvestre (wild type, Ler, estadio 17), la punta de flecha indica el distinguible margen de valva. (B) Sección transversal de un fruto silvestre (estadio 17) teñido con azul de toluidina mostrando claras constricciones en los márgenes, se distinguen la células pequeñas de la zona de separación y la lignificación de la zona lignificada del margen de valva. (14) zona apical del fruto mutante *alc-2*, muestra un margen de valva distinguible a pesar del fallo en la diferenciación de la zona de separación. (D) Sección transversal del fruto *alc-2*. (15) zona apical del fruto mutante *shp1 shp2*, muestra definido el margen de valva aunque existe menor diferenciación en la zona basal del fruto. (F) sección transversal del fruto *shp1 shp2* en la zona basal, muestra especificación reducida del margen de valva. (16) zona apical del fruto *ind1-2*, muestra reducción moderada de la definición del margen de valva. (H) sección transversal del fruto *ind1-2*. Fruto *rpl-1* (18) tomado de Roeder *et al* (2003). Se compara con fruto silvestre (17). La región del replum (flecha en 17 y delimitada en micrografía) contiene células estrechas similares a las del margen de valva. Sólo están afectadas las células externas, los vasos internos está presentes (vb en F). (19) *fruitfull* (**ful**) en estadio 17B. Escala 0,5 mm. A partir de Ferrándiz *et al* (1999). (20) La expresión constitutiva de FUL (**35S::FUL**) convierte las células del margen de valva y las del replum en células de valva por lo que los frutos 35S::FUL aparentan radialmente uniformes. Tomado de Ferrándiz *et al* (2000). Escala 100  $\mu$ m. (21) Flor típica *yuc1 yuc4*. Tomado de Cheng *et al* (2006). (22) Cuádruple mutante *sty/shi*. Tomado de Kuusk *et al* (2006). La flecha indica el ginóforo que es más alargado que el silvestre. Escala 100  $\mu$ m. (23) Gineceo del mutante *HEC2-RNAi hec1 hec3* en estadio 14. Se observa la ausencia de desarrollo estigmático y estilo más alargado que el silvestre. La flecha indica defectos en la fusión apical. Escala 100  $\mu$ m. Tomado de Gremski *et al* (2007). (24) Flor mutante *seu-2*. La punta de flecha indica el primer verticilo en mosaico estambre/ carpelo y la flecha el pétalo del segundo verticilo que es estaminoide y más pequeño que el silvestre. La punta del gineceo se encuentra sin fusionar exponiendo los óvulos (o). Tomado de Franks *et al* (2002). (25) Gineceo del doble mutante *cuc1 cuc2* tomado de Ishida *et al* (2000). Se observa la ausencia de replum en la mitad apical del gineceo. (26) sección transversal del gineceo *cuc1 cuc2*. sg: estigma, sty: estilo, ov: ovario, v: valva, sp: septum, o : óvulo. Secciones transversales de distintos estadios de desarrollo del tracto de transmisión teñidas con alcian blue y neutral red. Silvestre (27 y 29) y mutante *ntt* (28 y 30). Estadio 14 (27 y 28), estadio 17 (29 y 30). La flecha en 28 indica la aparición de espacios intercelulares entre el replum y el tracto de transmisión. Escala 50  $\mu$ m. Tomado de Crawford *et al* (2007). (31) Micrografía electrónica de barrido del gineceo en estadio 12 del doble mutante *jag nub*. Se observan defectos en el crecimiento de las valvas y óvulos expuestos apicalmente. Tomado de Dinneney *et al* (2006).

En la tabla I-2 se detalla una lista de los principales genes que participan en el desarrollo del gineceo, indicando la familia a la que pertenecen y las principales funciones que realizan en el gineceo.

## INTRODUCCIÓN

Gen	Locus ID	Familia	Función en el desarrollo del gineceo o el fruto
<i>AGAMOUS (AG)</i>	At4g18960	MADS-box	Especifica la identidad del carpelo
<i>AINTEGUMENTA (ANT)</i>	At4g37750	Tipo AP2	Promueve el crecimiento de los tejidos mediales junto con <i>LUG</i>
<i>ALCATRAZ (ALC)</i>	At5g67110	hélice-giro-hélice básica (bHLH)	Controla el desarrollo de la capa de separación del margen de valva. Promueve la lignificación de la capa <i>enb</i>
<i>AUXIN RESPONSE FACTOR 4 (ARF4)</i>	At5g60450	Factor de respuesta a auxinas (ARF)	Especifica identidad abaxial junto a <i>ETT</i> .
<i>CRABSCLAW (CRC)</i>	At1g69180	Dedos de zinc tipo YABBY con motivo HMG	Trabaja junto con los genes <i>KAN</i> en la represión de la expansión del desarrollo del tejido interno-medial a las regiones laterales del gineceo
<i>CUP-SHAPED COTYLEDONS1 (CUC1)</i>	At3g15170	Factor de transcripción de la familia NAC	Involucrado en separación de órganos en tallo y meristemas florales. Junto a <i>CUC2</i> involucrado en el desarrollo de óvulos, del septum y del replum.
<i>CUP-SHAPED COTYLEDONS2 (CUC2)</i>	At5g53950	Factor de transcripción de la familia NAC	Involucrado en separación de órganos en tallo y meristemas florales. Junto a <i>CUC1</i> involucrado en el desarrollo de óvulos, del septum y del replum.
<i>ETTIN (ETT) / ARF3</i>	At2g33860	Factor de respuesta a auxinas (ARF)	Promueve la formación del ovario inhibiendo la expresión de <i>SPT</i>
<i>FILAMENTOUS FLOWER (FIL)</i>	At2g45190	Dedos de zinc tipo YABBY con motivo HMG	Especifica identidad abaxial en el carpelo. Activa a <i>FUL</i> y <i>SHP</i> junto a <i>YAB3</i> y <i>JAG</i>
<i>FRUITFULL (FUL)</i>	At5g60910	MADS-box	Reprime la expresión en la valva de los genes de identidad del margen de valva. Promueve la lignificación de la capa <i>enb</i>
<i>HECATE 1, 2, 3 (HEC 1, 2,3)</i>	At5g67060 / At3g50330 / At5g09750	hélice-giro-hélice básica atípica (bHLH)	Regulan conjuntamente el desarrollo del tracto reproductivo femenino (estigma, estilo, tracto de transmisión y septum)
<i>INDEHISCENT (IND)</i>	At4g00120	hélice-giro-hélice básica atípica (bHLH)	Controla el desarrollo de la capa de separación y la capa lignificada del margen de valva. Promueve la lignificación de la capa <i>enb</i>
<i>JAGGED (JAG)</i>	At1g68480	factor de transcripción C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> zinc finger	Activa a <i>FUL</i> y <i>SHP</i> junto a <i>YAB3</i> y <i>FIL</i> . Promueve el crecimiento de las regiones laterales.
<i>KANADI 1,2 (KANI,2)</i>	At5g16560 / At1g32240	Tipo GARP	Reprime la expansión del desarrollo del tejido interno-medial a las regiones laterales del gineceo
<i>LEUNIG (LUG)</i>	At4g32551	Correpresor Tup1	Promueve el crecimiento de los tejidos mediales junto con <i>ANT</i>
<i>NO TRANSMITTING TRACT (NTT)</i>	At3g57670	factor de transcripción C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> /C <sub>2</sub> HC zinc finger	Involucrado en el desarrollo del tracto de transmisión
<i>NUBBIN (NUB)</i>	At1g13400	factor de transcripción C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> zinc finger	Especifica identidad adaxial. Promueve el crecimiento de las regiones laterales.
<i>PINOID (PID)</i>	At2g34650	Kinasa serina/treonina	Controla la localización polar de las proteínas PIN regulando el transporte polar de auxinas.
<i>REPLUMLESS (RPL)</i>	At5g02030	Homeodominio de la subfamilia BEL	Reprime la expresión en el replum de genes de identidad de margen de valva
<i>SEUSS (SEU)</i>	At1g43850	Correpresor LDB	Promueve el desarrollo del tejido marginal junto a <i>LUG</i>
<i>SHATTERPROOF 1,2 (SHP1,2)</i>	At3g58780 / At2g42830	MADS-box	Promueve el desarrollo del margen de valva, en parte a través de la activación de la expresión de <i>IND</i> y <i>ALC</i> . Promueve la lignificación de la capa <i>enb</i>
<i>SPATULA (SPT)</i>	At4g36930	hélice-giro-hélice básica (bHLH)	Promueve el desarrollo del tejido apical incluyendo el estilo, el estigma y el tracto de transmisión
<i>STYLISH 1,2 (STY1,2)</i>	At3g51060 (error en anotación) / At4g36260	Dedos de zinc tipo SHI	Promueve el desarrollo del estilo
<i>TOUSLED (TSL)</i>	At5g20930	Kinasa serina/treonina nuclear	Promueve las divisiones celulares durante la formación del estilo y durante la expansión a lo largo de los márgenes del carpelo
<i>YABBY3 (YAB3)</i>	At4g00180	Dedos de zinc tipo YABBY con motivo HMG	Especifica identidad abaxial en el carpelo. Activa a <i>FUL</i> y <i>SHP</i> junto a <i>FIL</i> y <i>JAG</i>
<i>YUCCA1,4 (YUC1,4)</i>	At4g32540 / At5g11320	Flavin monooxigenasa	Implicados en la biosíntesis de auxinas

**Tabla I-2. Principales genes que participan en el desarrollo del gineceo.**



## **8. NUEVAS FUNCIONES GÉNICAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DEL GINECEO. Los TOP, factores transcripcionales de la familia B3 implicados en el desarrollo del gineceo.**

A pesar del gran progreso que ha tenido lugar en los últimos años, aún quedan por resolver numerosos interrogantes acerca de la morfogénesis del gineceo y la fructificación. Una manera obvia de contribuir al esclarecimiento de estas cuestiones es desvelar la participación de nuevos moduladores genéticos, cuyas alteraciones provoquen perturbaciones morfológicas visibles. En esta tesis se ha realizado un esfuerzo para caracterizar funcionalmente dos miembros de una familia de factores transcripcionales implicados en el desarrollo del gineceo, la familia TOP.

La familia TOP pertenece a la gran familia de proteínas con dominio B3, por lo tanto a continuación se hace un breve resumen de los principales miembros de la misma.

El dominio B3 (número de acceso en Pfam, 02362) es un dominio de unión a DNA, descrito en un principio como exclusivo de plantas superiores (Bateman *et al.*, 2004), aunque en un trabajo todavía no publicado se ha descrito que este dominio también se encuentra en genes de musgos y algas verdes, indicando que el dominio B3 evolucionó en el linaje de las plantas antes de que existiera la multicelularidad (Thomas Jack, comunicación personal). Este motivo se ha caracterizado en un gran número de factores de transcripción de plantas. Los primeros dominios B3 se identificaron como una región de unos 120 residuos aminoacídicos altamente conservada cercana al extremo C-terminal en las proteínas ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3) de *Arabidopsis* y VIVIPAROUS 1 (VP1) del maíz (Giraudat *et al.*, 1992). Desde entonces, muchas proteínas que contienen dominios B3 se han clasificado funcionalmente como factores de respuesta hormonales, en concreto a ácido abscísico y a auxinas, fitohormonas que tienen papeles críticos en los procesos de desarrollo como el crecimiento de las plantas y la maduración de las semillas (McCarty *et al.*, 1989; Ulmasov *et al.*, 1997). Los dominios B3 se unen a secuencias específicas de DNA de seis pares de bases de longitud (Kagaya *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1997; Ulmasov *et al.*, 1997).

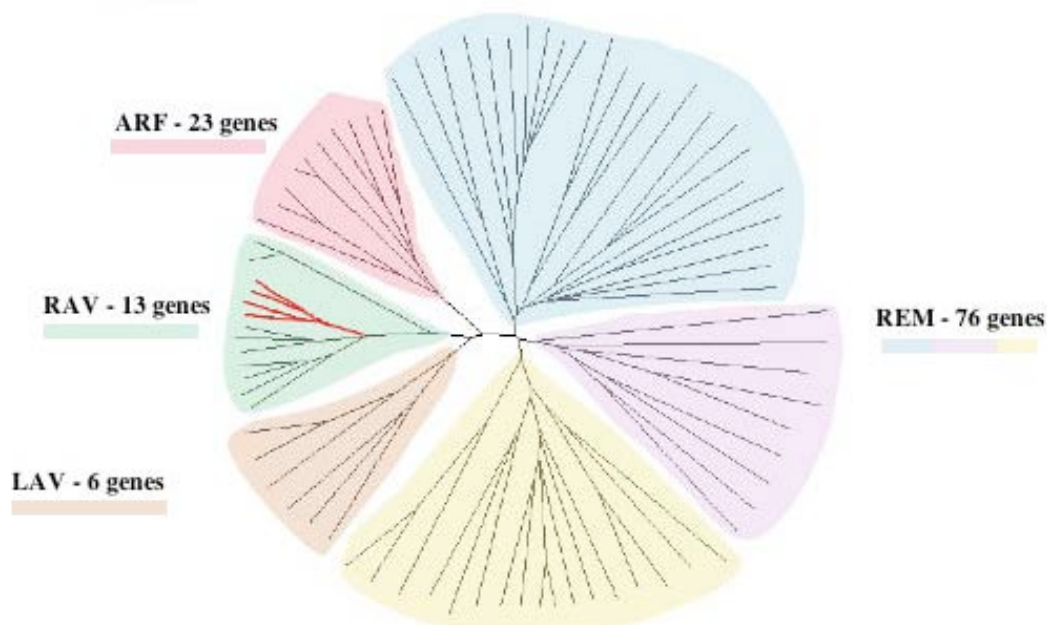
La superfamilia B3 contiene 363 miembros (según (Waltner *et al.*, 2005) ) de varias especies de plantas, agrupados en 16 arquitecturas estructurales distintas basadas en su asociación con otros dominios conservados (Bateman *et al.*, 2004). En un trabajo aún no publicado, Thomas Jack ha subdividido la superfamilia de B3 de *Arabidopsis* en 4 grupos; la familia LAV, la familia REM, la familia ARF y la familia RAV. Se utilizará esta subdivisión para explicar los aspectos básicos de los distintos miembros de la familia B3.

A pesar del gran número de genes con dominios B3 en el genoma de *Arabidopsis*, 118 miembros, sólo un número reducido de *loci* ha podido relacionarse con funciones determinadas.

---

### Superfamilia B3 en *Arabidopsis*

118 total



**Fig. I-12: Árbol filogenético de los miembros de la familia B3** agrupados en las distintas familias. Se ha destacado en rojo los miembros de la subfamilia TOP que se encuentran dentro de la familia RAV.

---

#### **8-1. Familia LAV.**

Dentro de la familia de LAV (*LEC2*, *ABI3*, *VAL*) (Luerßen *et al.*, 1998), formada por 6 miembros, podemos encontrar dos subgrupos; el subgrupo *LEC2/ABI3* y el subgrupo *VAL*. Así, *ABI3*, homólogo en todos sus dominios al gen *VPI* de maíz, y *FUS3* (*FUSCA3*) (Luerßen *et al.*, 1998) muy similar a *ABI3* en la región B3, aunque sin dominios adicionales, controlan diversos aspectos del desarrollo de la semilla, como la expresión de genes relacionados con su maduración, la adquisición de reservas, la dormancia y la resistencia a la desecación (Parcy *et al.*, 1997). Otro factor de transcripción que contiene un motivo B3 perteneciente a esta familia es *LEAFY COTYLEDON 2* (*LEC2*), que también juega un papel importante durante el desarrollo tanto temprano como tardío del embrión (Gaj *et al.*, 2005). Los dominios B3 de *ABI3*, *FUS3* y *LEC2* se unen a secuencias que contienen la denominada caja RY (CATGCA) (Tsukagoshi *et al.*, 2005). En el subgrupo *VAL*, *VAL1* (*VPI/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 LIKE*), también denominado *HSI2* (*HIGH-LEVEL EXPRESSION OF SUGAR-INDUCIBLE GENE 2*), es el mejor caracterizado. Dentro del subgrupo *VAL*, además de *VAL1*, podemos encontrar a *VAL2* y *VAL3*. Además del

dominio B3, *VAL1* posee otro motivo muy parecido a los motivos EAR (ERF-associated amphiphilic repression). Estos dominios están involucrados en la represión activa por parte de represores transcripcionales y de proteínas zinc-finger (Ohta *et al.*, 2001). Por lo tanto, parece ser que la proteína VAL1 y las proteínas relacionadas con dominio B3 y motivo EAR, podrían actuar como represores transcripcionales (Tsukagoshi *et al.*, 2005).

### **8-2. Familia REM.**

La familia REM está formada por 76 miembros que pueden dividirse en 6 grupos (A-F) en base a su relación filogenética.

El subgrupo A incluye 6 genes en *Arabidopsis*. Entre ellos se encuentra *VERNALIZATION1 (VRNI)* que es el único miembro de la familia REM del que se conoce su función (Levy *et al.*, 2002), el mantenimiento de la respuesta a vernalización en *Arabidopsis*.

El subgrupo C está formado por 18 miembros. Los genes del subgrupo C tienen tres características inusuales que los distinguen del resto de genes B3 de *Arabidopsis*. Primero, 9 de sus miembros están agrupados en el cromosoma 4 y otros 4 están agrupados en el cromosoma 2. Segundo, todos los miembros del grupo C excepto *REPRODUCTIVE MERISTEM 18 (REM18)* contienen más de una copia del dominio B3. Tercero, los genes del subgrupo C que se han analizado se expresan en elevados niveles en el meristemo del tallo después de la transición floral (Franco-Zorrilla *et al.*, 2002).

El miembro fundador de la familia REM, *BoREMI*, se aisló en *Brassica oleracea*. Posteriormente se caracterizó molecularmente *REMI*, el homólogo en *Arabidopsis* (Franco-Zorrilla *et al.*, 2002). La proteína REM1 posee un dominio B3 que se ha denominado REM, un dominio ácido cercano al extremo N-terminal, que se ha propuesto que funciona como un dominio de activación (Mitchell y Tjian, 1989) y dos motivos de residuos básicos parecidos a los NLSs de señalización nuclear (Raikhel, 1992) (Franco-Zorrilla *et al.*, 2002), lo que sugiere que *REMI* podría actuar como un regulador transcripcional. Además posee un dominio coiled-coil en el extremo C-terminal que sugiere que puede interactuar con otras proteínas (O'Shea *et al.*, 1989). El resto de los miembros de la familia se caracteriza por tener entre 1 y 6 motivos REM. Además, la mayoría tienen las regiones ácidas y NLSs potenciales aunque la región coiled-coil sólo aparece en los miembros que forman un grupo en el cromosoma 4.

Todavía no se han descrito fenotipos mutantes de pérdida de función de los genes del subgrupo C. El único resultado publicado es del mutante *rem1* que no tiene fenotipo obvio (Franco-Zorrilla *et al.*, 2002). Así mismo, tampoco la expresión ectópica de *REMI*, *REM3*, *REM4* ni los mutantes *rem3* ni *rem4* parecen tener fenotipo (datos no publicados de K. Swaminathan y T. Jack).

Los 52 miembros restantes de la familia REM no han sido caracterizados funcionalmente.

### **8-3. Familia ARF.**

La familia ARF está formada por 23 miembros. Esta familia ha sido la más estudiada dentro de la gran familia B3. Existen un gran número de revisiones acerca de la función de los ARFs (Guilfoyle y Hagen, 2007) (Liscum y Reed, 2002) y de su filogenia (Remington, 2005) (Wang *et al.*, 2007) (Liscum y Reed, 2002).

Las proteínas ARF (Auxin Response Factors) son factores de transcripción que se unen a los elementos de respuesta a auxinas (AREs, Auxin-Response Elements), localizados en los promotores de genes inducibles por auxinas (Ulmasov *et al.*, 1997; Ulmasov *et al.*, 1999) (Guilfoyle *et al.*, 1998). La secuencia consenso de los AREs es TGTCTC y se ha demostrado que para que la unión sea eficiente *in vitro* además del dominio B3 son necesarios otros aminoácidos de los extremos N y C terminal (revisado en (Guilfoyle y Hagen, 2007)).

La actividad de los ARFs está controlada por los Aux/IAA, genes de respuesta primaria a auxinas, que se unen a los ARFs bloqueando su capacidad de unión a DNA. En respuesta a las auxinas las proteínas AUX/IAA son degradadas mediante el mecanismo del complejo SCFTIR (Gray *et al.*, 2001) permitiendo que los ARFs se unan a los AREs y medien la activación o represión transcripcional de los genes correspondientes (Nag *et al.*, 2007).

Algunos ARF de función conocida son: *ARF2* (también conocido como *HLS1 SUPPRESSOR*, *HSS*) que actúa comunicando la ruta del etileno y de las auxinas para regular la flexión del hipocotilo (Li *et al.*, 2004); *ARF1*, que junto a *ARF2* está implicado en controlar aspectos de maduración y senescencia en la planta (Ellis *et al.*, 2005); *MONOPTEROS* (*MP/ARF5*) que está implicado en la formación de los haces vasculares y la iniciación del eje del cuerpo en el embrión en estadios tempranos (Hardtke y Berleth, 1998); *NON PHOTOTROPHIC HYPOCOTYL* (*NPH4*, también conocido como *ARF7*), necesario para el crecimiento diferencial de los tejidos aéreos de la planta (Harper *et al.*, 2000) y que está asociado con cambios en la sensibilidad a auxinas; *ARF6* y *ARF8/FRUIT WITHOUT FERTILIZATION* (*FWF*) que regulan la maduración de la flor (Nagpal *et al.*, 2005) y promueven la producción de ácido jasmónico, estando regulados por micro RNAs (Wu *et al.*, 2006). *FWF* ha sido implicado como regulador negativo de la iniciación del desarrollo del fruto, probablemente junto a *ARF6*, puesto que mutaciones en *FWF* (Vivian-Smith *et al.*, 2001) producen frutos partenocárpicos (Goetz *et al.*, 2006). Los únicos ARF asociados con el desarrollo del gineceo han sido *ETT* (*ARF3*) y *ARF4*, que junto a los *KANADI* promueven la identidad abaxial (Pekker *et al.*, 2005) en *Arabidopsis* y están implicados en la polaridad apical-basal. Generalmente los dobles mutantes de genes *ARF* relacionados (Remington, 2005) tienen fenotipos mucho más severos que los mutantes

simples indicando que dichos genes pueden tener funciones redundantes en *Arabidopsis* (Guilfoyle y Hagen, 2007).

#### **8-4. Familia RAV.**

La familia RAV está formada por 13 miembros. El primer gen caracterizado dentro de esta familia fue RAV1 (Related to ABI3/VP1), factor de transcripción relacionado con la respuesta al frío (Yamasaki *et al.*, 2004) que posee, aparte del dominio B3, otro dominio de unión a DNA tipo AP2 y que está reprimido por brasinoesteroides, actuando como un regulador negativo durante el crecimiento de la planta (Hu *et al.*, 2004). Se ha demostrado que los dominios B3 y AP2 de RAV1 y RAV2 (otro miembro de la familia RAV muy relacionado con RAV1) (Kagaya *et al.*, 1999; Okamura *et al.*, 1997 ) mantienen las actividades de unión a DNA de forma autónoma a los diferentes sitios de unión (CACCTG y CAACA respectivamente) (Kagaya *et al.*, 1999) aunque la unión a DNA de modo cooperativo mediante ambos dominios aumenta la eficiencia de la unión. También se ha postulado que el dominio B3 de RAV1 y RAV2 se podría unir a secuencias encontradas en los promotores de genes de respuesta a brasinoesteroides (Mouchel *et al.*, 2006; Vert *et al.*, 2005). Además de estar involucrados en las respuestas a brasinoesteroides, algunos miembros de la familia RAV han sido involucrados en las respuestas a etileno (Alonso *et al.*, 2003).

##### **8-4-1. La subfamilia TOP.**

Las proteínas TOP están dentro de la familia RAV por la similitud de los dominios B3. Sin embargo, la familia TOP forma un subgrupo dentro de la familia RAV ya que a diferencia del resto de sus miembros, que contienen dominios AP2, los TOP no poseen otros dominios de unión a DNA pero comparten otros motivos característicos de la subfamilia TOP de función desconocida.



## **II. ANTECEDENTES**

---





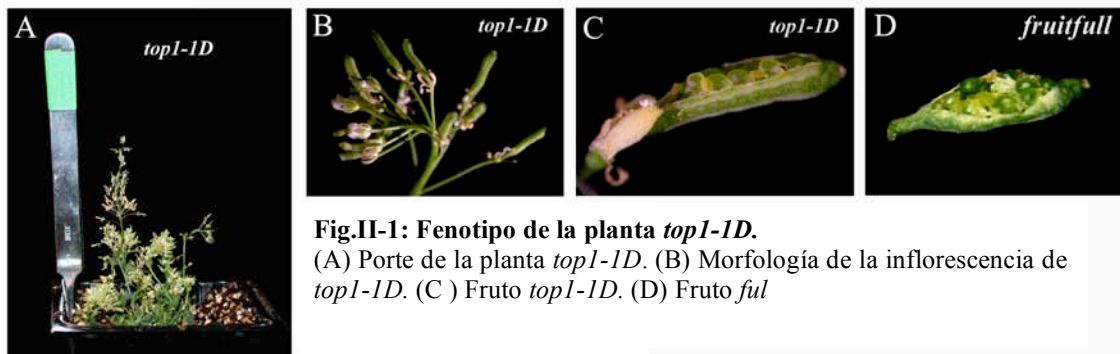
## II. ANTECEDENTES.

### 1. AISLAMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LA LÍNEA *top1-ID*.

En un trabajo previo al desarrollo de esta tesis se obtuvo la línea A904 (*top1-ID*). Esta línea se seleccionó durante el rastreo de una población de *Arabidopsis* mutagenizada mediante “activation tagging” (Weigel *et al.*, 2000).

Los vectores de T-DNA que se utilizaron en esta mutagénesis en concreto, contenían cuatro repeticiones seguidas del elemento “enhancer” del promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). La inserción del T-DNA en una región genómica puede provocar la activación de genes que se encuentren aguas arriba o aguas abajo de la inserción, dando lugar a la expresión ectópica y aumentada del gen o genes flanqueantes. Se obtienen, en ese caso, plantas con fenotipo dominante de ganancia de función, aunque a veces también se puede provocar la inactivación de genes.

La línea *top1-ID* fue seleccionada por presentar alteraciones notables en el desarrollo de los frutos. Éstas eran muy similares a las que ocurren en el mutante *fruitfull* (*ful*), que presenta frutos de reducido tamaño como resultado de la supresión del alargamiento de las células de la valva. En cambio, las células del replum y del septum continúan elongándose y como consecuencia, el replum de estos frutos se dispone en zig-zag (Gu *et al.*, 1998). Es frecuente que los frutos del mutante *ful* se rompan por la presión de las semillas en crecimiento.



**Fig.II-1: Fenotipo de la planta *top1-ID*.**

(A) Porte de la planta *top1-ID*. (B) Morfología de la inflorescencia de *top1-ID*. (C) Fruto *top1-ID*. (D) Fruto *ful*

La línea *top1-ID* también presentaba dichas alteraciones en los frutos; las valvas no elongaban correctamente, el replum adquiría forma de zig-zag, y los frutos se rompían por la presión de las semillas (Fig. II-1 C y D). Al analizar la generación T2 se observó que algunas plantas continuaban mostrando el fenotipo tipo *ful* en todos sus frutos mientras que otras mostraban un fenotipo atenuado, bien en todos o en parte de sus frutos. Así, en una misma planta era posible encontrar frutos con fenotipo tipo *ful* y frutos con un fenotipo menos severo. La atenuación del fenotipo solía incrementarse en generaciones posteriores (Fig. II-2). Así, aquellas plantas que mostraron el fenotipo *ful*

en la generación T2, en la siguiente generación mostraban un fenotipo más atenuado, bien en todos o en parte de sus frutos.

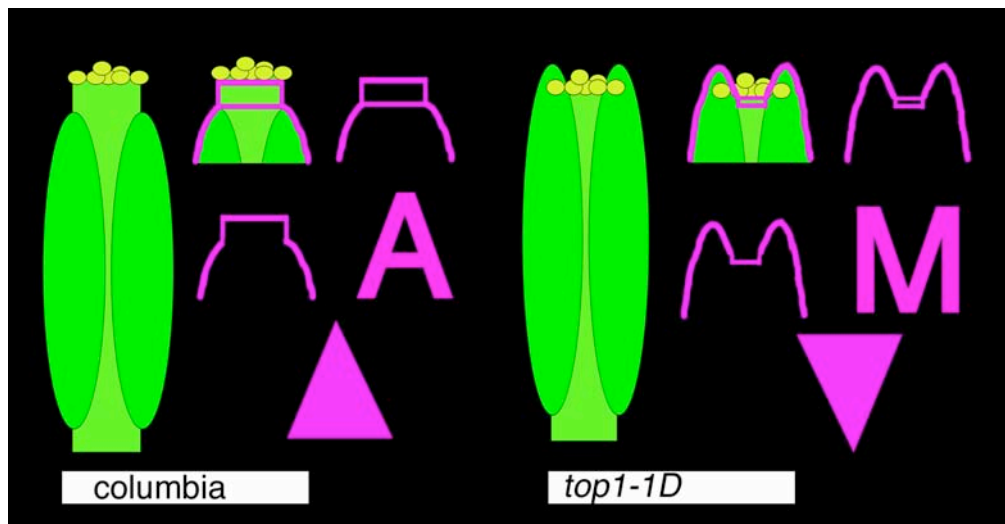


**Fig. II-2: Atenuación del fenotipo en el fruto de la líneas *top1-1D* en las generaciones siguientes.**

(A) Fotografías *in vivo*. Los dos frutos de la izquierda (T1) presentaban un fenotipo más severo que los dos frutos de la derecha (T4).

(B) Micrografías de frutos *top1-1D* con fenotipo menos severo.

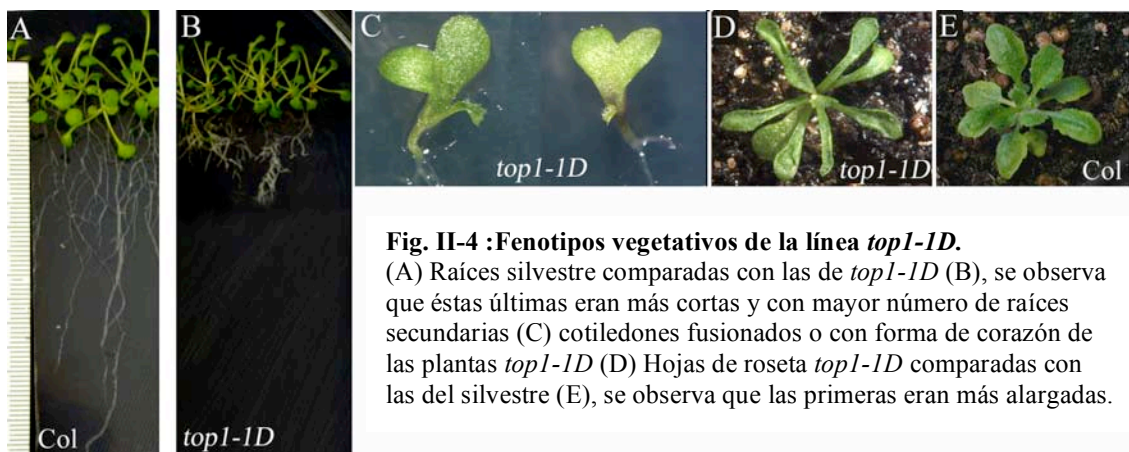
En los frutos silvestres la región más apical de las valvas se inserta en la base del estilo, sobresaliendo éste por encima de las valvas. En la figura II-3 se representa este tipo de inserción esquemáticamente como una A. En cambio en los frutos *top1-1D* con fenotipo menos severo, el estilo queda flanqueado por la parte más apical de las valvas, que en ocasiones supera la longitud del estilo. En la figura II-3 se representa este fenotipo esquemáticamente como una M. En estos frutos, además, la forma en zig-zag del replum era menos evidente o incluso desaparecía. (Fig. II-2 )



**Fig. II-3: Esquema explicativo de los fenotipos atenuados de los frutos *top1-1D*.** Se compara la inserción de las valvas en el estilo del silvestre y en la línea *top1-1D*. Mientras que en el silvestre (Col-0) el estilo sobresale por encima de las valvas, en la línea *top1-1D* el estilo quedaba flanqueado por las mismas.

Además de los fenotipos en el fruto, la línea *top1-1D* tenía otras alteraciones. Las plantas *top1-1D* tenían un porte menor que las silvestres, alteraciones en el gravitropismo y la dominancia apical, así como defectos en la elongación de los

entrenados y en la morfología de las inflorescencias (Fig. II-1 A y B). Las plantas *top1-ID* también mostraban una reducción en la longitud de las raíces y una proliferación de raíces laterales (Fig. II-4 B). Estas alteraciones están presentes por ejemplo, en mutantes como *superroot* en los que existe un aumento en la producción de auxinas (Boerjan *et al.*, 1995). Además, las plantas *top1-ID* presentaban en ocasiones cotiledones fusionados o con forma de corazón (Fig. II-4 C), similares a los que presentan mutantes como *cuc* (Aida *et al.*, 1997) o *stm* (Yanai *et al.*, 2005) con defectos en la organización de los dominios del SAM. Por otra parte, las plantas *top1-ID* también mostraban defectos en la morfología de las hojas, siendo éstas más alargadas y estrechas que en el silvestre y de un color verde más oscuro (Fig. II-4 D). Por último, las plantas *top1-ID* presentaban un elevado índice de mortalidad antes de completar el ciclo reproductivo, así como una reducida fertilidad en comparación con el silvestre.



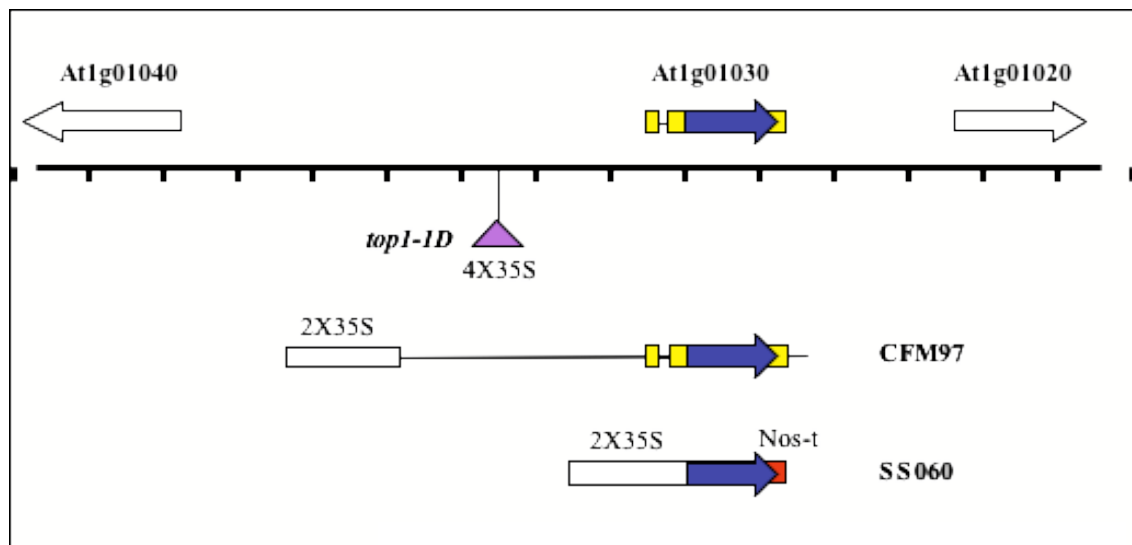
**Fig. II-4 : Fenotipos vegetativos de la línea *top1-ID*.**  
 (A) Raíces silvestre comparadas con las de *top1-ID* (B), se observa que éstas últimas eran más cortas y con mayor número de raíces secundarias (C) cotiledones fusionados o con forma de corazón de las plantas *top1-ID* (D) Hojas de roseta *top1-ID* comparadas con las del silvestre (E), se observa que las primeras eran más alargadas.

## 2. ANÁLISIS GENÉTICO DE LA LÍNEA *top1-ID*.

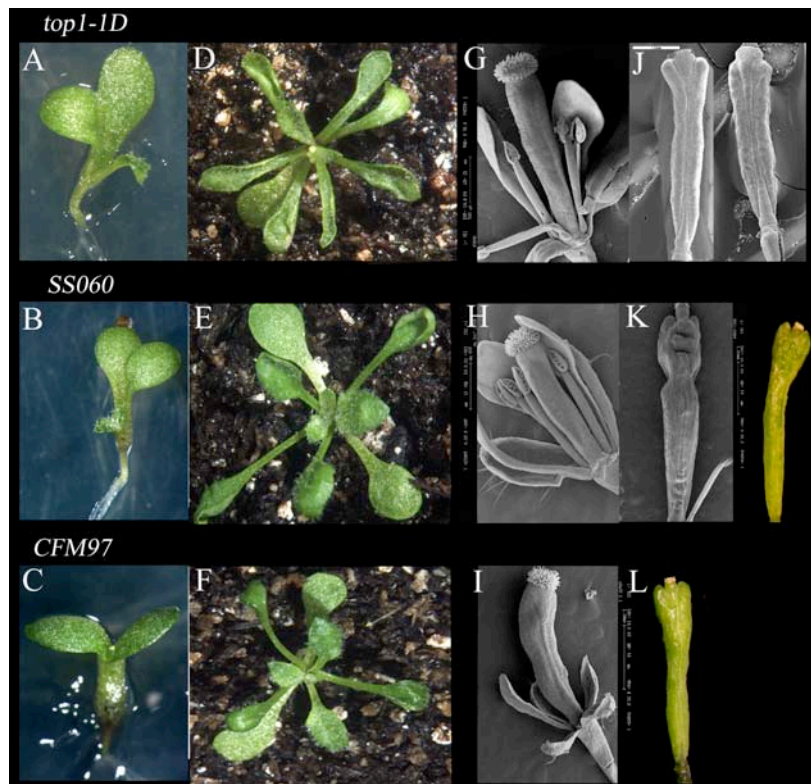
La línea *top1-ID* contenía una única inserción del T-DNA del “Activation tagging”, situada a 2,5 Kb aguas arriba del gen At1g01030. Mediante análisis Northern se detectó que la expresión de este gen se encontraba aumentada, pero no así la de otros genes adyacentes (Fig. II-5). At1g01030 codificaba un posible factor de transcripción con un dominio de unión al DNA de tipo B3. A este gen se le denominó *TOWER OF PISA 1 (TOP1)*.

Con el fin de comprobar que los fenotipos de la línea *top1-ID* eran debidos a la expresión aumentada de *TOP1*, se transformaron plantas silvestres de *Arabidopsis* con dos construcciones distintas, CFM97 y SS060. CFM97 consistía en un fragmento genómico (EcoRI/Pst) de 5,6 Kb que contenía 4 kb antes del ATG de la ORF (Open ReadinG Frame) de *TOP1*, la ORF, y 0,6 Kb después del STOP, bajo el control de dos promotores 35S (CaMv 35S) en tandem. Este fragmento estaba clonado en el vector binario pBIN-JIT (13Kb), derivado del pBIN19 (Clontech) (Ferrándiz *et al.*, 2000).

SS060 contenía el cDNA de *TOP1* bajo control de dos promotores 35S en tandem, clonado en el mismo vector.



**Fig. II-5:** Esquema indicando la localización de la inserción del T-DNA del “activation tagging” en la línea *top1-ID* (en morado). Esquema de las construcciones CFM97 y SS060 utilizadas para comprobar que *TOP1* era el gen afectado en la línea *top1-ID*.



**Fig. II-6:** Recapitulación del fenotipo de *top1-ID* mediante la expresión ectópica de *TOP1*. Las líneas SS060 y CFM97 mostraron cotiledones fusionados (A, B y C) y hojas de roseta alargadas y curvadas (D, E y F) al igual que *top1-ID*. Tanto la línea SS060 como la CFM97 reprodujeron los fenotipos severos en el fruto de *top1-ID* (G, H e I). Al igual que en el caso de *top1-ID* el fenotipo en el fruto se atenuaba en SS060 y CFM97 en las generaciones siguientes (J, K y L).

Tras analizar el fenotipo de las plantas transgénicas, se observó que tanto la línea CFM97 como la SS060 mostraban fenotipos similares a los de la línea *top1-ID* tanto en el desarrollo vegetativo, como en la filotaxis y en las inflorescencias. También mostraron atenuación del fenotipo con el paso de las generaciones (Fig. II-6). Por tanto,

se demostró que la expresión ectópica de *TOP1* era la causante de los fenotipos de las plantas *top1-ID*.

### **3. LA FAMILIA *TOP*.**

Se realizó una búsqueda en bases de datos de ESTs con el fin de conocer si existían otros genes de secuencia parecida a *TOP1*. Se encontraron tres: At4g01500, que se denominó *TOWER OF PISA 2 (TOP2)*; At3g61970, *TOWER OF PISA 3 (TOP3)*; y At2g46870, *TOWER OF PISA 4 (TOP4)*. *TOP1* y *TOP2* formarían un subgrupo dentro de la familia de los *TOP*, y *TOP3* y *TOP4* otro. Los cuatro genes forman una pequeña subfamilia dentro de la familia de factores de transcripción con dominio B3. Los cuatro codifican proteínas relativamente pequeñas que comparten varios motivos. Entre estos motivos se encuentra el dominio B3 descrito previamente (Fig. IV-2). El resto de motivos eran exclusivos de la subfamilia *TOP*.



### **III. OBJETIVOS**

---





### III. OBJETIVOS.

#### 1. Objetivo de esta tesis.

Como objetivo general de esta Tesis Doctoral se pretendió profundizar en la comprensión de las interacciones genéticas y moleculares implicadas en el desarrollo del gineceo, así como en la regulación de las distintas vías de señalización que afectan al mismo, mediante el estudio de dos de los miembros de la familia *TOP*; *TOP1* y *TOP2*. Se pretendía caracterizar en profundidad su función y establecer cuales eran las relaciones genéticas y moleculares de estos genes con otros identificados previamente, y que actúan en distintos aspectos del desarrollo del gineceo y el fruto de *Arabidopsis*.

Para ello, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Caracterización funcional de dichos genes mediante:

a- la obtención de líneas de pérdida y de ganancia de función de los mismos, y la caracterización fenotípica de dichos mutantes.

b- Determinación del patrón de expresión espacio-temporal de *TOP1* y *TOP2*.

- 2) Estudio de la posición de los genes *TOP1* y *TOP2* dentro de las redes genéticas que contribuyen al desarrollo del gineceo de *Arabidopsis*, analizando las interacciones genéticas entre *TOP1* *TOP2* y otros genes ya caracterizados, mediante la generación de diversas combinaciones mutantes y la determinación de los patrones de expresión de los distintos genes implicados en diferentes fondos genéticos.

- 3) Determinación de otros factores que puedan interactuar físicamente con los genes *TOP* mediante el escrutinio de una librería de doble híbrido.



## **IV. RESULTADOS**

---

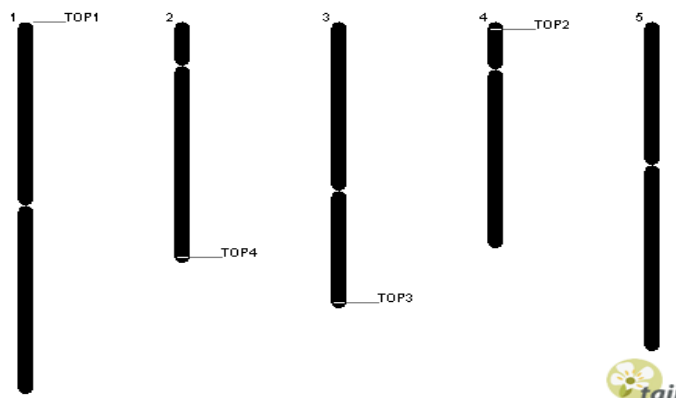


**IV. RESULTADOS.**

**1. ANÁLISIS *IN SILICO* DE LOS GENES *TOP*.**

**La subfamilia *TOP*.**

La subfamilia *TOP* está formada por cuatro miembros: *TOP1* (At1g01030), *TOP2* (At4g01500), *TOP3* (At3g61970), y *TOP4* (At2g46870), localizados en cuatro de los cinco cromosomas de *Arabidopsis*. En la figura IV-1 se muestra un esquema de la localización de los distintos genes *TOP* en los cromosomas de *Arabidopsis*, a partir de lo publicado en el *TAIR*. En esta figura se puede observar que los cuatro genes se localizan en regiones cercanas al telómero.



**Fig. IV-1: Localización de los genes *TOP* en los cromosomas de *Arabidopsis*.**  
*TOP1* en el cromosoma 1,  
*TOP2* en el cromosoma 4,  
*TOP3* en el cromosoma 3 y  
*TOP4* en el cromosoma 2.  
 Modificado a partir de lo publicado en el *TAIR*.

Como ya se ha explicado, los genes *TOP* forman una pequeña subfamilia de factores de transcripción perteneciente a la gran familia de factores de transcripción con dominio B3. Los cuatro miembros codifican proteínas relativamente pequeñas (Fig. IV-2), en las que no se puede identificar ningún motivo ya descrito mas que el motivo B3 que es un dominio de unión a DNA exclusivo de plantas (Bateman *et al.*, 2004). La subfamilia *TOP* también ha sido denominada *NGATHA* (Alvarez *et al.*, 2006).



**Fig. IV-2: Esquema de los dominios encontrados en las proteínas *TOP*, a partir de lo publicado en el Pfam.**  
*TOP1* (358 residuos aminoácidos).  
*TOP2* (328 residuos aminoácidos).  
*TOP3* (299 residuos aminoácidos).  
*TOP4* (310 residuos aminoácidos).

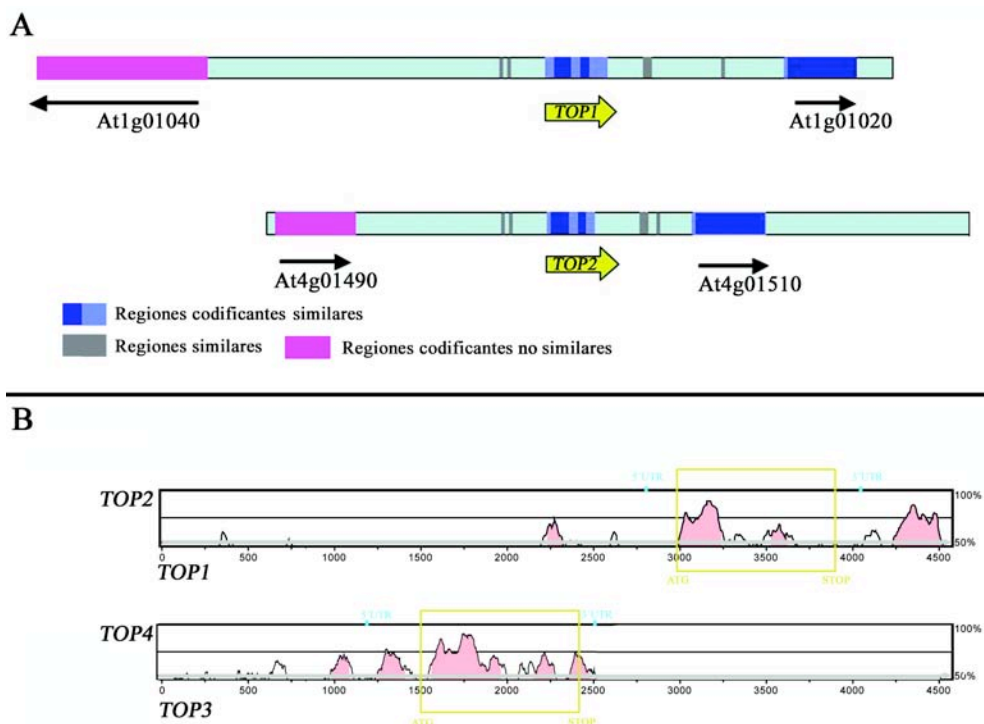
Los genes *TOP* evolucionaron de forma que dentro de la familia *TOP* se pueden encontrar dos subgrupos. Según la homología en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos, *TOP1* y *TOP2* formarían uno de los subgrupos y *TOP3* y *TOP4* otro.

## RESULTADOS

Dentro de la familia *TOP* el miembro que podría considerarse más ancestral sería *TOP1*. Además, es el único que posee dos exones y un intrón (Fig. IV-6).

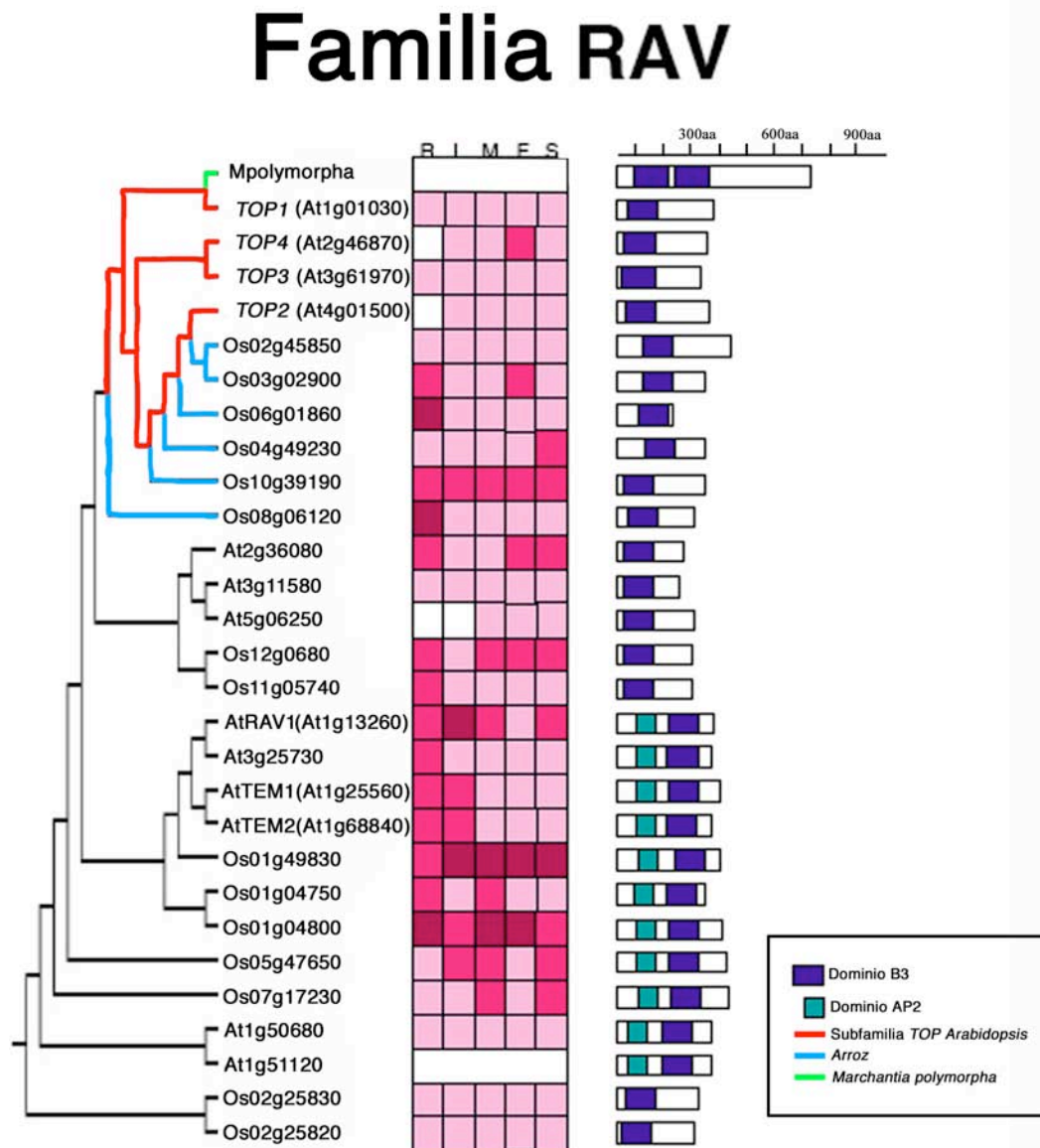
La homología de secuencia entre los genes *TOP* se extiende a las regiones reguladoras. De nuevo, las regiones promotoras de *TOP1* y *TOP2* son más parecidas entre sí, y las de *TOP3* y *TOP4* entre sí. En la figura IV-3B se muestra la comparación de las secuencias genómicas de *TOP1* frente a *TOP2* y de *TOP3* frente a *TOP4*. En la figura IV-3A se incluyen los genes adyacentes a *TOP1* y *TOP2*. Mientras que At1g01040 y At4g01490 no están relacionados, At1g01020 y At4g01510 codifican proteínas homólogas ARE2 REQUIERED FOR VIABILITY1 (ARV1) y ARV2, similares a Arvp1 implicada en la regulación de la homeostasis celular de los lípidos en *Saccharomyces cerevisiae* (Fores *et al.*, 2006) (Tinkelenberg *et al.*, 2000).

En el trabajo de Thomas Jack (ver introducción) se ha colocado a la subfamilia *TOP* dentro de la familia *RAV* por la similitud de los dominios B3 (Fig IV-4). Sin embargo, los miembros de la familia *TOP* formarían un subgrupo dentro de la familia *RAV* ya que, a diferencia del resto de miembros que poseen dominios AP2, los *TOP* no poseen otros dominios de unión a DNA mas que el B3.



**Fig. IV-3:** (A) esquema representativo de las regiones genómicas de *TOP1* y *TOP2*. Las regiones en azul oscuro representan regiones codificantes de elevada similitud entre *TOP1* y *TOP2*. Las regiones en azul claro representan regiones codificantes de menor similitud entre *TOP1* y *TOP2*. Las regiones en gris representan regiones no codificantes de elevada similitud entre *TOP1* y *TOP2*. Las regiones en rosa representan regiones codificantes no similares. Se detallan los genes adyacentes a *TOP1* y *TOP2*. (B) Comparación de las secuencias genómicas de *TOP1*, *TOP2*, *TOP3* y *TOP4*. Se compara *TOP1* con *TOP2* y *TOP3* con *TOP4*. Las secuencias genómicas incluyen las regiones 5' y 3', se ha destacado en amarillo la ORF.

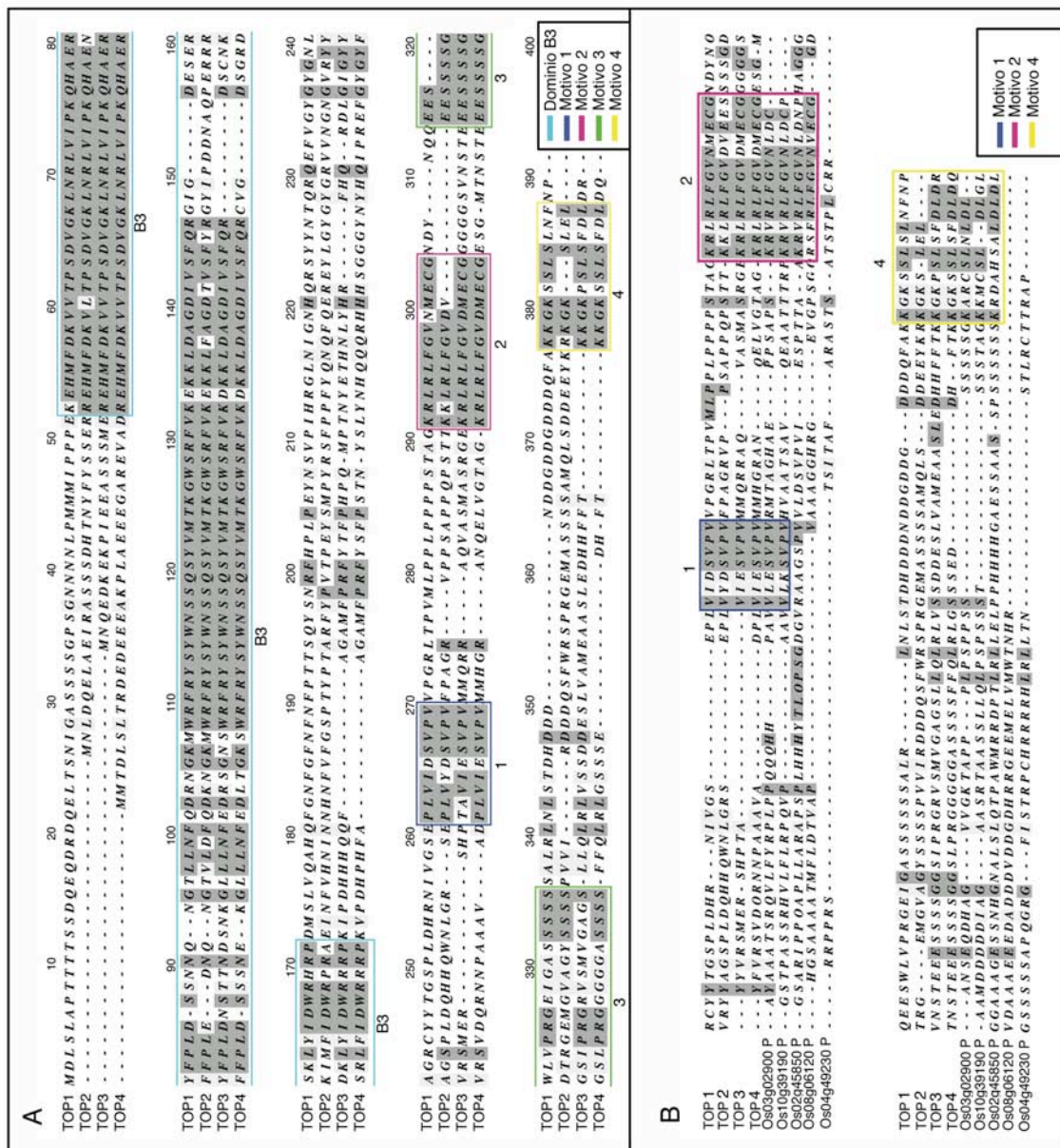
En la figura IV-5 se muestra un alineamiento realizado con las secuencias de las distintas proteínas TOP. En este esquema se han destacado en distintos colores los distintos motivos que se encuentran en las proteínas TOP, además del motivo B3 (destacado en azul). Se pueden encontrar 4 motivos más, coloreados en; añil (motivo 1), morado (motivo 2), verde (motivo 3) y amarillo (motivo 4). Cabe destacar que el motivo 4 tiene una secuencia similar a los motivos tipo EAR (Ohta *et al.*, 2001) (Tsukagoshi *et al.*, 2005) (Kieffer *et al.*, 2006).



**Fig. IV-4 : Árbol filogenético de la familia RAV.** Modificado a partir de lo descrito por Thomas Jack. Los cuadros rosas indican los niveles de expresión en diferentes tejidos; R: raíz, L: hoja, M: meristemo del tallo, F: flor, S: semilla. A la derecha se encuentran esquemas de las proteínas indicando los dominios B3 y los dominios AP2. Se han destacado los genes *TOP* en rojo y sus homólogos de arroz en azul y de *Marchantia polymorpha* en verde.

# RESULTADOS

En el genoma del arroz se encuentran 6 genes muy similares a los genes *TOP* de *Arabidopsis* y que como éstos, no poseen dominios AP2 (Fig. IV-4). Estos genes son: Os02g45850, Os03g02900, Os06g01860, Os04g49230, Os10g39190, Os08g06120. De las 6 proteínas de arroz, 2 de ellas comparten el motivo 1 (Os10g39190 P y Os03g02900 P), 4 de ellas el motivo 2 (Os10g39190 P, Os08g06120 P, Os02g45850 P y Os03g02900 P) y 3 de ellas el motivo 4 que es parecido al motivo EAR (Os10g39190 P, Os02g45850 P y Os03g02900 P) (Fig. IV-5 B). La proteína Os06g01860 P es muy pequeña (143 aa) y no se ha utilizado en este alineamiento.



**Fig. IV-5: Alineamientos de secuencias proteicas.** (A) Alineamiento de las secuencias de las proteínas TOP de *Arabidopsis*. Se ha destacado el dominio B3 y los distintos motivos característicos de las proteínas TOP. (B) Alineamiento de las regiones C-terminales de las proteínas TOP en *Arabidopsis* y sus homólogos en Arroz.



Por otra parte, cabe destacar que los dominios B3 de los TOP son muy similares al dominio B3 de la proteína Q8H6E4 de la planta dioica *Marchantia polymorpha*, aunque en este caso, la proteína tiene dos dominios B3 (Ishizaki *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2001) (Fig. IV-4).

## **2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES TOP.**

### **2-1. Obtención de líneas de pérdida de función.**

Al inicio del trabajo en las bases de datos de secuencias flanqueantes de inserción no se encontró ninguna que correspondiera a *TOP1* o a *TOP2* por lo que se buscaron mutantes de pérdida de función en este locus por otros medios. Para ello, se rastrearon colecciones de mutantes por inserción de elementos transponibles. Asimismo, se consultaron periódicamente las actualizaciones de las bases de datos de secuencias flanqueantes de inserción que en fases posteriores de desarrollo de esta tesis permitieron identificar mutantes en colecciones de inserción de T-DNA.

#### **2-1-1. Búsqueda de mutantes en colecciones disponibles.**

##### **Mutantes por inserción de elementos transponibles.**

Dentro del trabajo previo a esta tesis se realizó una búsqueda de mutantes dentro de la colección AMAZE (Wisman *et al.*, 1998) del instituto Max Planck de Colonia (Alemania). Esta colección fue generada mediante la inserción del transposón En-1/Spm (En-1, acc. M25427) en su forma activa (Cardon *et al.*, 1993), lo que provoca mutaciones al azar en el genoma de *Arabidopsis* (Col-0).

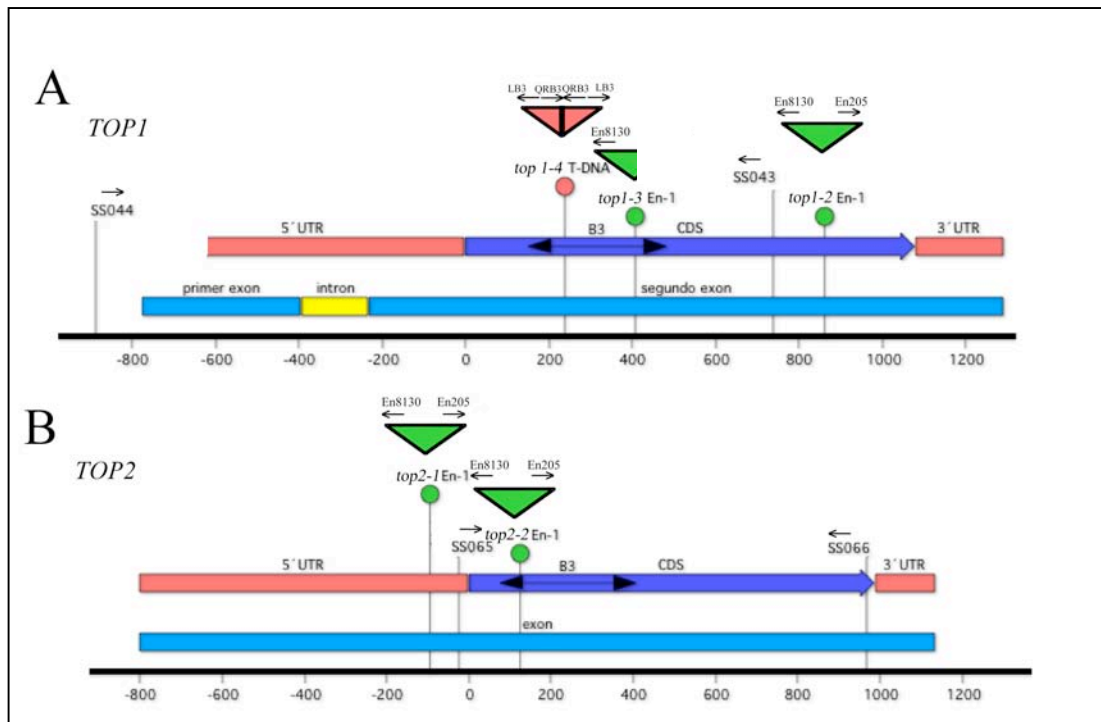
Un problema que puede acarrear este tipo de mutaciones es que la transposasa codificada por el elemento autónomo En-1 produce inserciones inestables. La escisión completa puede resultar en la recuperación total del genotipo silvestre si ésta ocurre en células de la línea germinal, o en la aparición de mosaicos de tejido silvestre y mutante si ésta ocurre en células de la línea somática. Las escisiones germinales son raras, mientras que las que provocan sectores de reversión somática son frecuentes (Meissner *et al.*, 1999). Por otro lado, las escisiones pueden ser parciales, en cuyo caso se generan pequeñas deleciones o inserciones estables (huellas de escisión) que pueden afectar a la pauta de lectura del gen afectado. Este tipo de alelos estables eran los más adecuados para nuestro estudio.

En la colección AMAZE se encontraron dos líneas con inserciones independientes del transposón en *TOP1* (I-333 y I-125) y dos líneas con inserciones independientes del transposón en *TOP2* (I-304 y I-711). Para determinar la estabilidad de dichas inserciones, se analizó la tercera generación resultante de la autofecundación de las líneas encontradas. Para ello se partió de una planta homocigótica para la inserción de cada una de las líneas, y tras tres generaciones autofecundadas se buscaron los mutantes en la progenie.

## RESULTADOS

Para realizar la búsqueda de alelos mutantes se siguió una estrategia basada en la PCR utilizando cebadores específicos de la secuencia de *TOP1* o *TOP2*, según la línea a rastrear, y cebadores específicos de la secuencia de En-1, para determinar si En-1 se había escindido o no y, en el primer caso, si había dejado una huella de escisión. Las condiciones de PCR que se utilizaron (aptdo. 2-3-2-1 de Mat.y Met.) no permitían la amplificación de regiones grandes, de forma que en el caso de existir una inserción intacta del En-1, como ésta sería de 8Kb no se detectaría producto de PCR, mientras que posibles huellas de escisión de la misma, de menor tamaño, sí.

En la figura IV-6 se muestra un esquema de la localización de los cebadores utilizados para *TOP1*, *TOP2* y En-1, así como la localización y orientación de las distintas inserciones de En-1. La secuencia de los cebadores utilizados se detalla en el anexo I.



**Fig. IV-6: Esquema de la localización de las inserciones en la secuencia de los genes *TOP1* (A) y *TOP2* (B)** En color verde se muestran las inserciones del transposón En-1 (*top1-3*, *top1-2*, *top2-1* y *top2-2*), y en color rosa la inserción de T-DNA (*top1-4*). También se muestra la localización de los cebadores utilizados en su escrutinio (→).

En el caso de *TOP1*, se utilizaron los cebadores SS044 y SS043 (Fig. IV-6 A), específicos de la secuencia de *TOP1*, y En 8130 y En205, específicos de la secuencia del transposón. SS044 aparece en la posición -890 de la secuencia de *TOP1* (el primer nucleótido que se transcribe se define como número 1) y SS043 aparece en la posición 738. En205 aparece en la región 5' del transposón y En 8130 aparece en la región 3'.

Para la línea I-333, utilizando los cebadores SS044 y SS043, se analizaron unas

500 plantas y en ninguna de ellas se produjo la amplificación de 1,5 Kb del silvestre, lo que significaba que el transposón no se había escindido en ningún caso. Esto indicaba que la frecuencia de escisión del En-1 en esta línea era muy baja; por lo tanto, asumimos que era poco probable que se produjeran fenotipos en mosaico por la escisión del transposón. Para comprobar la localización de la inserción del transposón y la orientación de la misma, se utilizaron distintas combinaciones de los cebadores SS044, SS043, En 8130 y En205. De esta forma, la inserción del transposón En-1, intacto y en orientación inversa, se localizó a 861 pares de bases del ATG de *TOP1* (Fig. IV-6 A). Este alelo se denominó *top1-2*.

Para la línea I-125, utilizando la combinación de cebadores SS044 y SS043, se encontró una planta en la que se amplificó un producto de 2 Kb, mientras que el fragmento amplificado en el silvestre era de 1,5 Kb. Este hecho indicaba la existencia de una posible huella de escisión del transposón; para comprobarlo, se utilizaron distintas combinaciones de los cebadores SS044, SS043, En 8130 y En205. Con los cebadores SS044 y En8130 se amplificó un producto de 1,2 Kb, confirmando la existencia de una huella de escisión. Se secuenció el producto de PCR amplificado con los cebadores SS044 y SS043 para determinar la posición, la orientación, el tamaño y la secuencia de dicha huella. Así se observó que la escisión defectuosa del elemento transponible En-1 había dejado una inserción de 427 pares de bases del transposón, en la posición 407 de la región codificante del gen *TOP1* (Fig. IV-6 A). La región insertada del transposón se corresponde con la secuencia comprendida entre el nucleótido 7860 al 8287 del mismo, en orientación inversa (3' → 5'). Este alelo se denominó *top1-3*.

En el caso de *TOP2*, se utilizaron los cebadores SS065 que aparece en la posición -2 y SS066 que aparece en la posición 967 (Fig. IV-6 B), específicos de la secuencia de *TOP2*, y En 8130 y En205, específicos de la secuencia del transposón.

Tanto en la línea I-304 como en la I-711 se analizaron unas 500 plantas y en ninguna de ellas se encontraron escisiones del transposón. De nuevo, la frecuencia de escisión del En-1 era muy baja por lo que asumimos que era poco probable que se produjeran fenotipos en mosaico. Se utilizó la misma estrategia que en las líneas de *TOP1* para confirmar la localización de la inserción del transposón, así como la orientación de la misma. Se encontraron dos alelos mutantes en el gen *TOP2*, *top2-1* y *top2-2*.

En el caso de *top2-1*, la inserción del transposón En-1, intacto y en orientación inversa, se localizó a -99 pares de bases del ATG de *TOP2* (Fig. IV-6 B).

En *top2-2*, la inserción del transposón En-1, intacto y en orientación inversa, se localizó a 171 pares de bases del ATG de *TOP2* (Fig. IV-6 B).

La caracterización posterior de los mutantes *top* se realizó en plantas homocigóticas para las distintas mutaciones, que se determinaron utilizando las combinaciones de cebadores antes mencionadas, según el caso.



Fig. IV-7: (A) Localización de las inserciones de T-DNA (*top1-4*) y del transposón En-1 (*top1-3* y *top1-2*) en la secuencia de nucleótidos de *TOP1*. (B) Localización de las inserciones del transposón En-1 (*top2-1* y *top2-2*) en la secuencia de nucleótidos de *TOP2*. Se destaca en amarillo el dominio B3.

### Mutantes por inserción de T-DNA.

Se encontró una línea mutante por inserción de T-DNA en el gen *TOP1* (Garlic\_232E10). Para caracterizar este alelo mutante, se siguió la misma estrategia utilizada para los mutantes por inserción de transposones; en ella, las condiciones de PCR que se utilizaron (aptdo. 2-3-2-1 de Mat.y Met.) no permitían la amplificación de fragmentos grandes, como es el caso del T-DNA (> 7,5 Kb).

Se utilizaron los cebadores SS044 y SS043 (Fig. IV-6A y anexo I ) específicos de la secuencia de *TOP1*, y cebadores específicos de la secuencia del T-DNA, en concreto, RB3, que aparece en el borde derecho del T-DNA, y LB3 que aparece en el borde izquierdo. Con esta estrategia se pretendía confirmar si la inserción se encontraba realmente en el sitio predicho ( Fig. IV-6A), determinar la orientación de la inserción y detectar las plantas homocigóticas para la inserción.

Primero se utilizó la combinación de cebadores SS044 y SS043 (Fig. IV-6A) para determinar las plantas que tenían la inserción del T-DNA, que serían aquellas en las que no se obtuviera el producto de 1,5 Kb . Posteriormente, se determinó cuáles de las plantas con inserción eran homocigóticas para la misma, así como la orientación y localización del T-DNA. Se utilizaron las distintas combinaciones posibles de los cebadores SS044, SS043, QRB3 y LB3.

Se identificaron plantas en las que la combinación SS044/LB3 amplificó una región de 1,2 Kb y la combinación SS043/LB3 amplificó un producto de 600 pb, lo que suponía que en esta línea debía de haber al menos dos inserciones de T-DNA, en orientaciones opuestas, en la posición 238 de la región codificante de *TOP1*. Este alelo mutante para *TOP1*, se denominó *top1-4*.

Por lo tanto, y a modo de resumen, para el desarrollo de esta tesis se dispuso de 3 alelos mutantes de *TOP1*; *top1-2*, *top1-3* y *top1-4*, y dos alelos mutantes de *TOP2*; *top2-1* y *top2-2*. En la figura IV-7 A y B se muestra, con una flecha roja, la localización de las distintas inserciones en la secuencia de nucleótidos de *TOP1* y *TOP2* respectivamente. En esta figura se ha destacado la región del dominio B3 en amarillo.

### **2-1-2. Descripción preliminar de los fenotipos de *top1-2*, *top1-3*, *top1-4*, *top2-1* y *top2-2*.**

Un análisis preliminar de los fenotipos de los mutantes de pérdida de función *top1-2*, *top1-3*, *top1-4*, *top2-1* y *top2-2* reveló que éstos no eran muy diferentes del silvestre en cuanto al tamaño de las plantas, la forma de las hojas y el tiempo de floración, sin embargo los frutos presentaban alteraciones morfológicas. Los mutantes *top1-2* y *top1-3* presentaban una gran variabilidad en la longitud de sus frutos dentro de la misma planta, encontrando frutos de tamaño parecido al silvestre y otros de menor longitud (Fig. IV-11). La longitud media de los frutos de los otros alelos mutantes, fue más homogénea y más parecida a la del silvestre. Además de estas alteraciones en el

tamaño se observó que los mutantes *top* mostraban con gran frecuencia estilos inclinados, que recordaban a la Torre de Pisa (de ahí su nombre).

### **2-1-3. Estudio del efecto de las inserciones en los alelos de los genes *TOP1* y *TOP2*.**

Para determinar el efecto de las inserciones del transposón En-1 y del T-DNA en la transcripción de *TOP1* y *TOP2* se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa (aptdo. 2-3-3 mat. y mét.) los niveles de mRNA de cada uno de los distintos mutantes. Para ello se realizó una extracción de RNA total de las inflorescencias de los distintos alelos mutantes, se sintetizó cDNA a partir del mismo y este se utilizó para amplificar los diferentes transcritos de los genes en condiciones no saturantes. Como control de la transcripción se utilizó el gen de la TUBULINA3 (Dinney *et al.*, 2004). En la figura IV-8 se muestra la localización de los distintos cebadores utilizados (IV-8 A, en el caso de *TOP1* y B, para *TOP2*). La secuencia de todos los cebadores utilizados se detalla en el anexo I. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura IV-9.

El gen *TOP1* tiene un único intrón que separa el primer exón, que comprende la mayor parte de la región 5' no codificante, y el segundo exón, que comprende el resto de la región 5', la región 3' y la región codificante. El gen *TOP2*, sin embargo, no tiene intrones.

Para el gen *TOP1* se utilizaron distintas combinaciones de los cebadores oMT1 y oMT2, que aparean en el ATG y en el STOP de *TOP1* respectivamente, y los cebadores SS079 y SS080, que aparean a -473 pb, dentro del primer exón, y a 202 pb, dentro del segundo exón de *TOP1* respectivamente para descartar la posible contaminación con genómico. La región en la que aparea el cebador SS080 es previa tanto a la huella de escisión del transposón en *top1-3* como a la inserción del T-DNA en *top1-4*.

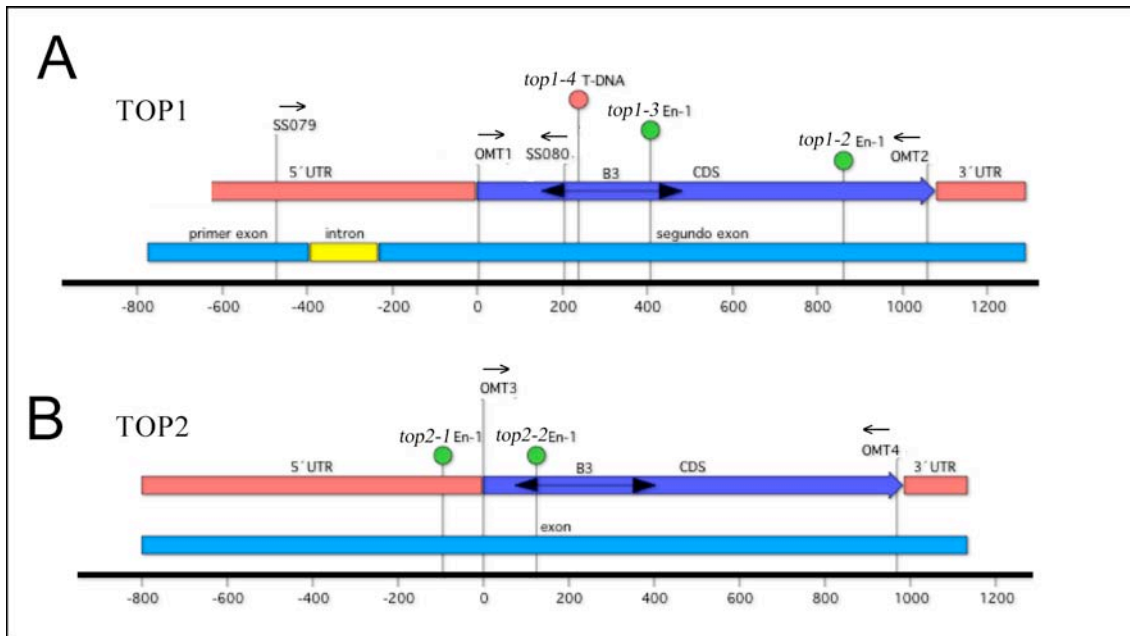
Con las combinaciones de cebadores oMT1/oMT2 y SS079/oMT2 se comprobó que en el mutante *top1-3* no se producía la transcripción del mRNA completo de *TOP1* y que no había contaminación de genómico (Fig. IV-9 A). Sin embargo, con la combinación de cebadores SS079/SS080 se comprobó que había transcripción de un mRNA truncado, aunque que en menor cantidad que en el silvestre (Fig. IV-9 A).

Con las combinaciones de cebadores oMT1/oMT2 y SS079/oMT2 se comprobó que en el mutante *top1-4* no se producía la transcripción del mRNA completo de *TOP1* y que no había contaminación de genómico (Fig. IV-9 A). Con la combinación de cebadores SS079/SS080 se comprobó que había transcripción de un mRNA truncado, en este caso en igual cantidad que en el silvestre (Fig. IV-9 A).

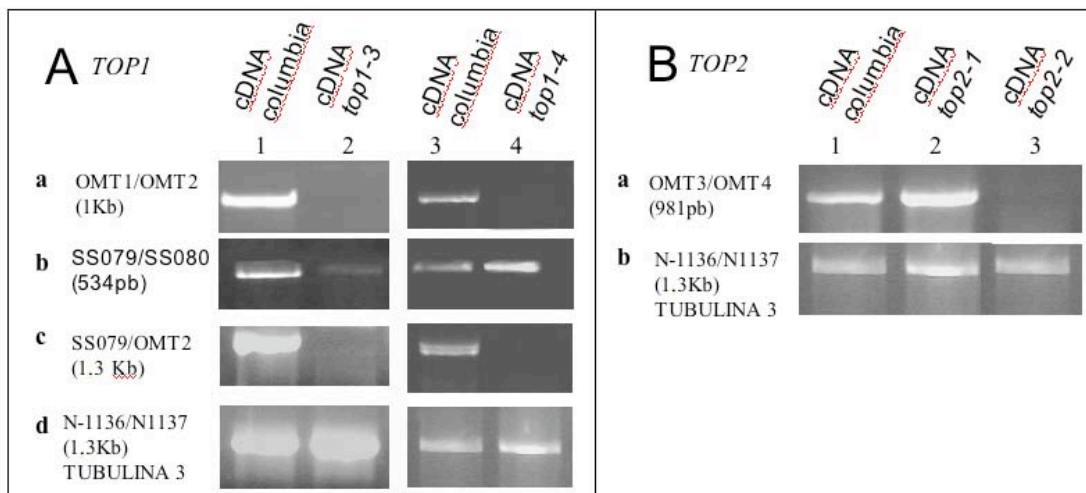
Para el gen *TOP2*; se utilizaron los cebadores oMT3 y oMT4 que aparean en el ATG y en el STOP de *TOP2* respectivamente.

Con la combinación de cebadores oMT3/oMT4 se comprobó que en el mutante *top2-1* sí se producía la transcripción del mRNA completo de *TOP2* (Fig. IV-9 B). En

cambio, en el mutante *top2-2* no se producía la transcripción del mRNA completo de *TOP2* (Fig. IV-9 B).



**Fig. IV-8:** Localización de los cebadores (→) utilizados en las RT-PCRs de los alelos mutantes de *TOP1*: *top1-3*, *top1-2* y *top1-4* (A), y de *TOP2*: *top2-1* y *top2-2* (B).



**Fig. IV-9:** Análisis de la expresión de *TOP1* y *TOP2*. En todas las PCRs se utilizó como control el gen de la TUBULINA3 (cebadores N-1136 y N-1137)

**A:** *TOP1*: comparamos la expresión de *TOP1* en Col-0 (calles 1 y 3) frente a la expresión en *top1-3* (calle 2) y *top1-4* (calle 4) con distintas parejas de cebadores.

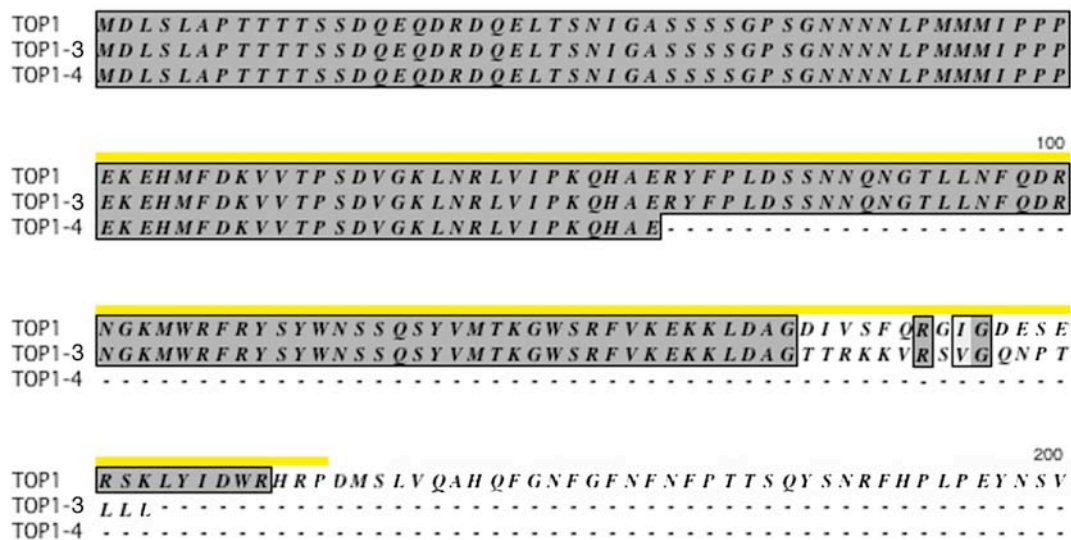
No hay expresión del RNA mensajero completo de *TOP1* en ninguno de los casos (**a**, CDS, **c** desde primer exón), pero sí existe expresión del mensajero antes de las inserciones (**b**), aparentemente menor en el caso de *top1-3*, comparando con Col-0.

**B:** *TOP2*, comparamos la expresión de *TOP2* en Col-0 (calle 1) frente a *top2-1* (calle 2) y *top2-2* (calle 3) con una pareja de cebadores, sólo se pierde la expresión de *TOP2* en el caso de *top2-2* (calle 3).



## RESULTADOS

Por lo tanto, en todos los casos excepto en *top2-1*, las inserciones del transposón o del T-DNA, en su caso, impedían la transcripción del mRNA completo de *TOP1* y *TOP2*. La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo con los alelos *top1-3* para *TOP1* y *top2-2* para *TOP2*, puesto que, además de que no se transcribía el mRNA completo, éstos presentaban los fenotipos más severos. Además, en el caso de *top1-3*, la transcripción del mRNA truncado disminuía respecto al silvestre y la región insertada del transposón tenía varios codones de STOP que impedirían la traducción de una proteína TOP1 completa. En la figura IV-10 se comparan las secuencias de las proteínas potencialmente codificadas por los genes *TOP1* silvestre, *TOP1-3* y *TOP1-4*. Se puede observar que la proteína TOP1-4 contenía una región muy pequeña del dominio B3, mientras que en TOP1-3 esta región era más grande.



**Fig. IV-10: Alineamiento de proteínas.** Se comparan las secuencias de las proteínas TOP1, TOP1-3 y TOP1-4. La proteína TOP1-4 es la más pequeña. En amarillo se ha destacado la región del dominio B3.

## 2-2. Caracterización fenotípica de los mutantes de pérdida de función *top*.

Para caracterizar funcionalmente los genes *TOP1* y *TOP2* se realizó el estudio del fenotipo de los mutantes de pérdida de función identificados. Puesto que tanto los fenotipos similares presentados por los distintos alelos mutantes de *TOP1* y *TOP2* como la similitud de secuencia de los genes *TOP1* y *TOP2* sugería el posible papel redundante de ambos genes, se generaron los dobles mutantes *top1-3 top2-2* y *top1-4 top2-2* mediante cruzamiento entre los mutantes simples homocigóticos. Se seleccionaron los dobles mutantes mediante el método de genotipado descrito en el apartado de obtención de líneas de pérdida de función.



Tanto el doble mutante *top1-3 top2-2* como el *top1-4 top2-2* mostraron un fenotipo mucho más severo que los mutantes simples por separado, sobre todo *top1-3 top2-2*, cuyos frutos mostraron una longitud mucho menor que la del silvestre. Este hecho confirmaba la posible redundancia funcional de los genes *TOP1* y *TOP2*. Por otra parte, se determinó que las mutaciones en los genes *TOP* eran mutaciones de carácter recesivo.

### **2-2-1. Descripción de las alteraciones en el gineceo de los mutantes *top*.**

#### Alteraciones en la longitud de los frutos de los mutantes *top*.

Como se ha mencionado en los antecedentes, una característica de los mutantes *top* era que éstos mostraban alteraciones en el tamaño de los frutos, por lo que se realizó una comparación del tamaño de los mismos con el de frutos silvestres para determinar si existían diferencias entre los distintos alelos mutantes. Para ello, se comparó la longitud de los diez primeros frutos completamente elongados del tallo principal de los mutantes *top* respecto al silvestre. En la figura IV-11 se muestran, colocados de mayor a menor estadio (de izquierda a derecha respectivamente), los frutos de los distintos mutantes *top* y los del silvestre junto a una regla en mm.

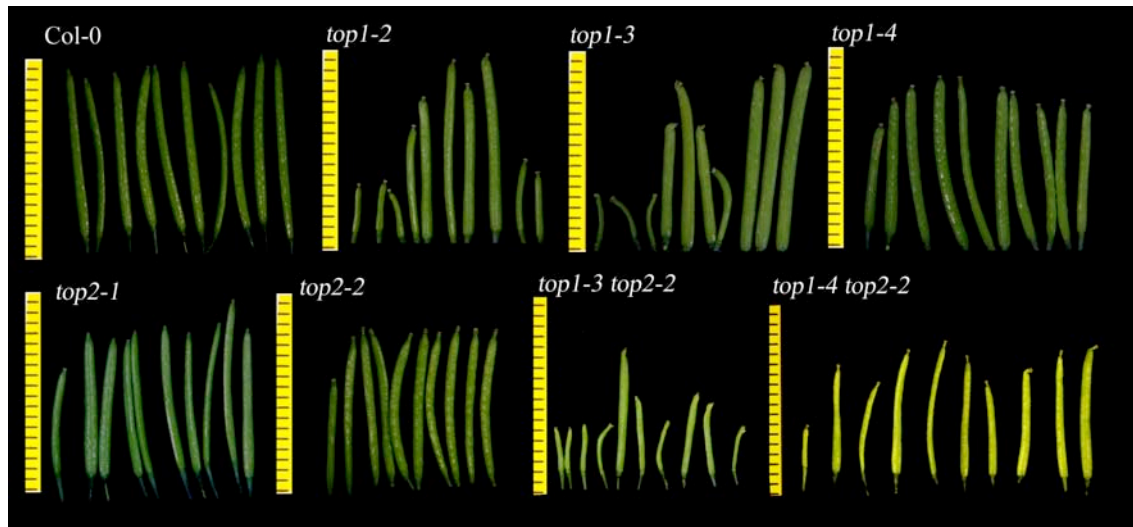
Los frutos del silvestre eran muy homogéneos en cuanto a su longitud, siendo ésta de entre 15 y 16 mm. Los frutos de los mutantes simples *top1-4*, *top2-1* y *top2-2* también eran bastante uniformes en cuanto a su longitud, aunque ésta era un poco más corta que la del silvestre, aproximadamente 14 mm. Sin embargo, en los frutos del mutante *top1-2* y en los del mutante *top1-3* se observó que existía gran variabilidad de la longitud de los frutos dentro de la misma planta. Algunos de los frutos alcanzaban la longitud del silvestre, pero otros frutos eran mucho más cortos (5-6 mm).

Por otra parte, también se comparó la longitud de los frutos de los dobles mutantes *top1-3 top2-2* y *top1-4 top2-2* con el silvestre. Los frutos del doble mutante *top1-3 top2-2* eran en general mucho más pequeños que los del silvestre, midiendo normalmente entre 4 y 6 mm de longitud, aunque alguno alcanzaba mayor longitud. Los frutos del doble mutante *top1-4 top2-2* eran bastante homogéneos en cuanto a su longitud, pero también más cortos que el silvestre (12-13 mm).

Por lo tanto, y a modo de resumen, los frutos de los mutantes *top* eran en general más pequeños que los del silvestre, sobre todo los del doble mutante *top1-3 top2-2*, aunque los frutos de los mutantes simples *top1-2* y *top1-3* eran bastante variables en cuanto a su longitud dentro de la misma planta.

Las alteraciones en el tamaño de los frutos pueden reflejar problemas en el crecimiento del ovario. Por otra parte, estas alteraciones podrían ser reflejo de problemas en la viabilidad de los gametos o bien en la fertilización, dando lugar a un menor número de semillas. Para determinar si la disminución de la longitud de los frutos de los mutantes *top* podría deberse a una menor fertilidad de los mutantes, se

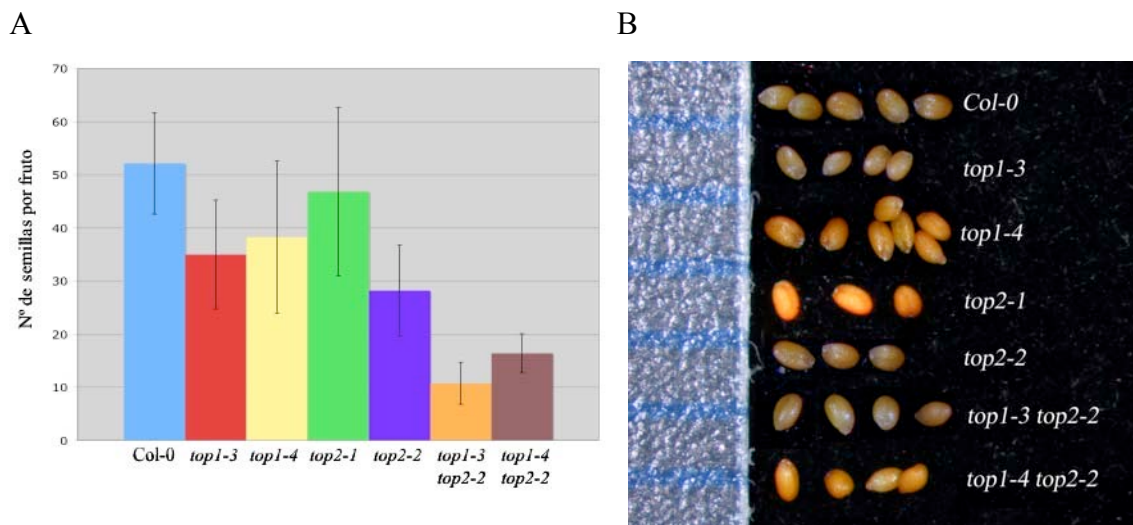
cuantificó el número de semillas en los distintos mutantes *top* respecto al silvestre y se analizó la morfología de las mismas.



**Fig. IV-11: Comparación de los tamaños de los 10 primeros frutos de los mutantes *top* frente a los del silvestre.** Ejemplo representativo de comparación efectuada en  $n > 10$  plantas. Los frutos están colocados de izquierda a derecha según su posición en el tallo principal de la planta. No se aprecian grandes cambios en los mutantes simples excepto en *top1-3* y *top1-2*, donde se observa variabilidad de tamaño de los frutos dentro de la misma planta. Los frutos de los dobles mutantes son más cortos que los del silvestre, sobre todo *top1-3 top2-2*.

El número de semillas en los frutos de los mutantes *top* era en general menor que en el silvestre, sobre todo en los dobles mutantes (Fig. IV-12 A, Gráfica). Las pruebas T de Student realizadas demostraron que los datos eran estadísticamente significativos, resultando en todos los caso valores de  $p < 0,05$ , excepto en el caso de *top1-4* (0,057). La hipótesis nula ( $H_0$ ) fue que las líneas comparadas (Col-0 y los distintos mutantes) mostraban el mismo fenotipo. Como ya se ha mencionado, los mutantes *top* presentaban variabilidad en el tamaño de los frutos, lo que se correlacionaba con el número de las semillas por fruto. Así, los frutos de menor tamaño presentaban un menor número de semillas. En algunos casos los frutos eran de tamaño silvestre y presentaban semillas en igual número que éste. No se encontraron diferencias destacables en la morfología de las semillas respecto al silvestre (Fig. IV-12 B).

Como ya se ha mencionado, una posible explicación de la disminución en el número de semillas puede ser reflejo de alteraciones que afecten a los gametos, bien a los masculinos o a los femeninos, por lo que se realizaron cruces recíprocos. La polinización con polen silvestre de ovarios *top* mantenía las alteraciones en el tamaño, mientras que la polinización de ovarios silvestres con polen *top* no provocaba alteraciones en el tamaño de los frutos, por lo que se determinó que estos problemas debían ser en los gametos femeninos.



Mediante aclarados con hidrato de cloral se observaron ovarios de los mutantes *top* y no se encontraron diferencias en el número de óvulos respecto al silvestre, por lo que las alteraciones en el tamaño podrían ser reflejo de problemas en la fertilización provocados quizá por alteraciones en la morfología del gineceo. Para estudiar esta posibilidad, se realizó un análisis más detallado de los frutos de estos mutantes, prestando gran atención a las regiones apicales de los mismos, importantes para la correcta fertilización.

#### Morfología de las regiones apicales del gineceo de los mutantes *top*: estilo y papilas estigmáticas.

En este análisis se observó que los mutantes *top* mostraban defectos en las regiones apicales de los frutos. Estas alteraciones eran más o menos severas dependiendo del mutante y del alelo estudiado. En la figura IV-13 se muestra el fenotipo característico de las regiones apicales de los distintos mutantes *top*. El fenotipo más frecuente que se encontró en todos ellos y que dio nombre a la familia, TOWER OF PISA, consistía en un crecimiento asimétrico de las valvas que provocaba la inclinación del estilo.

- *Mutantes de pérdida de función del gen TOP1.*

En los frutos del mutante simple *top1-3*, el fenotipo de crecimiento asimétrico de las valvas se encontraba presente prácticamente en el 100% de los frutos provocando la inclinación del estilo en los mismos. Además, en un 15% de ellos aparecían defectos en la fusión del estilo. En los frutos de fenotipo más severo, el estilo no llegaba a fusionarse, quedando una estructura aberrante, con un número reducido de papilas

estigáticas. En los frutos del mutante simple *top1-2*, el crecimiento asimétrico de las valvas se encontraba presente en un 70% de los frutos, pero no se encontraron frutos con el estilo sin fusionar. En los frutos del mutante *top1-4*, el crecimiento asimétrico de las valvas estaba presente en prácticamente el 100% de los frutos, aunque la inclinación del estilo era menos severa que en el caso de *top1-3*. Además, era muy poco frecuente encontrar estilos que no se habían fusionado correctamente (2%).

- *Mutantes de pérdida de función del gen TOP2.*

Los frutos de los mutantes de pérdida de función del gen *TOP2* tenían un crecimiento asimétrico de las valvas menos severo que los alelos mutantes de *TOP1*.

En el caso del mutante *top2-2*, esta asimetría estaba presente en un 80% de los mismos aunque la inclinación del estilo era menos severa que en el caso de los mutantes *top1*. Característicamente, el estilo en el 100% de los frutos era más alargado que en el silvestre. Los frutos del mutante *top2-1* tenían fenotipos menos severos que *top2-2*, tanto en el crecimiento asimétrico de las valvas, que estaba presente en un 70% de los frutos, como en la longitud del estilo, que era menor.

- *Mutantes de pérdida de función simultánea de los genes TOP1 y TOP2.*

El doble mutante *top1-3top2-2* tenía el fenotipo más severo de todos. En los frutos de las plantas *top1-3 top2-2*, la aparición de estilos no fusionados ocurría en un 80 % de los mismos; además, el número de papilas estigáticas se encontraba muy reducido en todos los frutos en comparación tanto con el silvestre como con los mutantes simples. En el doble mutante *top1-4 top2-2*, el porcentaje de frutos con estilos sin fusionar no era tan elevado (4%) como en el caso del doble mutante *top1-3 top2-2*. El 100% de los frutos tenían crecimiento asimétrico de las valvas, lo que provocaba la inclinación del estilo. Además, los estilos eran alargados, como en el caso del mutante *top2-2*.

El hecho de que los dobles mutantes tuvieran un fenotipo más severo que los mutantes simples por separado indicaba que *TOP1* y *TOP2* actuaban de forma redundante o parcialmente redundante en la formación de los tejidos apicales del gineceo.

A continuación se muestra un resumen de los fenotipos de los distintos alelos mutantes *top* ordenados en función del grado de severidad que mostraron los mismos.

- Grado de fusión del estilo:

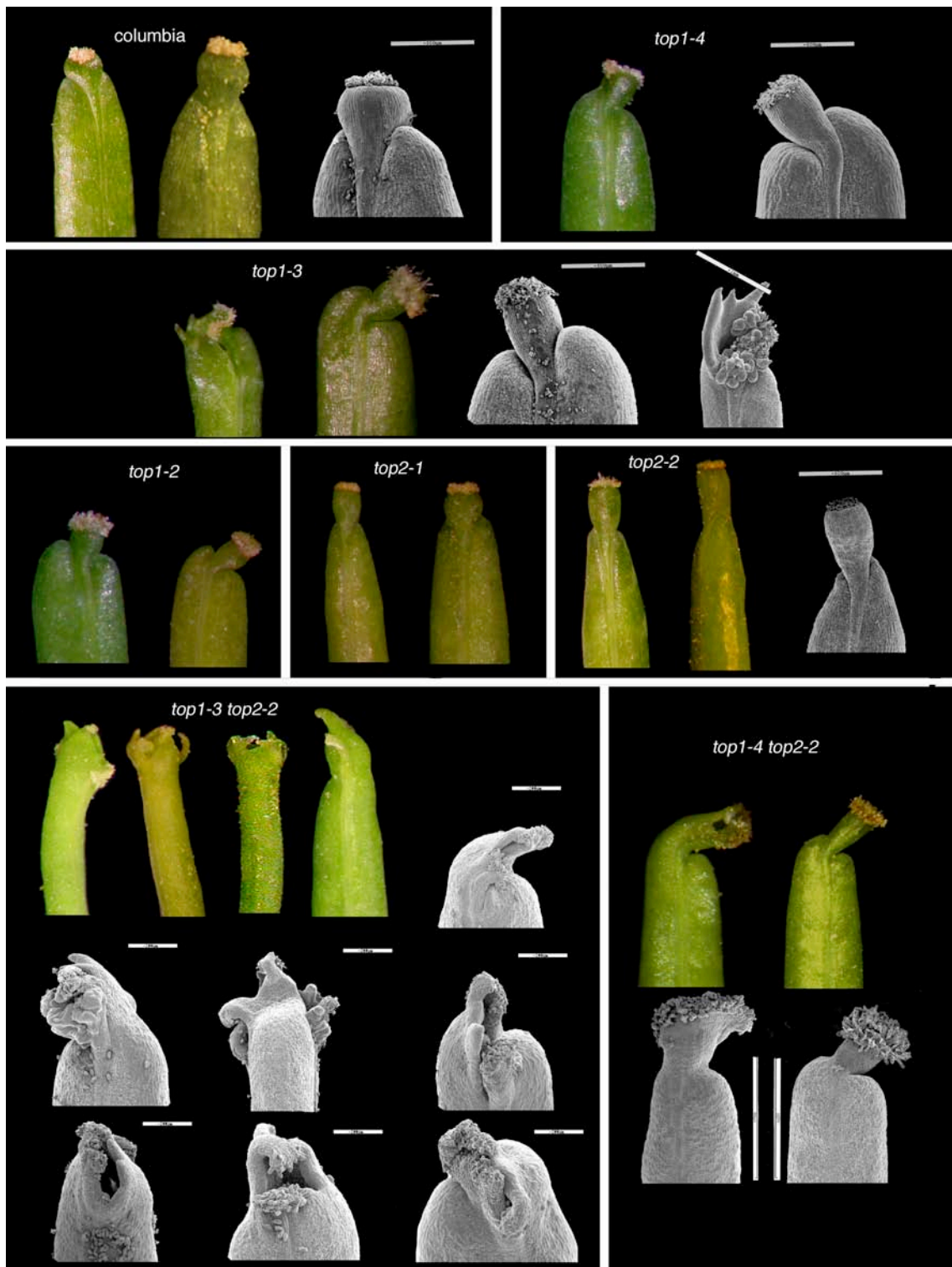
Wt = *top1-2* = *top2-1* = *top2-2* > *top1-4* > *top1-4 top2-2* > *top1-3* > *top1-3 top2-2*.

- Longitud del estilo (no se tienen en cuenta los alelos con problemas severos en la fusión del estilo):

*top2-2* > *top2-1* > *top1-2* > Wt

- Crecimiento simétrico de las valvas:

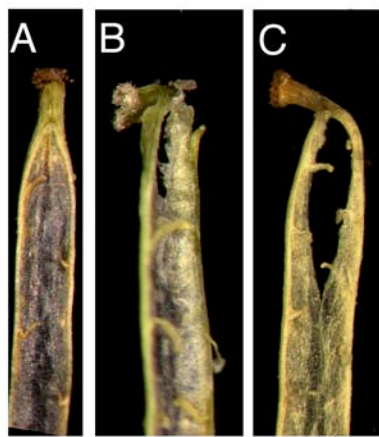
Wt > *top2-2* > *top2-1* = *top1-2* > *top1-4* > *top1-4 top2-2* > *top1-3* > *top1-3 top2-2*



**Fig. IV-13: Fenotipos de la región apical de los frutos de los mutantes *top*.** Se muestran fotos *in vivo* y micrografías electrónicas de barrido. Se observa el estilo inclinado en los mutantes *top1*, en algunos casos sin fusionar como en *top1-3* (foto derecha). Estilo más alargado en los mutantes de *top2*. Fenotipo más severo de los dobles mutantes en los que el estilo no se fusiona correctamente sobre todo en el doble mutante *top1-3 top2-2*.

Los defectos en la formación de las regiones apicales del fruto también se ponían de manifiesto en el interior de los mismos. Así, el septum, la pared que separa internamente los dos lóculos del ovario y por donde discurre el tracto de transmisión, no se desarrollaba correctamente en los mutantes *top*. En la figura IV-14 se muestran fotos a la lupa de los septa de los dobles mutantes *top1-3 top2-2* y *top1-4 top2-2*. En éstos las regiones apicales del septum no se fusionaban, al contrario de lo que ocurría en el silvestre. Estas alteraciones también podrían afectar a la correcta fertilización de los frutos. Los mutantes simples no presentaron defectos en el septum (datos no mostrados).

---



**Fig. IV-14: Defectos en la fusión de las regiones apicales del septum de los mutantes *top* comparado con el silvestre.**

(A) Col-0.  
(B) *top1-3 top2-2*.  
(C) *top1-4 top2-2*.

---

Como se ha descrito en el apartado de los antecedentes, los frutos de la línea *top1-ID* presentaban similitudes con los del mutante *fruitfull*. Puesto que *FUL* es necesario para el correcto establecimiento del patrón medio-lateral del fruto permitiendo la correcta diferenciación de la valva y la zona de dehiscencia (Ferrándiz *et al.*, 1999), cabía esperar que los mutantes *top* presentaran alteraciones a este nivel. Sin embargo, como se acaba de describir, el análisis de la morfología de los frutos de los mutantes *top* indicaba que las alteraciones que éstos presentaban se localizaban en las regiones apicales, en concreto en el estilo y el estigma. Mutaciones en los genes *SPT*, *STY/SHI*, *LUG*, *SEU* provocan fenotipos en las regiones apicales del gineceo similares a las de los mutantes *top*, apareciendo las regiones apicales reducidas en tamaño. Al contrario, mutaciones en el gen *ETT* producen un aumento de las regiones basales del gineceo (ginoforo) y de las regiones apicales (estilo estigma) y una disminución del ovario.

Ya que parecía que los genes *TOP1* y *TOP2* afectaban al desarrollo de las regiones apicales del gineceo, se realizó un estudio más detallado de las mismas para determinar, por una parte, los primeros estadios donde se ponían de manifiesto los defectos y, por otra, revelar otros posibles aspectos del fenotipo. Este estudio incluyó:

- estudio de la ontogenia del gineceo.

- estudio de los tipos celulares en el gineceo.

### **2-2-2. Estudio comparativo de la ontogenia del gineceo silvestre y el gineceo de los mutantes *top*.**

Para determinar a partir de qué estadio de desarrollo se ponían de manifiesto las anomalías en el desarrollo del gineceo de los mutantes *top*, se decidió llevar a cabo un estudio de ontogenia. En éste se compararon carpelos de los mutantes *top* con carpelos silvestres (Col-0) en distintas etapas de desarrollo (Fig. IV-15).

Los estadios de desarrollo del gineceo se resumen en la tabla X de la introducción a partir de lo descrito en (Ferrándiz *et al.*, 1999).

En los mutantes simples *top1-3*, *top1-4* y *top2-2* no se detectaron alteraciones apreciables en la ontogenia del gineceo en estadios previos al 10 excepto en algunos frutos del mutante *top1-3* con fenotipo más severo (datos no mostrados). En estadio 10 *top1-3* ya mostraba defectos en el crecimiento de las regiones apicales (Fig. IV-15 A) Posteriormente, en estadios previos a la antesis (11-12) (Fig. IV-15 B), el crecimiento asimétrico de las valvas era evidente en todos los mutantes simples *top*. Los dobles mutantes *top1-3 top2-2*, sin embargo, mostraron alteraciones en la ontogenia del gineceo en estadios previos al estadio 10 (datos no mostrados) y evidentes en este estadio (Fig. IV-15 A), provocando que, ya a partir del estadio 11 donde el estilo comienza a diferenciarse y sobre todo en el 12 donde ya se distingue con más claridad, se pudiera observar el fenotipo del estilo no fusionado (Fig. IV-15 B). Este fenotipo era muy evidente en el estadio 13 (antesis), en el que ocurre la fertilización (Fig. IV-15 C).

Así, se determinó que los fenotipos observados en el fruto de los mutantes *top* eran debidos a alteraciones producidas durante el desarrollo del gineceo, en estadios previos a la fertilización.

### **2-2-3. Estudio de los tipos celulares en el gineceo de los mutantes *top*.**

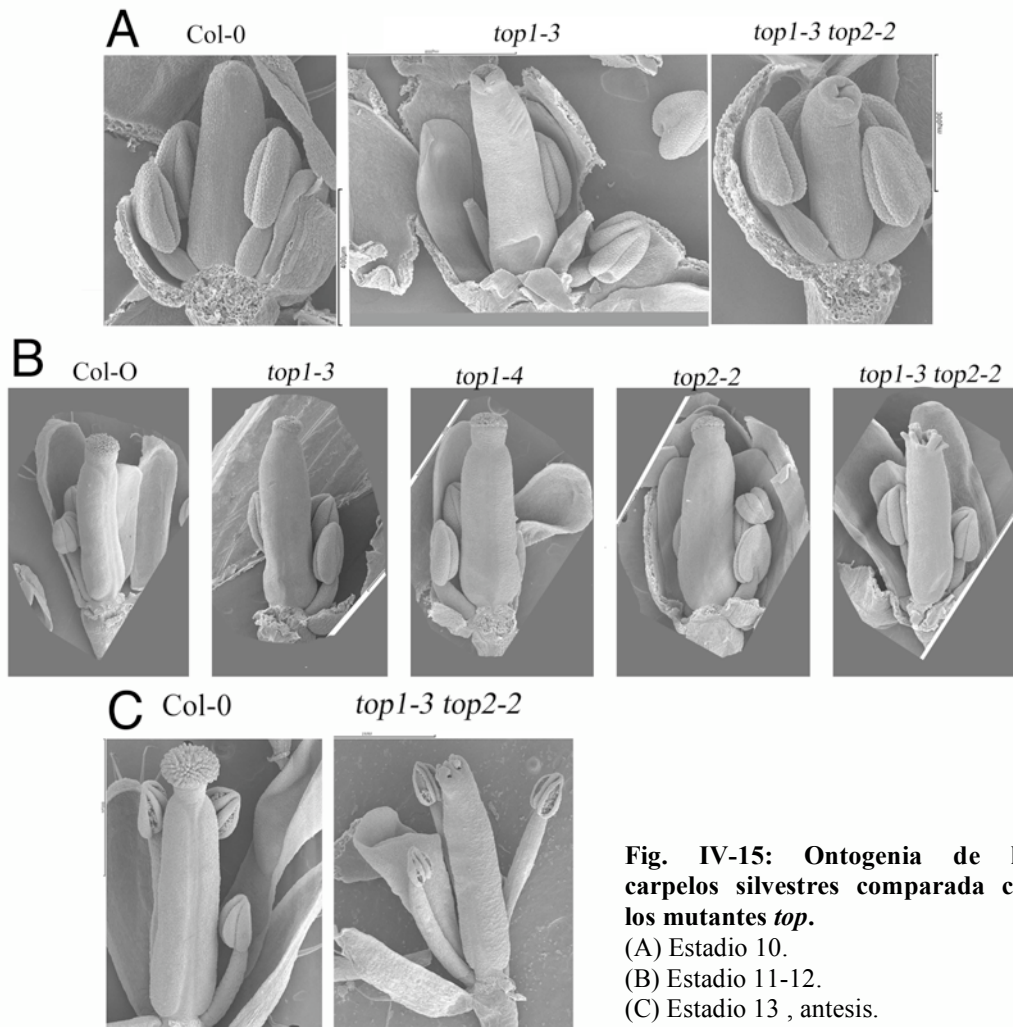
Para revelar otros posibles aspectos del fenotipo en el gineceo de los mutantes *top* se realizó un análisis que incluyó el estudio de la morfología de la epidermis del gineceo, así como la organización interna y los posibles defectos en el desarrollo vascular del mismo en los distintos mutantes *top*.

#### Estudio morfológico de las células de la epidermis del gineceo de los mutantes *top*.

Este análisis mediante imágenes de microscopía electrónica de barrido reveló que, aparte de los característicos fenotipos *tower-of-pisa* que afectan al estilo y estigma del mismo, los mutantes *top* no parecían estar alterados en otras regiones del gineceo. Así, el replum era normal en todos ellos, la zona de unión a nivel basal entre las valvas y el replum tampoco estaba alterada y tampoco lo estaba el ginóforo (no se muestra).

El análisis del resto de verticilos florales de los mutantes *top* no reveló alteraciones ni en los sépalos, pétalos o estambres de los mutantes *top* (Fig. IV-15).





**Fig. IV-15: Ontogenia de los carpelos silvestres comparada con los mutantes *top*.**  
 (A) Estadio 10.  
 (B) Estadio 11-12.  
 (C) Estadio 13 , anthesis.

Estudio de la organización interna del gineceo de los mutantes *top*.

Como ya se ha descrito previamente, en la línea *top1-ID* la sobreexpresión de *TOP1* provocaba frutos con fenotipo parecido a los del mutante *ful*; en este mutante la valva adquiere características propias de la zona de dehiscencia lignificándose ectópicamente debido a la expresión ectópica de los genes de identidad de margen de valva en la valva de los mutantes *ful* (Ferrándiz *et al.*, 2000b).

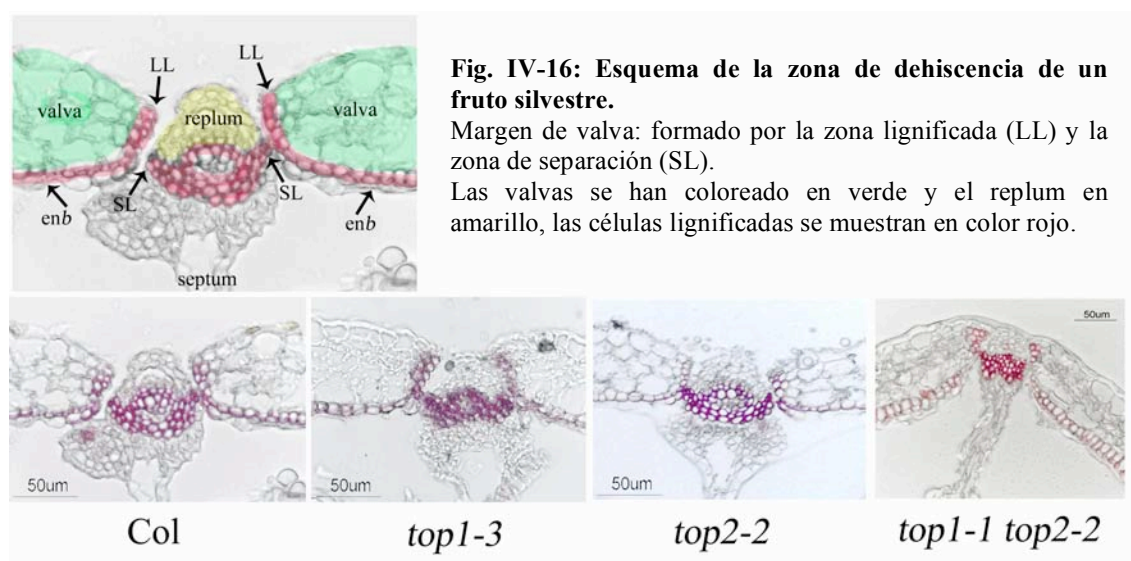
Con el fin de conocer si los mutantes *top* presentaban alteraciones en el correcto desarrollo de estos tipos celulares, se analizó la estructura del eje medio-lateral de los frutos de los mutantes *top*, así como los patrones de lignificación en la zona de dehiscencia y la capa *enb* de los mismos mediante el análisis de cortes histológicos.

Como se describe en la introducción, la dehiscencia en *Arabidopsis* está ligada a la lignificación específica de ciertos tejidos en el fruto maduro, la capa lignificada (LL, Lignified Layer) que se encuentra dentro del margen de valva, y las células del endocarpob (*enb*) que se encuentran en las valvas. Estas zonas lignificadas son necesarias para provocar las tensiones mecánicas durante la desecación del fruto que



ayudan a la separación de las valvas. En la figura IV-16 se muestra un corte transversal de un fruto de *Arabidopsis* coloreado para explicar diferenciar las regiones de la zona de dehiscencia.

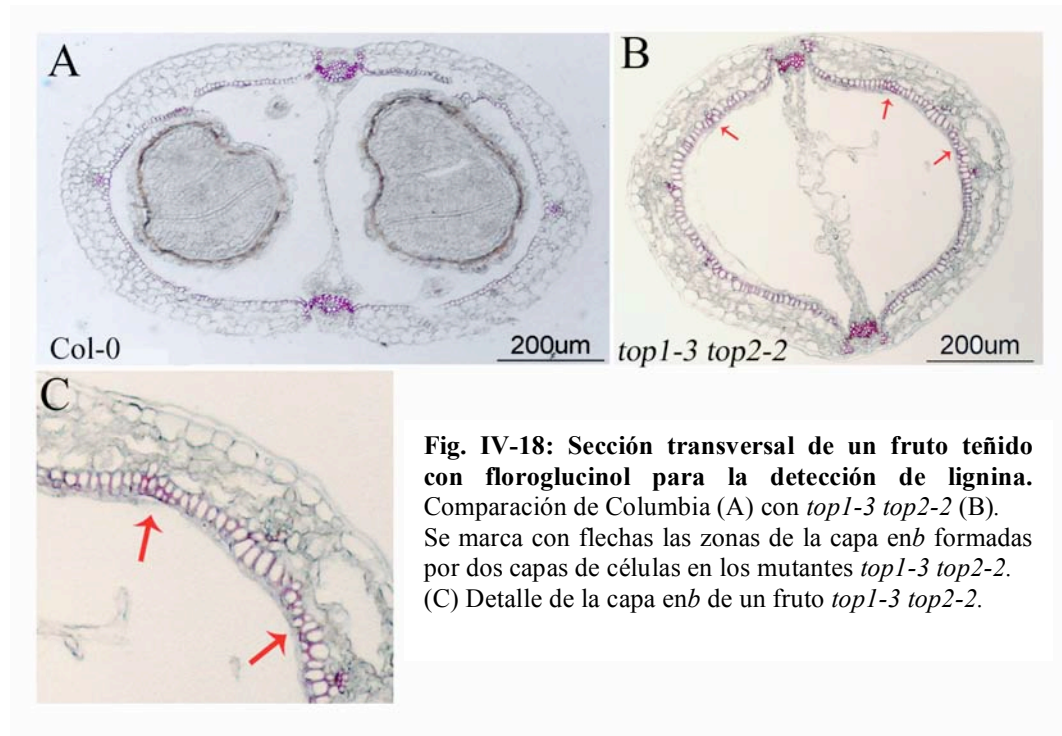
Para analizar posibles alteraciones en el desarrollo del eje medio-lateral de los frutos de los mutantes *top*, se incluyeron en parafina frutos de estadio 17B tardío y se realizaron cortes histológicos transversales que se tiñeron con floroglucinol. Esta sustancia tiñe específicamente de color rosado las células lignificadas. En el estadio 18 la lignificación de las capas LL y *enb* es más evidente que en el estadio 17B pero resulta más complicada la imbibición de las muestras en parafina puesto que los frutos se abren con mas facilidad.



**Fig. IV-17: Secciones transversales de frutos teñidos con floroglucinol para la detección de lignina.** Detalle de la zona de dehiscencia. La barra de escala corresponde a 50µm.

No se encontraron diferencias ni en la zona de dehiscencia ni en los patrones de lignificación de los frutos de los mutantes simples *top1-3* y *top2-2* respecto al ecotipo silvestre (Fig. IV-17). Tampoco se observaron cambios ni en los tipos celulares ni en el número de células que forman el fruto. El fruto del doble mutante *top1-3 top2-2*, sin embargo, era de menor grosor que el del silvestre y se observó que en algunas zonas la capa *enb* estaba formada por dos filas de células, en vez de la fila unicelular que presenta el ecotipo silvestre (Fig. IV-18).

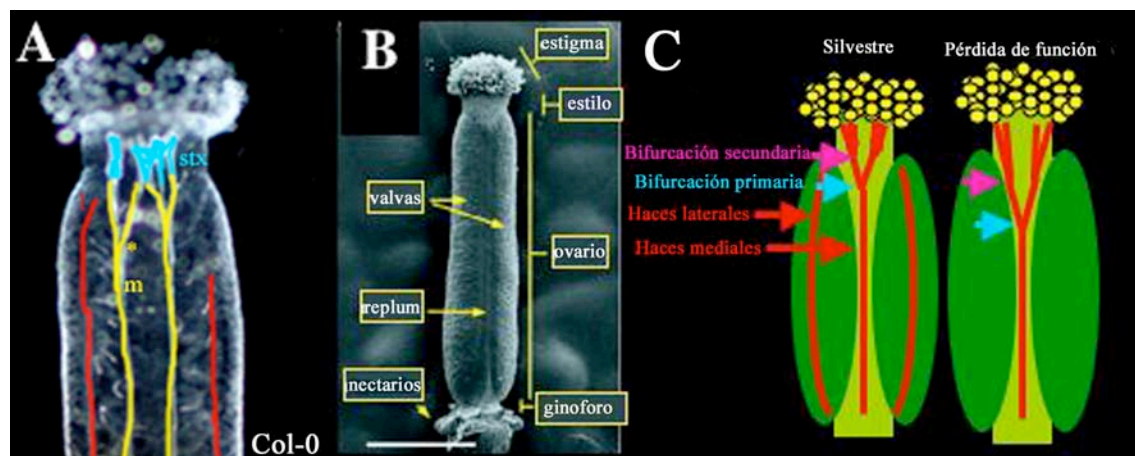
Por lo tanto, no se encontraron alteraciones destacables en la zona de dehiscencia de los mutantes *top*, si bien no se descartó que una posible redundancia funcional entre miembros adicionales de la familia *TOP* enmascarara las alteraciones que pudieran existir a este nivel.



**Fig. IV-18: Sección transversal de un fruto teñido con floroglucinol para la detección de lignina. Comparación de Columbia (A) con *top1-3 top2-2* (B). Se marca con flechas las zonas de la capa *enb* formadas por dos capas de células en los mutantes *top1-3 top2-2*. (C) Detalle de la capa *enb* de un fruto *top1-3 top2-2*.**

Estudio del desarrollo vascular del gineceo de los mutantes *top*.

Como ya se ha descrito, tanto las líneas que sobreexpresaban el gen *TOP1* como los mutantes de pérdida de función de los genes *TOP1* y *TOP2* tenían fenotipos que sugerían una posible relación con las vías de señalización por auxinas. Ya que éstas juegan un papel muy importante en el desarrollo de los haces vasculares (Mattsson *et al.*, 1999) (Sieburth, 1999) revisado por (Berleth *et al.*, 2000), se realizó el análisis de los mismos tanto en el gineceo como en el fruto de los mutantes *top* con el fin de conocer si éstos sufrían alteraciones.



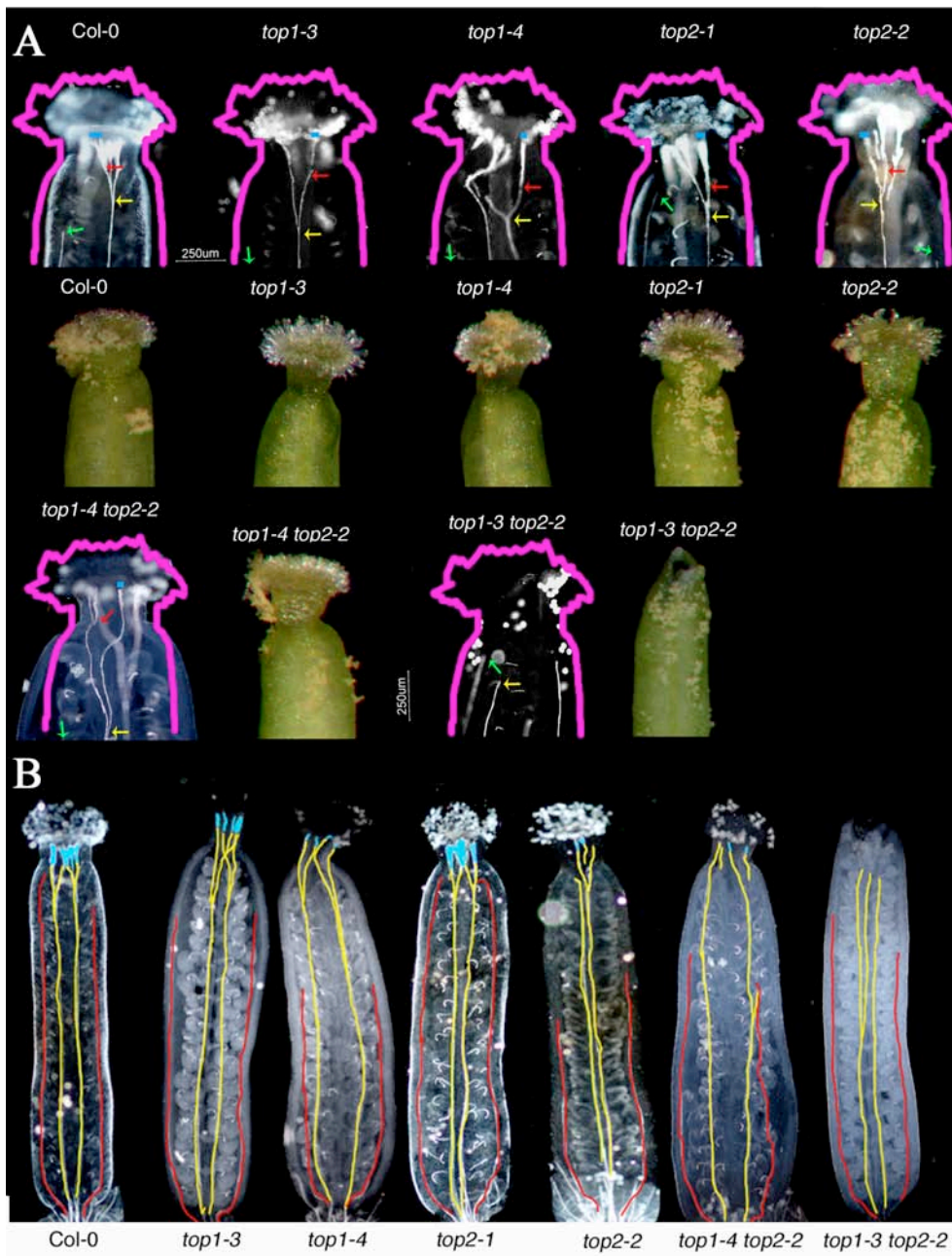
**Fig. IV-19: Haces vasculares en gineceo silvestre en antesis. (A) m: Haces vasculares mediales (amarillo). l: Haces vasculares laterales (rojo). stx: Xilema estilar, donde terminan los haces mediales (azul). \* Punto de bifurcación primaria de los haces mediales. (B) Esquema de los haces vasculares mediales. Se muestra un resumen esquemático del patrón de desarrollo de las venas mediales en los mutantes *top* y en el gineceo silvestre. Se muestra la localización más basal de las bifurcaciones de los haces en los mutantes *top*.**

El gineceo silvestre (Fig. IV-19) posee cuatro venas principales internas; dos mediales y dos laterales. Las venas laterales (Fig. IV-19A l) se desarrollan a lo largo de las valvas y terminan en la frontera entre el ovario y el estilo. Las venas mediales (Fig. IV-19A m) se desarrollan a lo largo del replum, se bifurcan una primera vez antes de llegar al estilo (bifurcación primaria) y una segunda vez en la unión entre el ovario y el estilo (bifurcación secundaria). A este nivel, las venas se dividen para formar un abanico continuo de haces vasculares (Fig. IV-19A stx) que llega al estigma. Este patrón, que se desarrolla en el gineceo, se mantiene posteriormente en el fruto (Sessions y Zambryski, 1995).

Como se puede apreciar en la figura IV-20 los mutantes *top* tenían alteraciones en la vasculatura del gineceo. En los mutantes *top1-3* y *top1-4*, la cantidad de haces vasculares que llegaba al estigma era menor que en el gineceo silvestre; además, tanto las bifurcaciones primarias como secundarias de los haces mediales se producían a nivel más basal que en el silvestre. El mismo tipo de alteraciones se encontraron en los mutantes *top2-1* y *top2-2* aunque en el caso de *top2-1* eran menos severas que en el resto de mutantes simples. En el doble mutante *top1-4 top2-2*, las bifurcaciones también se producían a un nivel más basal que en el silvestre y el número de haces vasculares que llegaba al estigma era menor que en los mutantes simples. En el doble mutante *top1-3 top2-2* las alteraciones eran todavía más severas. La mayoría de las veces la bifurcación primaria ocurría a niveles muy basales, en la zona de la mitad del ovario o incluso más abajo y no se encontraban los haces vasculares que irrigan el estigma (Fig. IV-20A). Los distintos alelos mutantes *top* también mostraron defectos en el desarrollo de las venas laterales; en general, éstas no llegaban a desarrollarse hasta la zona apical de la valva (Fig. IV-20B, color rojo).

En la figura IV-19 B se muestra un gineceo silvestre en el que se señalan los distintos tejidos que lo forman. En la figura IV-19 C se muestra un esquema comparando las alteraciones en el desarrollo de los haces vasculares mediales en el gineceo silvestre y en los mutantes de pérdida de función de los genes *TOP1* y *TOP2*.

Este tipo de alteraciones también se producen en mutantes como *spt* (Heisler *et al.*, 2001) y *sty* (Kuusk *et al.*, 2002) que tienen alteraciones en el eje apical-basal del gineceo parecidas a las de los mutantes *top*. En plantas silvestres tratadas con inhibidores del transporte polar de auxinas como el NPA (N-1-naphthylphthalamic acid) también se produce una basalización de las bifurcaciones vasculares aunque aumenta el número de haces estilares (Nemhauser *et al.*, 2000). Por otra parte, mutantes como *ett* que presentan un fenotipo en el fruto opuesto en cierto modo al de los mutantes *top* de proliferación de tejidos apicales (estilo y estigma), las alteraciones en los haces vasculares provocan que los haces mediales y laterales sean difícilmente distinguibles (Nemhauser *et al.*, 2000).



**Fig. IV-20: Haces vasculares en distintos gineceos *top* en antesis.**

(A) Se muestran fotografías de gineceos en antesis *in vivo* y aclarados con hidrato de cloral. De izquierda a derecha : Col-0, *top1-3*, *top1-4*, *top2-1* y *top2-2*. Abajo de izquierda a derecha *top1-4 top2-2* y *top1-3 top2-2*. Las flechas en amarillo señalan la bifurcación primaria de los haces mediales, las flechas en rojo señalan la bifurcación secundaria y en azul se ha marcado una línea para indicar la cantidad de haces vasculares que irrigan el estigma. Las flechas en verde señalan dónde terminan las venas laterales. NOTA: en *top1-3*, *top1-4* y *top1-4 top2-2* la terminación de las flechas verdes laterales ocurre en una zona más basal de la que se muestra en la fotografía por ese motivo las flechas verdes señalan hacia abajo. Se puede observar como los haces vasculares se bifurcan más abajo en los mutantes simples *top* que en Col-0, además la cantidad de xilema estilar es menor. En los dobles mutantes los defectos son más severos. (B) Gineceo en antesis aclarado con Hidrato de cloral de los distintos mutantes *top*. Se compara con el silvestre. Las venas laterales se han coloreado en rojo y las venas mediales en amarillo. El abanico de haces que irrigan el estigma se ha coloreado en azul.

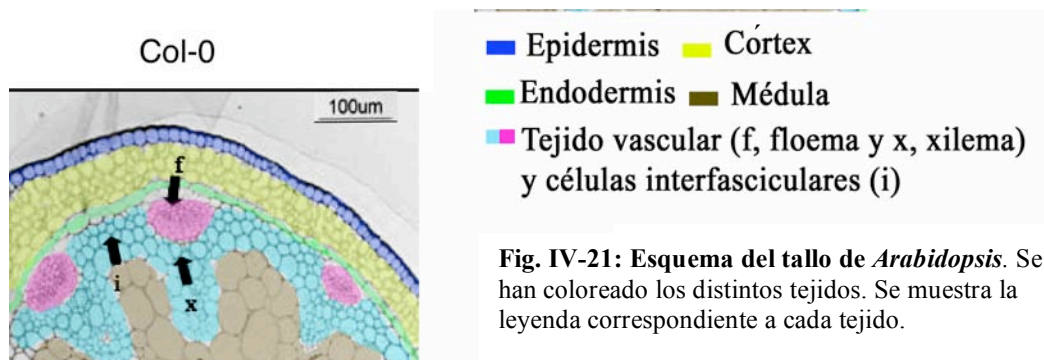


Puesto que el gineceo de los mutantes *top* presentaba alteraciones en el desarrollo vascular, quizá éste también estuviera alterado en otros órganos de la planta. Para determinar si este era el caso, se llevó a cabo un análisis de los haces vasculares del tallo, los cotiledones, las hojas y las raíces, así como posibles alteraciones morfológicas en los mismos.

#### 2-2-4. Descripción de las alteraciones en el desarrollo vegetativo de los mutantes *top*.

##### Alteraciones en el tallo.

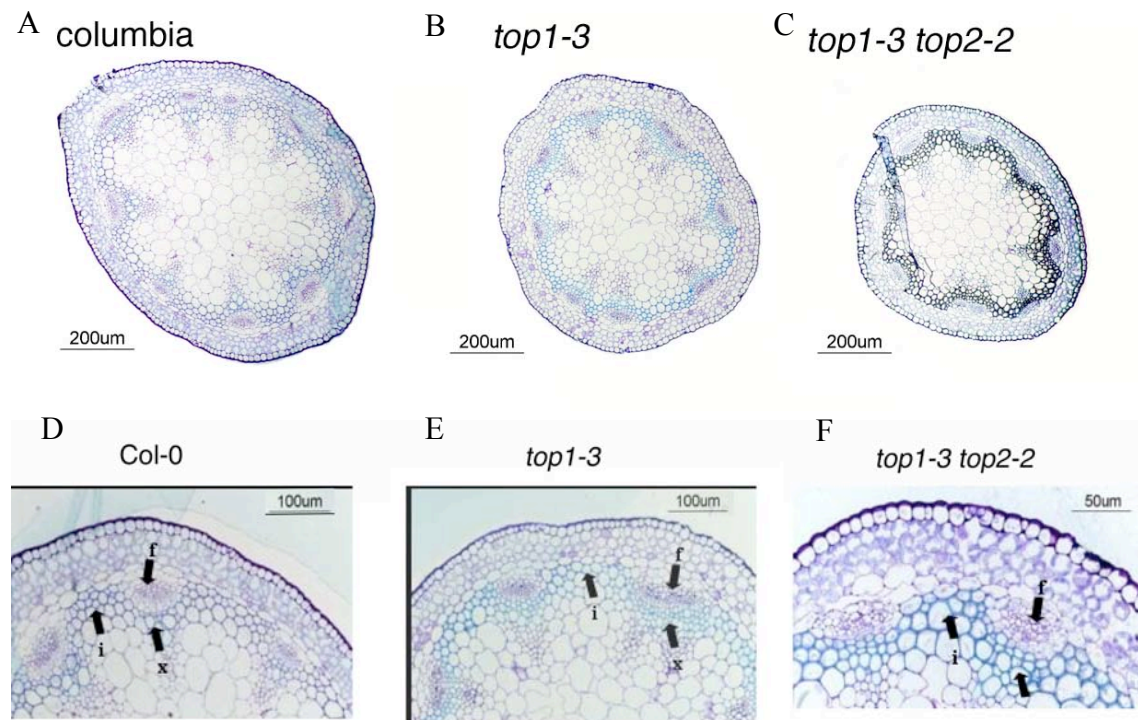
En un corte transversal del tallo de *Arabidopsis* podemos encontrar, externamente, una capa celular única de epidermis; en el medio, tres o cinco capas de córtex y, a continuación, la endodermis; internamente, se encuentran de 4 a 7 nudos vasculares que circunscriben la médula central de células parenquimáticas (Fig. IV-21). El tejido vascular en el tallo se presenta como anillos de venas separadas. Este patrón de las venas del tallo sirve para dos funciones fundamentales; produce un eje apical-basal para el transporte de material y conecta con las venas de los órganos laterales. Entre los haces vasculares se encuentran las células interfasciculares que, aunque lignificadas, no se consideran parte del tejido vascular. El floema ocupa la parte externa del haz vascular y el xilema la interna. El floema y el xilema se encuentran separados por una o dos filas de células de procambium (Turner, 2003) (Fig. IV-21)



Se analizaron cortes transversales de las regiones de tallo comprendidas entre el cuarto y el quinto entrenudo del mutante simple *top1-3* y del doble mutante *top1-3 top2-2*, así como un control con el ecotipo silvestre Col-0. Las muestras fueron embebidas en resina y los cortes fueron teñidos con Azul de toluidina, para destacar las células lignificadas en color azul claro (Fig. IV-22).

No se encontraron diferencias entre el silvestre y los mutantes *top* en cuanto al patrón de los haces vasculares, tampoco respecto a los tipos celulares ni a la organización de los mismos en el tallo, ni respecto al patrón de lignificación del mismo. Sin embargo, el diámetro del tallo del doble mutante *top1-3 top2-2* era un 20% menor

que el de silvestre. Puede que el grado de redundancia existente entre los miembros de la familia *TOP* enmascarara posibles fenotipos más severos en el tallo.



**Fig. IV-22: Secciones transversales de tallo teñidas con azul de toluidina para la detección de lignina.**

Cortes realizados en tallos incluidos en resina. Las células lignificadas aparecen en color azul claro-verdoso.

(i) Células interfasciculares. (f) Floema. (x) Xilema.

(A) Columbia. (D) Detalle de los haces vasculares.

(B) *top1-3*. (E) Detalle de los haces vasculares.

(C) *top1-3 top2-2*. (F) Detalle de los haces vasculares.

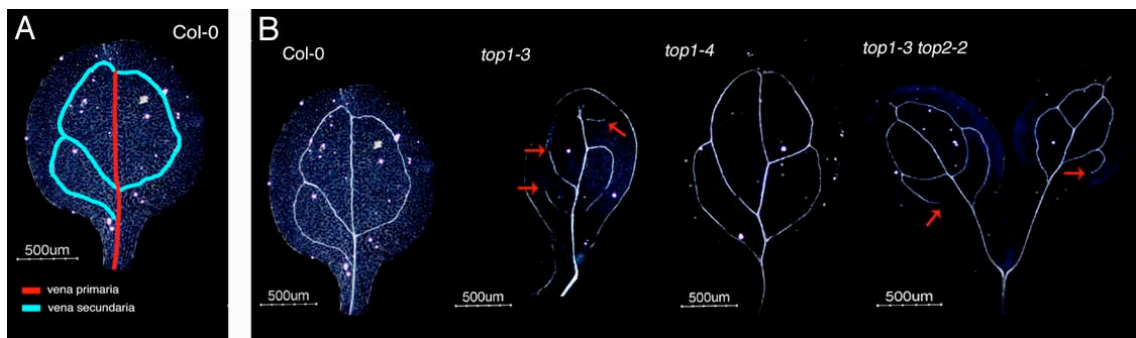
#### Alteraciones en cotiledones y hojas.

Siguiendo con el análisis de los haces vasculares de los mutantes *top*, se analizó el patrón de los mismos en los cotiledones.

El patrón de desarrollo de las venas en los cotiledones y en las hojas es relativamente sencillo y fácil de visualizar, lo que ha permitido la identificación de diversos mutantes afectados en su desarrollo (Candela *et al.*, 1999). El patrón de las venas (haces vasculares) de los cotiledones consiste en una serie de venas primarias y venas secundarias (Fig.IV-23 A) que se desarrollan de forma continua sin dejar espacios entre ellas (Carland *et al.*, 1999). Las células vasculares derivan de las células del procambium (Mattsson *et al.*, 1999; Sieburth, 1999).

Como se puede apreciar en la figura IV-23 B, tanto el mutante simple *top1-3* como el doble mutante *top1-3 top2-2* presentaban alteraciones en el patrón de los haces vasculares de los cotiledones. Las venas no llegaban a fusionarse del todo, dejando espacios entre ellas (islas vasculares), al contrario de lo que ocurría en los cotiledones

del silvestre. El mutante simple *top1-4* no mostró alteraciones en el patrón de las venas de los cotiledones.



**Fig. IV-23: Esquema de los haces vasculares en los cotiledones de plantas silvestres. (A)** (1°) Venas primarias. (2°) Venas secundarias. **Patrones de los haces vasculares en cotiledones clareados con hidrato de cloral.** Barra de escala corresponde a 500µm. las flechas rojas indican “islas vasculares”. De izquierda a derecha: Columbia, *top1-3*, *top1-4*, *top1-3 top2-2*. Se puede observar la disrupción de las venas en *top1-3* y *top1-3 top2-2*.

Por otra parte, también se analizó el patrón de los haces vasculares en hojas, no observando en este caso diferencias tan apreciables como en el caso de los cotiledones (datos no mostrados).

Ya que las islas vasculares suelen aparecer en lugares donde debería desarrollarse una vena (Carland *et al.*, 1999; Deyholos *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2000), las alteraciones en la vasculatura de los cotiledones que presentaban los mutantes *top* podrían reflejar alteraciones en la producción, percepción o transducción de una señal positiva en la vía de desarrollo de las mismas que permita el correcto desarrollo del patrón de las venas. Se ha postulado que un buen candidato para esta señal positiva es la hormona auxina (Cheng *et al.*, 2006).

Algunos mutantes alterados en el patrón de los haces vasculares de las hojas, como *as1* y *as2*, presentaban también defectos en la forma de las hojas, siendo éstas lobuladas (Byrne *et al.*, 2000) (Ori *et al.*, 2000) (Semiarti *et al.*, 2001) (Candela *et al.*, 1999). Se realizó el análisis de las hojas de roseta de los distintos mutantes *top* para determinar si éstas estaban alteradas.

No se encontraron diferencias en el fenotipo de las hojas de roseta de los mutantes *top* respecto al silvestre (Fig. IV-24). Este hecho podía ser debido bien a que no tuvieran función en estos órganos o bien a que la redundancia funcional de los distintos miembros de la familia *TOP* enmascarase posibles alteraciones. En análisis posteriores realizados en nuestro laboratorio, en los que se han conseguido mutantes de pérdida de función de los cuatro miembros de la familia *TOP*, sí que se han observado en éstos alteraciones en la forma de las hojas de la roseta, presentando éstas una forma lobulada (datos no mostrados).



**Fig. IV-24: Fenotipo de las hojas de roseta de los distintos mutantes *top* comparadas con el silvestre. No se encontraron diferencias apreciables.**

#### Alteraciones en la raíz de los mutante *top*.

Como se ha mencionado en los antecedentes, la sobreexpresión de *TOP1* provocaba un aumento en el número de raíces laterales, así como una disminución de su longitud. Estas alteraciones están presentes en muchos mutantes relacionados con las respuestas a auxinas (revisado en (Scheres, 2002)). Además, la aplicación exógena de auxinas produce un aumento de las raíces laterales en plantas silvestres, representando el regulador principal del desarrollo de las mismas (Casimiro *et al.*, 2001). La fuente principal de síntesis de auxinas se localiza en la zona meristemática de la raíz principal y en las raíces laterales en desarrollo (Ljung *et al.*, 2005).

Para analizar si los mutantes *top* presentaban alteraciones en el número y/o longitud de las raíces, se determinó el número de raíces laterales de 20 plantas de cada uno de los mutantes *top* y se midió su longitud. Todos los mutantes *top* presentaban una reducción en el número de raíces laterales, en comparación con el silvestre, siendo más severa en el doble mutante *top1-3 top2-2*. Además, éstos también presentaban una disminución en la longitud de las raíces principales (datos no mostrados).

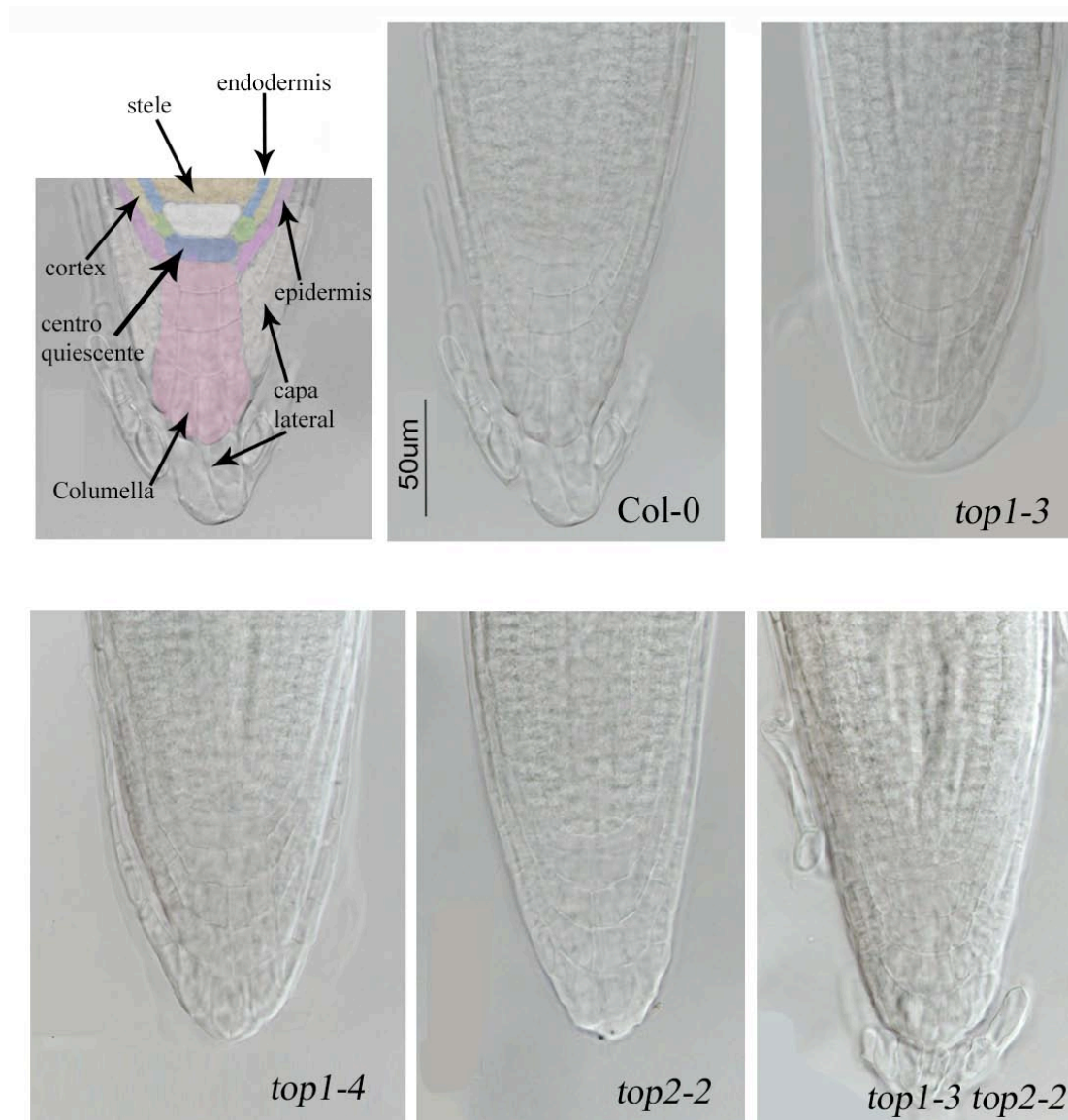
Puesto que algunos mutantes identificados inicialmente por el desarrollo alterado de la vasculatura de las hojas también mostraron defectos en el tejido vascular de las raíces, se analizó el patrón vascular en las raíces de los mutantes *top* mediante tratamientos con hidrato de cloral, que aclara los tejidos, pero no se encontraron diferencias respecto al silvestre (datos no mostrados).



Para ver si las alteraciones en el número de raíces de los mutantes *top* podrían ser debidas a alteraciones en el meristemo radicular se analizó la organización celular de las raíces en los mutantes *top* mediante tratamientos con hidrato de cloral.

En la figura IV-25 se muestra un esquema de una imagen longitudinal de la raíz de *Arabidopsis* con los distintos tipos celulares coloreados.

Los resultados indicaron que, ni el tipo celular ni el número de células de la raíz estaban alterados en los mutantes *top*, en comparación con el silvestre (Fig. IV-25).



**Fig. IV-25: Raíces clareadas con hidrato de cloral y un esquema de las zonas de la raíz.**

Se muestra el meristemo radicular.

No se observan cambios apreciables en la estructura de las raíces de los mutantes *top* respecto al silvestre. NOTA: la ausencia de capa lateral en algunos mutantes es por pérdida de la misma durante el procesado de la muestras.

Todos estos resultados sugerían que las alteraciones en las raíces que presentaban los mutantes *top* podrían estar más relacionados con la señalización hormonal, que con la determinación de la identidad de los tipos celulares.

### **2-3. Estudio de la expresión de los genes *TOP*.**

Para analizar el patrón de expresión de los genes *TOP* en la planta, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* de RNA de *TOP1* y *TOP2*. Por otra parte, se generó la construcción *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* para analizar el patrón de expresión del gen delator en la planta. Esta última construcción se utilizó posteriormente como herramienta para estudiar cambios en la expresión del gen delator en distintos fondos mutantes.

#### **2-3-1. Localización del mRNA de *TOP1* y *TOP2* mediante hibridación *in situ*.**

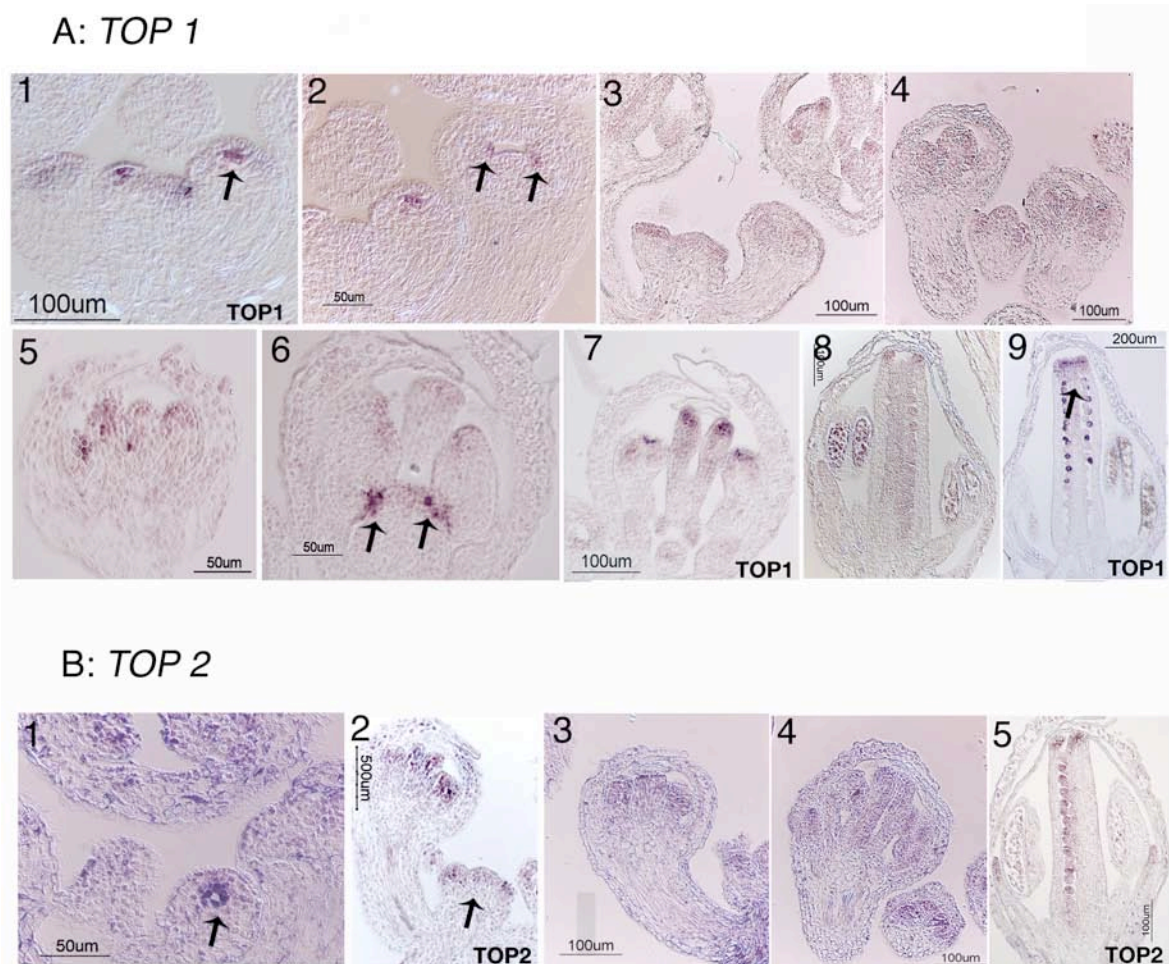
Para determinar el patrón de expresión del gen *TOP1* se realizó un experimento de hibridación *in situ* de RNA en el fondo Col-0 en distintos estadios del desarrollo de la inflorescencia. Posteriormente se realizó el mismo experimento para *TOP2*.

La expresión del mRNA de *TOP1* se localizó a nivel bajo en el meristemo inflorescente, mientras que se detectó a niveles más altos en los primordios florales en estadios tempranos de desarrollo (del 1 al 2). Conforme éstos se desarrollaban, se acumuló la expresión en la zona distal, en un pequeño dominio de la capa L3 (Fig. IV-26 A1). En estadios posteriores se localizó la expresión en todos los primordios de los distintos órganos de la flor. En la figura IV-26 A2 se muestra la localización de la expresión en el primordio de los estambres. Conforme los distintos órganos se desarrollaban (estadios del 3 al 6) la expresión que en un principio era uniforme (Fig. IV-26 A3 y A4), se acumulaba posteriormente en la zona apical de los distintos órganos (Fig. IV-26 A5) y en la zona de abscisión de los órganos florales (Fig. IV-26 A6). A partir del estadio 6 la expresión quedó delimitada en la zona apical del carpelo y de los estambres (Fig. IV-26 A7). La expresión en la zona apical del carpelo se observó tanto en estadios previos a la fusión del gineceo (Fig. IV-26 A 8), que ocurre en el estadio 10, como en los posteriores (Fig. IV-26 A9). En la figura IV-26 A 8 también se puede observar una fuerte expresión en los óvulos. En estadios posteriores al cierre del gineceo (Fig. IV-26 A9) la expresión de *TOP1* se localizó en el estilo, en el estigma, en los óvulos y en la zona apical del tracto de transmisión.

La expresión del mRNA de *TOP2* se localizó esencialmente en las mismas zonas y estadios de desarrollo que *TOP1* (Fig. IV-26 B).

El patrón de expresión de *TOP1* y *TOP2* parecía coincidir tanto con regiones de emergencia de órganos como con zonas en las que se estuviera produciendo una proliferación celular. Por otra parte, el patrón de expresión de *TOP1* y *TOP2* era coincidente con las zonas afectadas en los mutantes de pérdida de función de los genes *TOP*, en concreto las regiones apicales del gineceo. Sin embargo, la falta de defectos en

otros verticilos de la flor y en el meristemo inflorescente contrastaba con su expresión clara en dichas zonas, quizá reflejo de la redundancia funcional dentro de los genes *TOP*.



**Fig. IV-26: Localización del mRNA de *TOP1* (A) y *TOP2* (B) mediante hibridación *in situ*.**

(A1) Expresión en el meristemo inflorescente y en los primordios florales, la flecha indica expresión en la capa L3 del primordio floral. (A2) Las flechas indican expresión en los primordios de los estambres. (A3) Se observa la expresión en los primordios de los distintos órganos florales. (A4) Expresión uniforme en los distintos órganos florales. (A5) Se observa la expresión en las zonas apicales de los distintos órganos florales. (A6) Las flechas indican la expresión en la zona de abscisión de los órganos florales. (A7) Expresión en la zona apical del carpelo y de los estambres. (A8 y A9) Expresión en la zona apical del carpelo y en los óvulos. La flecha en A9 indica expresión en la zona apical del tracto de transmisión. (B1) La flecha indica expresión en el primordio floral. (B2) Expresión en el meristemo inflorescente (flecha) y uniforme en los distintos órganos florales (B2, B3 y B4). (B5) La expresión se localiza en las regiones apicales del carpelo y en los óvulos.

### 2-3-2. Generación de la construcción pMT5 (*TOP1*<sub>pro</sub>::*GUS*) y análisis de la expresión del gen delator en planta.

Se realizó la construcción pMT5, que consistió en una fusión traduccional de 2,7 Kb de la región reguladora 5' del gen *TOP1*, que incluía el primer exón no traducido, el intrón y el segundo exón hasta el ATG, al gen delator de la β-glucuronidasa (*GUS*). Se analizó la expresión del gen delator en distintas partes y estadios de desarrollo de la

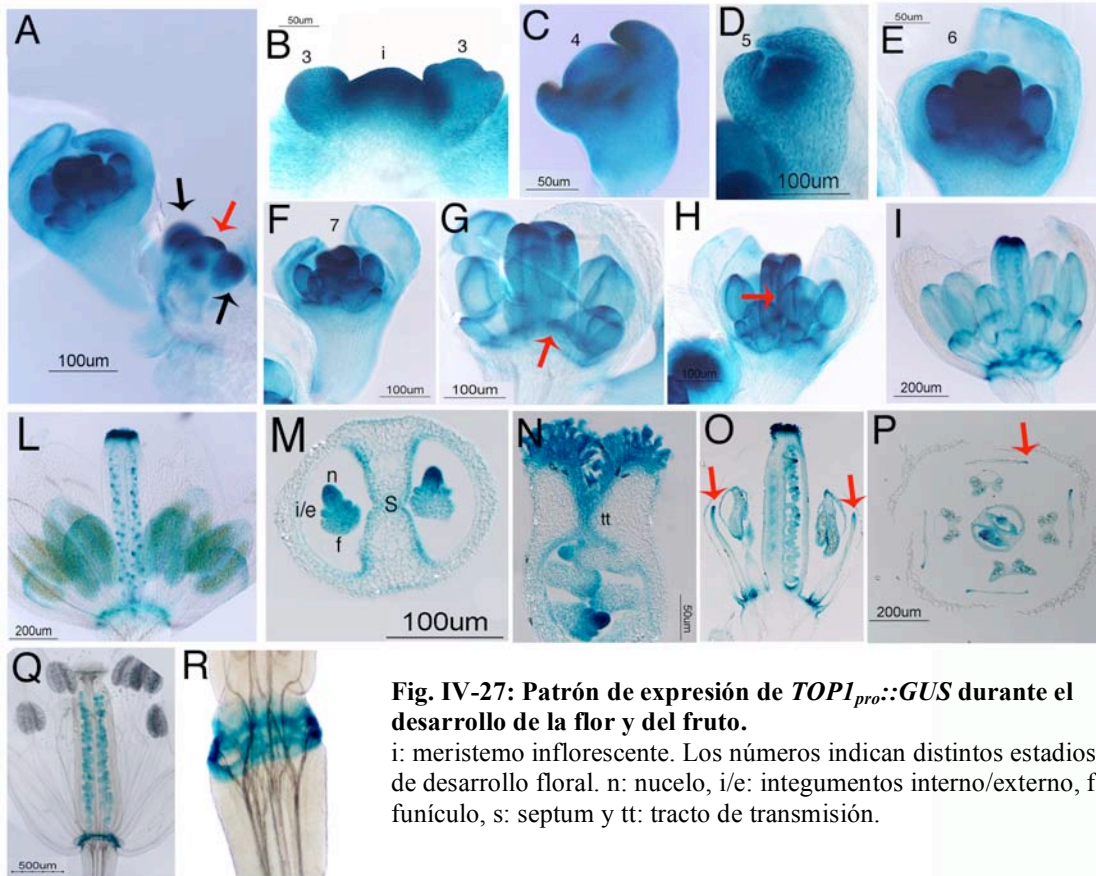


## RESULTADOS

planta, estudiando con más detalle aquellas en las que los mutantes de pérdida de función de los genes *TOP* estuvieran alteradas.

### Patrón en órganos reproductivos.

• Patrón durante el desarrollo de la flor y del fruto.



**Fig. IV-27: Patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* durante el desarrollo de la flor y del fruto.**

i: meristemo inflorescente. Los números indican distintos estadios de desarrollo floral. n: nucelo, i/e: integumentos interno/externo, f: funículo, s: septum y tt: tracto de transmisión.

(A) Expresión en el meristemo inflorescente (flecha roja) y en los primordios del meristemo floral (estadio 1-2, flecha negra). (B) Expresión en flores de estadio 3. Expresión más intensa en zonas adaxiales. (C) Flor de estadio 4, expresión más intensa en la zona apical de los sépalos. (D) Expresión más intensa en la zona del primordio del gineceo. (E y F) Expresión uniforme en los distintos órganos florales, menos intensa en los sépalos. (G y H) Expresión más intensa en las zonas apicales de los distintos órganos florales y en la zona de abscisión de los mismos (flecha en G). La flecha en H indica expresión en el tejido placentario. (I) Expresión muy intensa en la zona apical del carpelo. (L) No se detecta expresión en los sépalos. Expresión muy fuerte en óvulos y en la región apical del gineceo. (H) Expresión más intensa en las regiones apicales de los óvulos y en el septum. (N) Expresión en el tracto de transmisión (tt). (O) Las flechas indican expresión en la zona apical de los pétalos. (P) Expresión en el margen de los pétalos (flecha). (Q) Flor en antesis. Se localiza expresión en la zona de abscisión de los órganos florales y en los óvulos. Se observa expresión en el polen. (R) Detalle de la zona de abscisión de los órganos florales (fruto de estadio 16).

La expresión del gen delator se localizó en todo el meristemo inflorescente y en el primordio del meristemo floral en estadios tempranos del desarrollo de la flor (1-2) (Fig. IV-27 A). En flores de estadio 3 se detectó la expresión con mayor intensidad en la zona cercana al meristemo inflorescente (adaxial) (Fig. IV-27 B). En flores de estadio 4 (Fig. IV-27 C) se observó la expresión con mayor intensidad en la zona apical de los

sépalos. Posteriormente, conforme la flor se desarrolló y el meristemo floral se expandió para dar lugar a la plataforma donde se formaría el gineceo (estadio 5), la expresión continuó siendo generalizada en toda la flor, aunque más intensa en los primordios de los pétalos y estambres y en la zona donde se formaría el gineceo (Fig. IV-27 D).

En estadios 6 (Fig. IV-27 E), cuando los sépalos engloban la flor y el gineceo comienza a formarse, y en estadio 7 (Fig. IV-27 F), cuando aparece el pedúnculo de los estambres mediales, se detectó la expresión del gen delator en todos los verticilos florales, aunque en los sépalos que prácticamente han alcanzado su longitud final la expresión era mucho menos intensa que en el resto de los mismos. En los pétalos, estambres y carpelos se detectó la expresión con mayor intensidad en las zonas apicales de los mismos.

Posteriormente, en estadios 7 y 8, la expresión continuó extendida por toda la flor, siendo más visible en la zona apical del gineceo y en la zona de abscisión de los órganos florales (Fig. IV-27 G y H), así como en el tejido placentario (Fig. IV-27 H). En estadio 9, previo al cierre del gineceo, se observó la expresión muy intensa en la región apical del mismo (Fig. IV-27 I). En cortes transversales y en cortes longitudinales se observó expresión en todas las capas celulares de los distintos órganos, destacándose la expresión en las regiones apicales (datos no mostrados).

A partir de estadio 10, la expresión continuó siendo intensa en las regiones apicales de todos los verticilos florales, excepto en los sépalos (Fig. IV-27 L). En este estadio se puede observar la expresión fuerte en los óvulos. En la figura IV-27 L se puede también observar la expresión en la zona de abscisión de los órganos florales. A medida que los órganos florales se iban desarrollando, la expresión del gen delator disminuyó en los pétalos. Así, en estadios 11 y 12 la expresión se localizó de manera intensa en el estilo y en el estigma, así como en los óvulos. En estadio 11, los óvulos comienzan a desarrollar los integumentos internos (i) y externos (e) entre el nucelo (n) y el funículo (f). En cortes transversales, se detectó que la expresión en óvulos se concentraba en las regiones apicales, en el nucelo (Fig. IV-27 M). También se localizó expresión en la región del septum (s) (Fig. IV-27 M). En cortes longitudinales, se observó expresión en la zona del tracto de transmisión (tt) (Fig. IV-27 N). La expresión del gen delator continuó localizada en la zona de abscisión de los órganos florales y en las regiones apicales de los pétalos (Fig. IV-27 O). En los cortes transversales también se observaba que la expresión en los pétalos estaba localizada en el margen de los mismos (Fig. IV-27 P)

A partir de estadio 13 (antesis) (Fig. IV-27 Q), la expresión quedó delimitada en los óvulos y en la zona de abscisión de los órganos florales. Se observó también expresión en polen. Por último, en frutos de estadio 16, la expresión se restringía a la zona de abscisión de los órganos florales (Fig. IV-27 R) y a los embriones (Fig. IV-28).

Como se puede observar, el patrón de expresión que refleja el gen delator *GUS* en las líneas *pMT5* concuerda con el descrito mediante los experimentos de hibridación *in situ* de mRNA, sin embargo la señal *GUS* permanece en los distintos tejidos durante más tiempo a lo largo del desarrollo. Esto puede ser debido a que la estabilidad de la proteína *GUS* es mayor que la del mRNA detectado mediante hibridación *in situ*.

•Patrón durante el desarrollo de los óvulos y semillas.

Se continuó con el análisis de las líneas *pMT5 (TOP1<sub>pro</sub>::GUS)* determinando el patrón de expresión del gen delator en los óvulos y semillas.

La expresión del gen delator se localizó en los óvulos en estadios tempranos de desarrollo (gineceo en estadio 11) con mayor concentración en las zonas distales (Fig. IV-28 A). En óvulos más desarrollados, (gineceo en estadio 12) la expresión era ubicua (Fig. IV-28 B).

Desde los primeros estadios de desarrollo de la semilla tras la fertilización, cuando el embrión comienza a dividirse (Fig. IV-28 C), hasta estadios más avanzados, la expresión del gen delator sólo se localizó en el embrión, no observándose expresión en la testa (capa materna) ni en las células del suspensor (hipófisis) en ningún estadio.

En embriones de estadio globular (Fig. IV-28 D) la expresión se detectó de manera homogénea en los mismos. Este patrón se repitió en semillas con embriones de estadio corazón (Fig. IV-28 E y F). En embriones de estadio torpedo la expresión, aunque generalizada, se localizó con mayor intensidad en la zona apical de los mismos, que dará lugar a los cotiledones y con menor intensidad en la zona que dará lugar a la raíz (Fig. IV-28 G). En embriones desarrollados de estadio cotiledón (Fig. IV-28 H e I) la expresión del gen delator se encontraba expandida aunque con menor intensidad en la zona distal de la radícula.

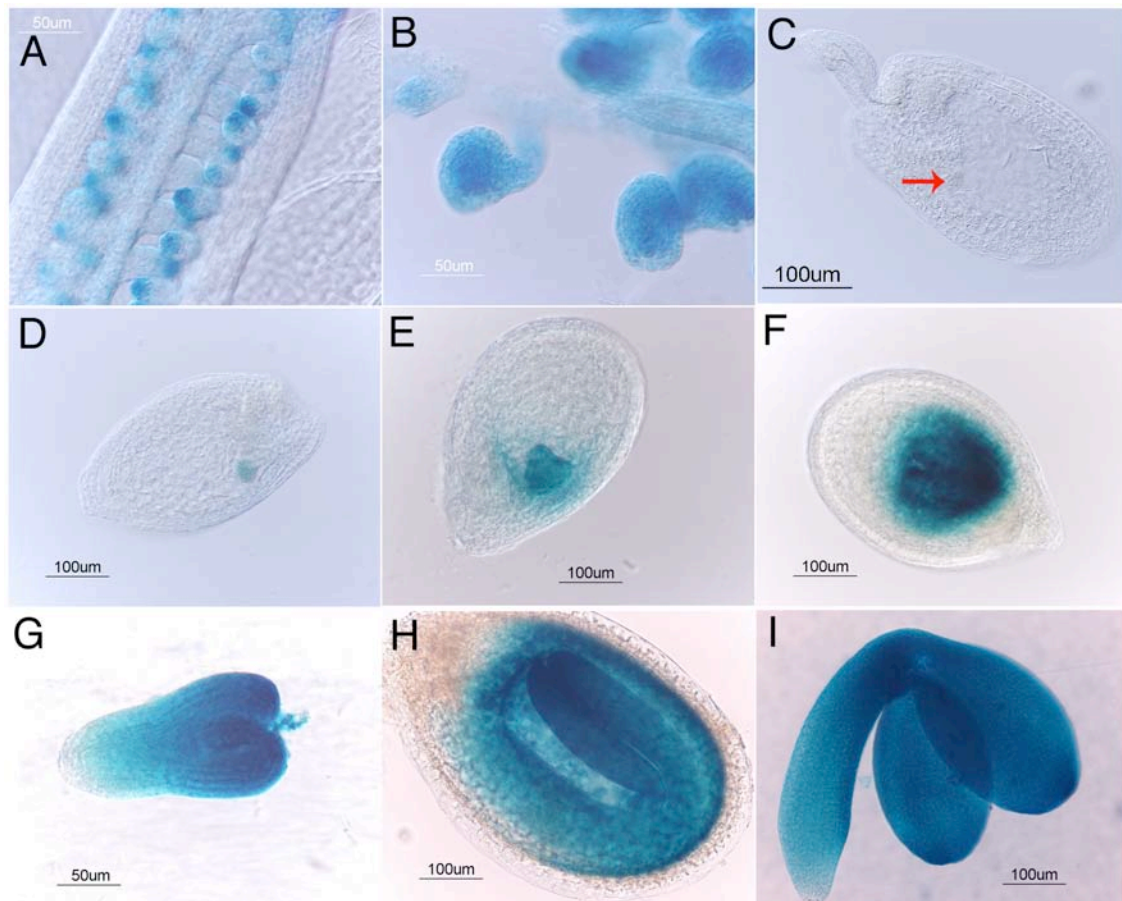
Las zonas de máxima expresión del gen delator coincidían en general con zonas de aparición/elongación de nuevos órganos (p. ej. óvulos, embriones, cotiledones). Este patrón también recordaba al descrito para la acumulación local de auxinas que se ha detectado en los sitios de iniciación de los órganos incipientes tanto de la raíz como del tallo (Benkova *et al.*, 2003). El patrón de expresión de *TOP1* sugería la posible relación con zonas de niveles elevados de auxinas durante el desarrollo de la inflorescencia. Para determinar si en otros órganos de la planta el patrón de expresión también coincidía con zonas de acumulación de auxinas y/o desvelar nuevos aspectos del patrón de expresión de *TOP1*, se analizó la expresión del gen delator en distintos órganos de la planta.

### Patrón en órganos vegetativos

•Patrón en cotiledones y hojas.

El mutante *top1-3* y el doble mutante *top1-3 top2-2* tenían defectos en los haces vasculares de los cotiledones, por lo que se podía esperar que los genes *TOP* se expresaran en dichas zonas. Además, el análisis fenotípico de las líneas de

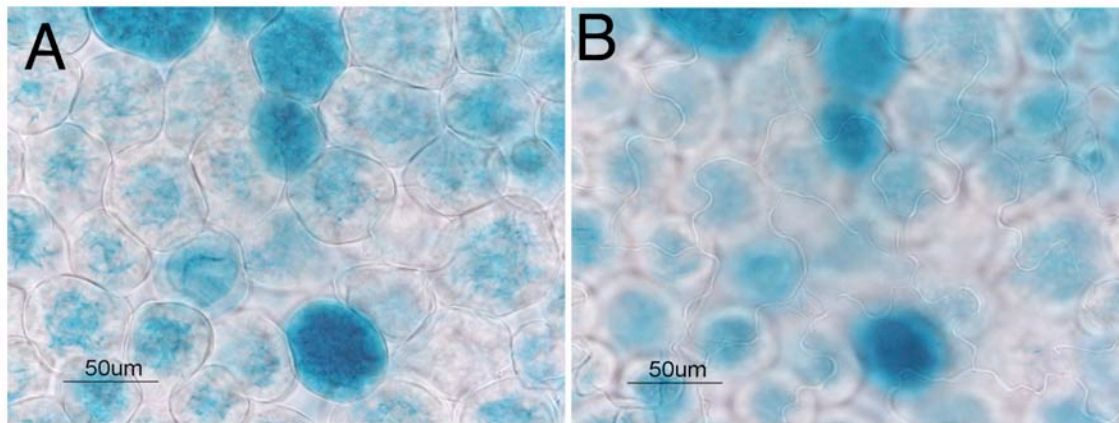
sobreexpresión y de los mutantes de pérdida de función de los genes *TOP* reveló posibles implicaciones de éstos en el desarrollo de las hojas y cotiledones. Las hojas de roseta de la línea *top1-ID* eran más alargadas y estrechas que las de Col-0. Por lo tanto, se analizó el patrón de expresión de la construcción *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* tanto en cotiledones como en hojas de *Arabidopsis* de fondo Col-0.



**Fig. IV-28: Patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* durante el desarrollo de los óvulos y las semillas.**

(A) Se observa expresión intensa en las zonas distales de los óvulos (gineceo en estadio 11). (B) Expresión en óvulos del gineceo en estadio 12. (C) La flecha indica la localización del embrión. (D) Expresión en embrión de estadio globular. (E y F) Expresión en embrión de estadio corazón. (G) Expresión en embrión de estadio torpedo. (H e I) Expresión en embrión de estadio cotiledón.

En los cotiledones, se observó la señal del gen delator *GUS* en células dispersas por toda la lámina del cotiledón con un máximo de intensidad en el extremo más distal de los mismos (Fig. IV-30 A). También se observó una mayor intensidad de la señal *GUS* en el margen del cotiledón en las zonas cercanas al peciolo (Fig. IV-30 A flechas). La expresión se localizó, en concreto, en la capa de células en empalizada que se encuentra por debajo de la epidermis adaxial (Fig. IV-29 A) (Bohmert *et al.*, 1998). En esta última no se observó expresión (Fig. IV-29 B).



**Fig. IV-29: Patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en cotiledones.** (A) Células en empalizada. (B) Epidermis adaxial.

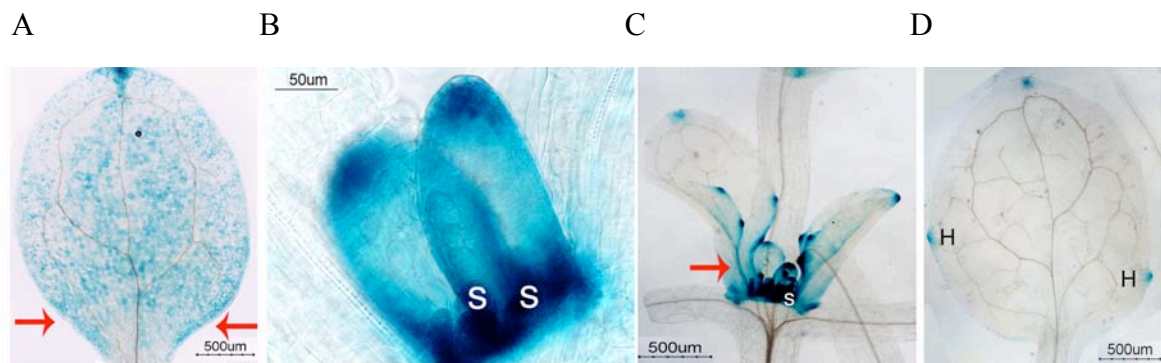
Aunque no se ha descrito para cotiledones, esta expresión del gen delator recordaba a la descrita en (Donnelly *et al.*, 1999) para el gen de la *cyclin 1 (cycAt)* que pone de manifiesto la existencia de un meristemo intercalar que permite la expansión de la lámina, en este caso, de la hoja. Este hecho podría involucrar a los genes *TOP* en los procesos de proliferación celular, al menos en los órganos laterales. Por otra parte, la expresión recordaba a la descrita también en (Donnelly *et al.*, 1999) para la existencia de un meristemo marginal que se encuentra entre el plano abaxial y adaxial de la hoja y que establece la polaridad de la misma, sugiriendo una posible implicación de los genes *TOP* en estos procesos.

En la figura IV-30 B se muestra una plántula de estadio joven (3 días tras la germinación), en la que se observó expresión del delator *GUS* en toda la hoja, con mayor intensidad en las regiones distales y en las estípulas (s). La figura IV-30 C muestra una plántula 9 días tras la germinación en la que se puede observar como la expresión del gen delator va cambiando a lo largo del desarrollo de las hojas. Conforme la hoja va desarrollándose la expresión que se detectaba uniformemente por la misma va localizándose en las regiones distales para posteriormente acumularse en los hidátodos y en el extremo distal. En la figura IV-30 C también se puede observar la expresión en las estípulas (s) y en el margen de la hoja en las zonas cercanas al peciolo (flecha). Esta última zona de expresión podría coincidir con el meristemo marginal antes mencionado. En hojas de plántulas crecidas 9 días tras la germinación, la expresión quedaba localizada fundamentalmente en los hidátodos (Fig. IV-30 D) y en el extremo distal. No se detectó expresión en el tejido vascular.

Se ha propuesto que un transporte dirigido de auxinas establece el extremo distal del primordio de la hoja en desarrollo como sumidero de auxinas (Reinhardt *et al.*, 2003), por lo que se genera un máximo local en el extremo distal del primordio en



desarrollo (Benkova *et al.*, 2003). Este máximo de concentración puede proporcionar la información posicional para el desarrollo de la vena medial (Zgurski *et al.*, 2005). Conforme se desarrolla la hoja, el extremo distal pasa de ser sumidero a convertirse en fuente de auxinas. La síntesis de auxinas ocurre primero en el extremo distal de las hojas y luego en los hidátodos (en los márgenes).



**Fig. IV-30: Patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en cotiledones y en hojas.**

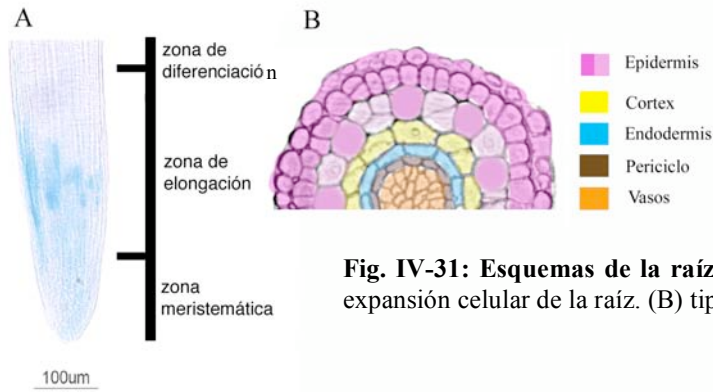
(A) Expresión en cotiledones. (B) Plántula de 3 días tras la germinación. (C) Plántula de 9 días tras la germinación. (D) Expresión en hoja.  
s: estípulas, H: hidátodos.

De nuevo, el patrón de expresión del gen delator concordaba con zonas descritas como zonas de mayor concentración de auxinas, bien por síntesis o por acumulación de las mismas, como el extremo distal de los cotiledones y de las hojas, y los hidátodos de las hojas, volviendo a poner de manifiesto la posible relación de los genes *TOP* con las auxinas.

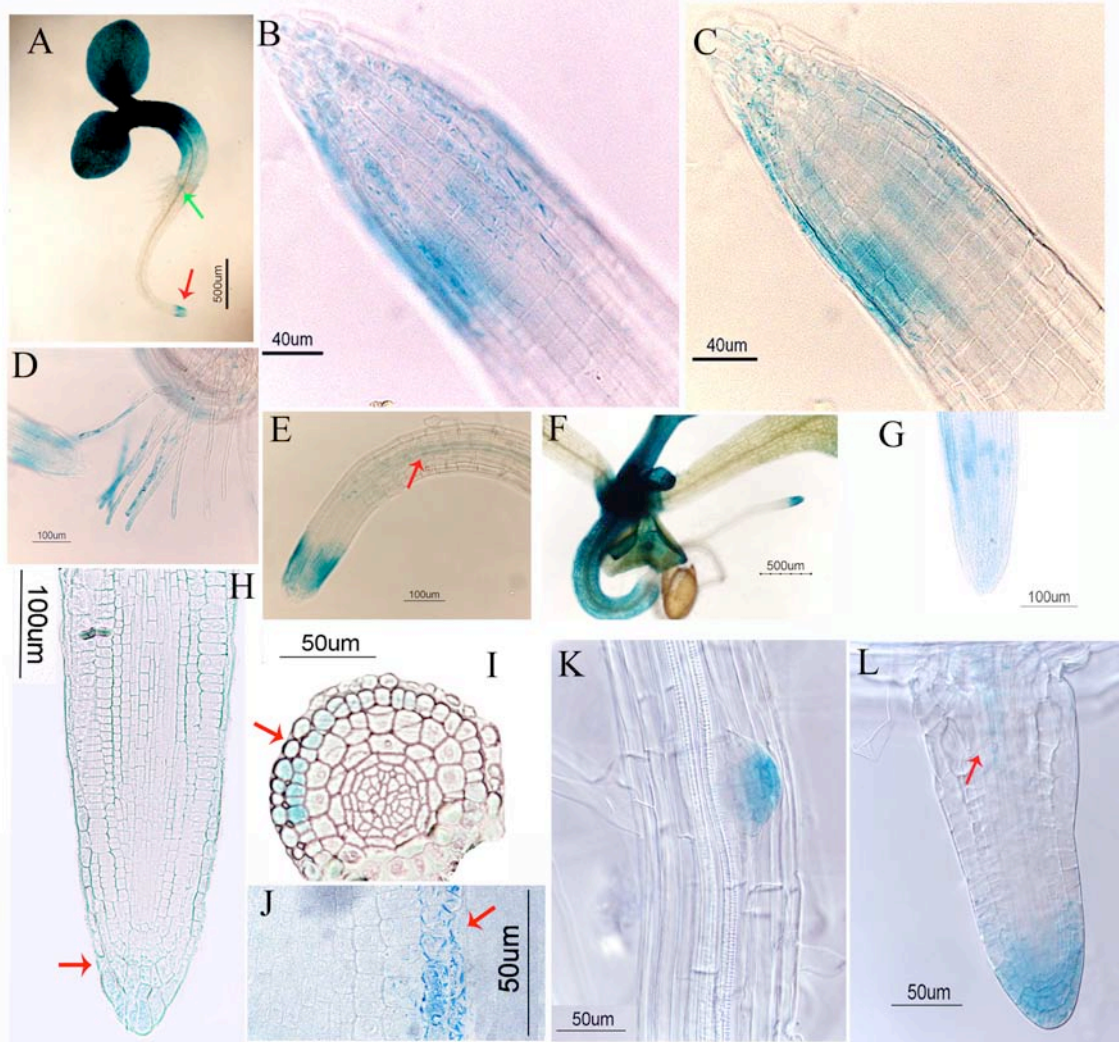
•Patrón en la raíz.

La línea *top1-ID* tenía raíces de menor longitud que el silvestre y proliferación de raíces secundarias. El doble mutante *top1-3 top2-2* mostraba una reducción en el número de raíces laterales y en la longitud de las principales. Dados estos fenotipos, se analizó la expresión del gen delator en raíces.

La raíz de *Arabidopsis* muestra una anatomía relativamente simple (Dolan *et al.*, 1993). Su organización radial consiste en líneas de células únicas de epidermis, cortex y endodermis que engloban el cilindro vascular central con una organización en arcos del xilema y dos polos opuestos de floema. En la figura IV-31 B se muestra un esquema de los tipos celulares principales de la raíz de *Arabidopsis*. En la figura IV-31 A se muestra las distintas zonas de expansión celular de la raíz. En la zona meristemática las células son en general isodiamétricas. Conforme atraviesan la zona de elongación, termina la expansión radial y comienza la expansión longitudinal (Scheres, 2002).



**Fig. IV-31: Esquemas de la raíz de *Arabidopsis*.** (A) zonas de expansión celular de la raíz. (B) tipos celulares de la raíz.



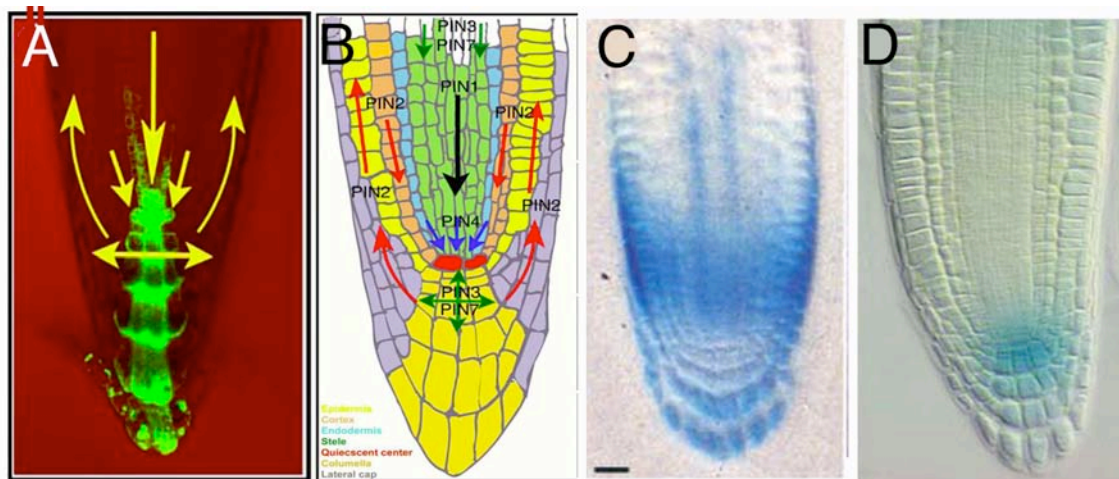
**Fig. IV-32: Patrón de expresión de  $TOP1_{pro}::GUS$  durante el desarrollo de la raíz.**

(A) Plántula de 2 días tras la germinación. La flecha roja señala la raíz principal y la verde la secundaria. (Ay B) Fotografías de la misma raíz en dos planos distintos. (B) Expresión en las células de la epidermis. (C) No se observa expresión en el centro quiescente. (D) Expresión en los pelos radiculares. (E) Expresión débil en la vasculatura de la raíz principal (flecha). (F) Plántula de 4 días tras la germinación. (G) Expresión en la zona de elongación de la raíz principal en plántulas de 4 días tras la germinación. (H) La flecha indica la expresión en la capa externa de la raíz principal. (I y J) Las flechas indican la expresión en la epidermis de la raíz. (K) Expresión en la raíz secundaria. (L) La flecha indica la expresión en la vasculatura de la raíz secundaria.

Se detectó expresión del gen delator tanto en la raíz principal como en las raíces secundarias. En la raíz principal, la expresión del gen delator se localizó en la zona distal de la misma. En esta localización se encuentra el meristemo apical de la raíz o *RAM* (de *Root Apical Meristem*) (Fig. IV-32 A, flecha roja). En estadios tempranos de desarrollo, aproximadamente 2 días tras la germinación, la expresión se observó en las dos capas de células de la epidermis, no en el centro quiescente (Fig. IV-32 B y C); también se observó expresión en los pelos radiculares (Fig. IV-32 D) y en la vasculatura, aunque con intensidad débil (Fig. IV-32 E). En estadios posteriores de desarrollo, en los que ya se observan las hojas (Fig. IV-32 F), se observó acumulación de la expresión en la zona de elongación (Fig. IV-32 G). En cortes transversales y longitudinales de la raíz principal se observó la expresión en la capa externa de la raíz y en la epidermis aunque formando sectores que no pudieron identificarse con ninguna estructura morfológica particular (Fig. IV-32 H, I y J). Estas dos últimas zonas de expresión concuerdan con las descritas para la existencia del meristemo basal implicado en la formación de raíces laterales (De Smet *et al.*, 2007). En las raíces laterales, se localizó la expresión en estadios muy tempranos del desarrollo de las mismas (Fig. IV-32 A, flecha verde), acumulándose posteriormente en la zona meristemática (Fig. IV-32 K); también se observó expresión en la vasculatura (Fig. IV-32 L, flecha roja).

Este patrón de expresión continuaba poniendo de manifiesto la relación de los genes *TOP* con las auxinas, ya que en las zonas donde se expresa *TOP1* los niveles de auxinas son elevados, como ha demostrado la expresión de la construcción *DR5::GUS* (Benkova *et al.*, 2003). DR5 es un promotor sintético que constituye una herramienta útil para monitorizar indirectamente los niveles endógenos de auxinas (Casimiro *et al.*, 2001). En la figura IV-33 A se muestra un esquema de la distribución de las auxinas según lo publicado en (Michniewicz, 2007). Sin embargo, la expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en la capa externa de la raíz y en la epidermis, más que con la de *DR5::GUS* (Fig. IV-33 D) (Benkova *et al.*, 2003), concordaba con la localización de transportadores del flujo de auxinas como *PINFORMED2* (*PIN2*) (Fig. IV-33 B) (Michniewicz, 2007) y *AUXIN RESISTANT1* (*AUX1*) (Fig. IV-33 C) (Swarup *et al.*, 2001), por lo menos en estadios de desarrollo de la raíz de 1-2 días tras germinación.

La expresión del gen delator en raíz contrastaba con la falta de defectos evidentes en la misma, puesto que no se encontraron alteraciones ni en el número de células ni en los tipos celulares de la raíz de los mutantes *top*. De nuevo y de manera similar a lo que ya se ha descrito para la flor y el fruto, este hecho puede ser debido a que la redundancia funcional que muestran los miembros de la familia *TOP* enmascara posibles alteraciones en la raíz.



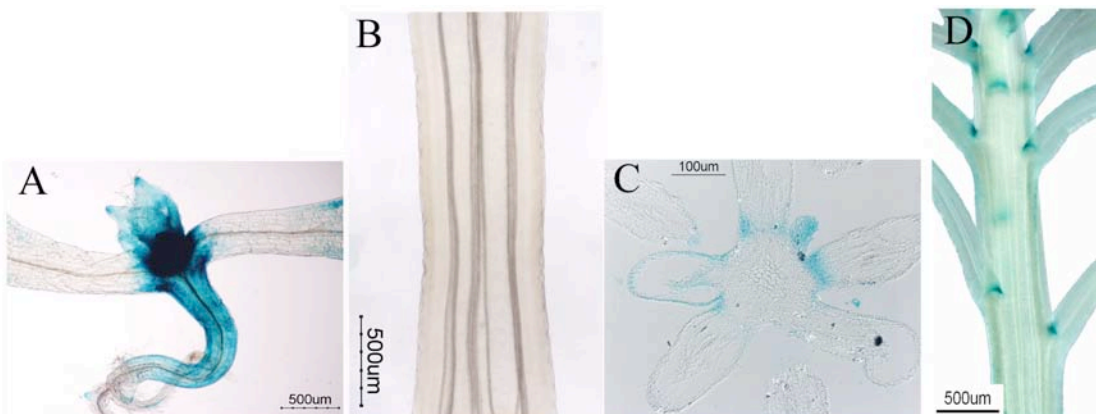
**Fig. IV-33: Esquema comparativo de la distribución de la auxinas y sus transportadores en la raíz de *Arabidopsis*.**

(A) Diagrama mostrando las direcciones predominantes del flujo auxínico y la acumulación de auxinas en el extremo distal de la raíz visualizada por la *DR5rev::GFP*. Tomado de Michniewicz *et al* (2007). (B) Diagrama representativo de la raíz de *Arabidopsis* con flechas indicando la dirección del transporte de auxinas mediado por PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 y PIN7. Tomado de Michniewicz *et al* (2007). (C) Imagen del ápice de una raíz con señal GUS de *AUX1*. Tomado de Swarup *et al* (2001). (D) Señal de *DR5::GUS* en el meristemo central de una raíz lateral madura. Tomado de Benkova *et al* (2001).

Patrón en otras partes de la planta.

Se detectó expresión del gen delator en el hipocotilo de plántulas en estadios muy tempranos de desarrollo (3 días tras germinación) (Fig. IV-34 A).

En secciones de tallo de plantas adultas no se encontró expresión del gen delator (Fig. IV-34 B). Sin embargo, sí se localizó señal en la zona de unión entre el tallo y los pedicelos de las flores (Fig. IV-34 C y D), que puede asociarse con la existencia de un meristemo axilar (Busse, 1999).



**Fig. IV-34: Patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en otras partes de la planta.**

(A) Expresión en el hipocotilo. (B) No se detectó expresión en el tallo de plantas adultas. (C y D) Expresión en los meristemos axilares. La figura C muestra un corte transversal del tallo de plantas pMT5.



### 2-3-3. Tratamiento con NPA y 2-4D de plantas de la línea *pMT5*.

Muchos resultados indicaban una posible relación de los genes *TOP* con las auxinas. Para comprobar si la expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* variaba al modificar los niveles de auxinas en la planta, se trataron inflorescencias de plantas *pMT5* con 2-4D, una auxina sintética, y NPA, un inhibidor del transporte polar de auxinas.

Los inhibidores del transporte polar de auxinas (TPA o PAT en inglés) se han utilizado durante décadas para interferir en el flujo polar de auxinas, compitiendo directamente con las auxinas en la unión con sus transportadores o provocando que las células sean incapaces de transportarlas (Michniewicz, 2007). La aplicación de dichos inhibidores resulta en la acumulación de las auxinas cerca de la fuente de las mismas y la depleción de éstas en las células localizadas aguas abajo (a cierta distancia) en el transporte. Los tratamientos con inhibidores del PAT aumentan la pendiente de los gradientes de auxinas de manera dependiente de la concentración de los inhibidores.

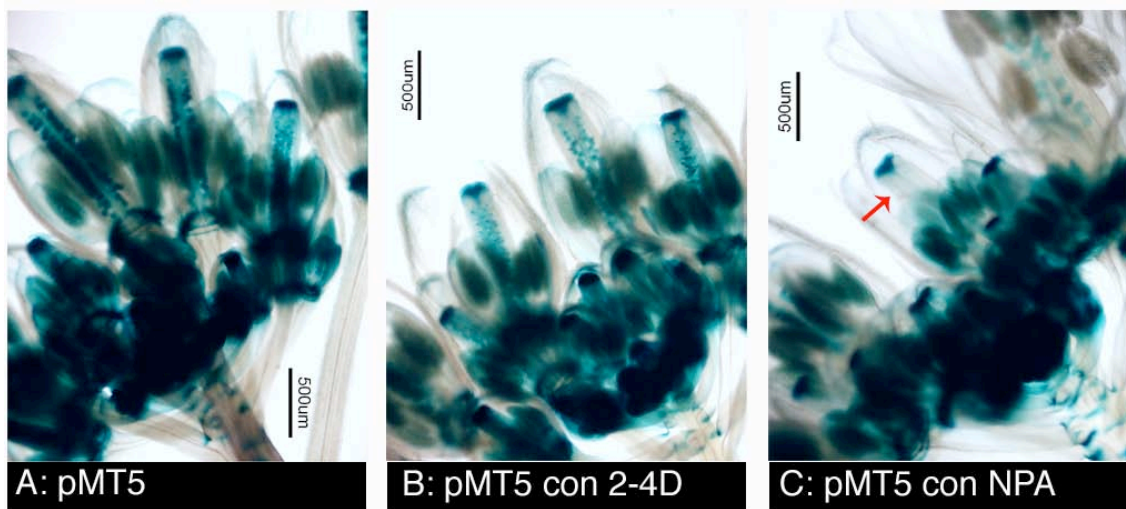


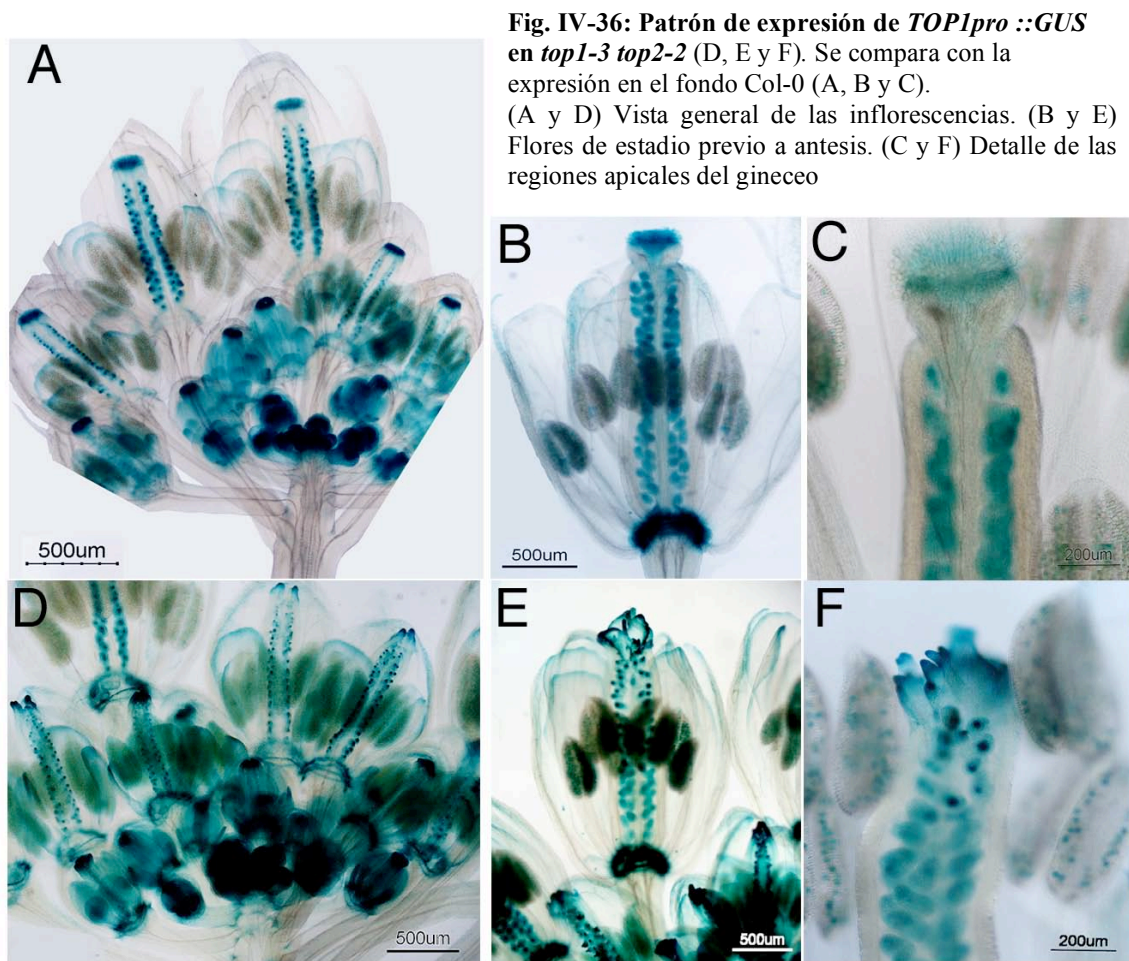
Fig. IV-35: Tratamientos de las plantas *pMT5* con auxinas (2-4D) y con inhibidores del transporte polar de las mismas (NPA). La flecha indica ausencia de óvulos en la zona apical del ovario.

No se encontraron diferencias en la expresión del gen delator en las plantas tratadas con 2-4D respecto al silvestre (Fig. IV-35 B). Tampoco se encontraron diferencias en la expresión en las plantas tratadas con NPA. En éstas últimas no se detectó expresión del gen delator en la zona apical del ovario (Fig. IV-35 C, flecha), ya que tampoco se encontraron óvulos en dicha zona, probablemente debido al tratamiento con NPA que puede provocar la pérdida de los mismos (Nemhauser *et al.*, 2000).

Por lo tanto, el análisis de expresión de la línea *pMT5* parecía indicar que ésta no variaba frente a la aplicación exógena de auxinas ni al inhibir el transporte polar de las mismas, sugiriendo que los genes *TOP* no respondían a las concentraciones de auxinas y que su papel en estas vías podría estar implicado en la síntesis y/o el transporte de las mismas.

**2-3-4. Expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en fondo mutante *top1-3 top2-2*.**

Para determinar la posible autoregulación de *TOP1* y *TOP2*, se estudiaron cambios en la expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en el doble mutante *top1-3 top2-2* (Fig. IV-36). No se encontraron cambios en el patrón de expresión del gen delator en el doble mutante *top1-3 top2-2* respecto al silvestre. En *top1-3 top2-2* se localizó la expresión del gen delator en inflorescencias, en flores de estadio joven en todos los verticilos y, conforme la flor se desarrollaba, la expresión se restringió a las zonas apicales del gineceo, los óvulos y la zona de abscisión de los órganos florales. Se localizó también expresión en la zona de unión de los pedúnculos florales y el tallo.



**Fig. IV-36: Patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en *top1-3 top2-2* (D, E y F). Se compara con la expresión en el fondo Col-0 (A, B y C). (A y D) Vista general de las inflorescencias. (B y E) Flores de estadio previo a antesis. (C y F) Detalle de las regiones apicales del gineceo**

En resumen, la expresión del gen delator *GUS* bajo la dirección de la región promotora del gen *TOP1* se localizó en las zonas apicales del gineceo, el estilo y el estigma, zonas afectadas en los mutantes de pérdida de función de los genes *TOP*, así como en muchas de las zonas posiblemente relacionadas con las auxinas, como en las puntas de distintos órganos de la planta, cotiledones, hojas y raíces.

## **2-4. Obtención y caracterización de líneas de ganancia de función.**

### **2-4-1. Obtención y caracterización de las líneas de ganancia de función inducibles *pMT2* y *pMT4*.**

Como se ha descrito en el apartado de los antecedentes, las líneas de sobreexpresión de *TOP1*, *top1-ID*, *CFM97* y *SS060*, tenían un fenotipo similar entre sí pero que se atenuaba a lo largo de las generaciones. Además, muchas de las plantas no llegaban a completar el ciclo reproductivo, dificultando el análisis de los fenotipos conferidos por la sobreexpresión de *TOP1*, así como la utilización de estas líneas en el análisis genético de la función TOP.

El promotor usado en estas líneas para sobreexpresar *TOP1* era el 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el vector que se utilizó era un derivado del pBIN19. El 35S es un promotor fuerte que se expresa en diferentes estadios de desarrollo y tejidos y en un amplio rango de plantas (Kang *et al.*, 1999). Sin embargo, el 35S tiene algunas limitaciones por ejemplo: no se puede utilizar para aquellos genes cuya ganancia de función provoque la letalidad de los mutantes afectados y tampoco es adecuado para el estudio de estadios de desarrollo o tejidos concretos (Kang *et al.*, 1999) (McNellis *et al.*, 1998). Para solventar estas limitaciones se ha realizado un gran esfuerzo en la generación de promotores inducibles o específicos de tejido (Aoyama y Chua, 1997) (Gatz, 1997). Estos sistemas incluyen el de expresión inducible por glucocorticoides (Aoyama y Chua, 1997).

El sistema inducible por glucocorticoides utiliza el método de regulación de los receptores de hormonas esteroides de los vertebrados que presenta ventajas en su uso en plantas, como una regulación estrecha y la facilidad para manipular los niveles de inducción (Aoyama y Chua, 1997). Fundamentalmente, el sistema está basado en la activación inducible del receptor de glucocorticoides (GR), un factor de transcripción regulado por la unión a un ligando. En ausencia de una hormona glucocorticoide, el dominio GR queda retenido en el citoplasma de las células, pero en presencia de la misma la configuración del GR cambia y la proteína de fusión se trasloca al núcleo, lo que permite poner de manifiesto el fenotipo del gen estudiado (Aoyama y Chua, 1997; Kang *et al.*, 1999) (McNellis *et al.*, 1998).

Para obtener líneas de sobreexpresión de los genes *TOP* que no presentaran los problemas de letalidad y atenuación del fenotipo de las líneas *top1-ID*, *CFM97* y *SS060* y poder realizar un estudio detallado de sus fenotipos, se diseñaron construcciones inducibles utilizando el sistema del receptor de los glucocorticoides GR.

Diseño de las construcciones *pMT2* y *pMT4* para la expresión inducible de *TOP1* y *TOP2* respectivamente y transformación de *Arabidopsis thaliana* con las mismas.

Se diseñaron dos construcciones inducibles; *pMT2* y *pMT4*. En estas construcciones la secuencia codificante de los genes *TOP1* y *TOP2* (respectivamente) se fusionó en pauta, aguas arriba de la secuencia codificante del receptor de

glucocorticoides (GR) quedando ambas bajo el control de un promotor CaMV35S (aptdo 5-2 de materiales y métodos).

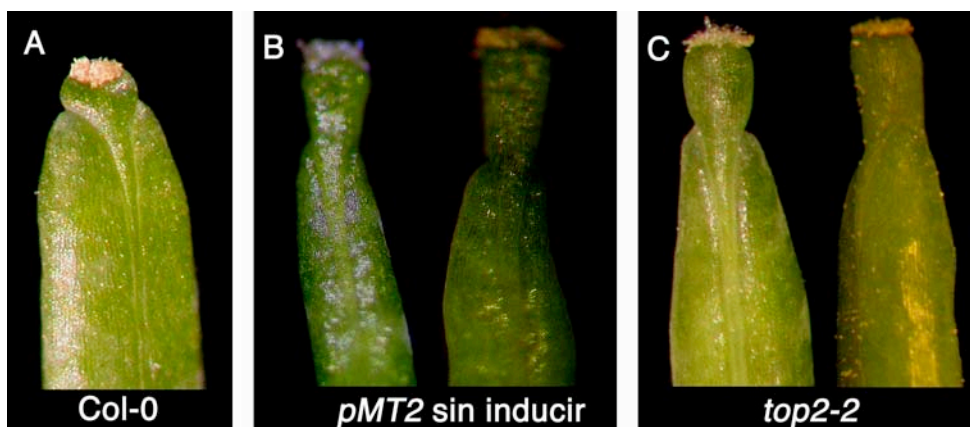
Con estas construcciones inducibles se pretendía que las proteínas de fusión TOP1-GR y TOP2-GR respectivamente se acumularan en el citoplasma y sólo tras el tratamiento con dexametasona, un glucocorticoide sintético, se traslocaran al núcleo poniendo de manifiesto el fenotipo de sobreexpresión.

Se transformaron plantas de *Arabidopsis* con las construcciones pMT2 (35S:TOP1:GR) y pMT4 (35S:TOP2:GR). Se obtuvieron 16 transformantes primarios con la construcción pMT2 y 30 con la construcción pMT4.

Descripción del fenotipo sin inducción de las líneas (T1) pMT2 y pMT4.

Las líneas pMT2 y pMT4 resistentes a kanamicina y crecidas en condiciones no inductivas (sin dexametasona), se transplantaron a tierra para ver si mostraban algún fenotipo distinto al silvestre.

No se encontraron diferencias destacables en el porte de las plantas pMT2 respecto al silvestre. Respecto al fruto la mayoría de las plantas no se diferenciaban del silvestre, sin embargo, algunas plantas presentaban frutos con el estilo más alargado que el silvestre (Fig. IV-37), que recordaban a los mutantes de pérdida de función *top2-2*.



**Fig. IV-37:** Fenotipo de los frutos pMT2 sin inducir con dexametasona. (A) Col-0. (B) pMT2 sin inducir. (C) top2-2.

En las líneas pMT4, como en el caso de pMT2, no se encontraron diferencias destacables en el porte de la planta respecto al silvestre. En la morfología de los frutos sin embargo, se encontró una gran variabilidad de fenotipos. Se encontraron desde plantas con frutos parecidos al silvestre hasta plantas con frutos que recordaban el fenotipo atenuado de sobreexpresión de las líneas *top1-1D*, *CFM97* y *SS060*. En ningún caso se encontró el fenotipo de sobreexpresión fuerte que recordaba al de los mutantes *ful*. Los distintos fenotipos observados se clasificaron en cuatro categorías (Fig. IV-38): **Categoría 1:** frutos parecidos al silvestre. El 18,75% de las líneas mostraron este fenotipo.



**Categoría 2:** frutos con el estilo más alargado parecido al de pérdida de función *top*. El 18,75% de las líneas mostraron este fenotipo.

**Categoría 3:** frutos de tamaño parecido al silvestre pero con crecimiento de las valvas por encima del estilo (fenotipo M débil). El 31,25% de las líneas mostraron este fenotipo.

**Categoría 4 :** frutos de tamaño menor que el silvestre, con crecimiento de las valvas por encima del estilo (fenotipo M fuerte), reducción del ovario y consiguiente aumento de la longitud del ginóforo, presentando asimetría en el crecimiento de las valvas a nivel basal. El 31,25% de las líneas mostraron este fenotipo.



**Fig. IV-38: Fenotipo de los frutos *pMT4* sin inducir con dexametasona.**

Categoría 1: frutos parecidos al silvestre.

Categoría 2: frutos con el estilo alargado.

Categoría 3: frutos con fenotipo M débil.

Categoría 4: frutos con fenotipo M fuerte.

Se muestra el porcentaje de líneas que mostraron los distintos fenotipos.

Estos resultados indicaban que mientras que la línea *pMT2* se comportaba como se esperaba, la línea *PMT4* no. El hecho de que en algunas ocasiones aparecieran fenotipos parecidos a los de sobreexpresión en plantas no inducidas podría indicar entre otras cosas, alguna actividad de la proteína de fusión TOP2-GR en el citoplasma o que la GR no estuviera transcribiéndose y no impidiera el paso al núcleo. A pesar de estos fenotipos no esperados en las líneas *pMT4* pasamos a estudiar el efecto fenotípico de la inducción con dexametasona y la optimización del efecto del tratamiento tanto en relación a la concentración, como en el modo y momento de aplicación, para las líneas *pMT2* y *pMT4*.

#### Comprobación de la eficiencia de las construcciones y determinación de la concentración de dexametasona óptima para la inducción de las construcciones.

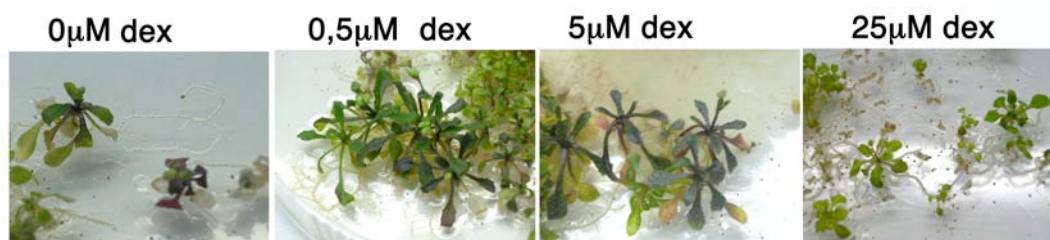
En el apartado 6.1 de materiales y métodos se describe en detalle los medios y las condiciones de cultivo utilizados en este experimento.

## RESULTADOS

---

Se sembraron semillas de las distintas líneas *pMT2* y *pMT4* en placas con medio MS y Kanamicina para seleccionar las resistentes así como con distintas concentraciones de dexametasona: 0 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 25 $\mu$ M y se dejaron crecer durante 21 días (Fig. IV-39).

Tanto las líneas *pMT2* como las *pMT4* mostraron fenotipos en las hojas de roseta al crecer en presencia de dexametasona. Estos fenotipos eran parecidos a los de las líneas *top1-1D*, *CFM97* y *SS060*. Las hojas de roseta eran más estrechas, mostraban pedúnculos más alargados y eran de color verde más oscuro que las del silvestre. Además algunas de las líneas, tanto de *pMT2* como de *pMT4* tenían hojas de roseta curvadas. Por lo tanto parecía que las construcciones respondían al tratamiento con dexametasona provocando los fenotipos de sobreexpresión esperados.



**Fig. IV-39: Fenotipo de las hojas de roseta de plantas *pMT2* crecidas en distintas concentraciones de dexametasona.** NOTA: se observó fenotipo en condiciones no inductivas (0  $\mu$ M de dexametasona).

El fenotipo en roseta comenzó a ser visible a partir de una concentración de 0,5 $\mu$ M de dexametasona y en concentraciones de 25 $\mu$ M de dexametasona la mayoría de las plantas murieron. La concentración con la que se obtuvo mayor número de plántulas con fenotipo en la roseta fue de 5 $\mu$ M de dexametasona. Por lo tanto esta concentración fue la utilizada en los posteriores experimentos. Sorprendentemente, se observó fenotipo de sobreexpresión en roseta en algunas líneas en ausencia de dexametasona (Fig. IV-39).

Determinación del momento óptimo en el desarrollo de las plantas en el que la inducción con dexametasona era más eficaz y estudio de los fenotipos de las líneas *pMT2* y *pMT4*.

- Inducción en distintos estadios de desarrollo y comparación de fenotipos.

Para determinar el momento de aplicación de dexametasona más adecuado para inducir las construcciones se realizó el siguiente experimento. Se sembraron semillas de las distintas líneas transgénicas *pMT2* (se realizó de igual forma en el caso de *PMT4*) en placas de MS con Kan (apartado 1-1-1-2) para mantener la resistencia y se dejaron crecer. De cada una de las distintas líneas las plantas resistentes se dividieron en dos grupos:

- A: se transplantaron a tierra sin ser tratadas con dexametasona.
- B: se sumergieron en una disolución de dexametasona a 5  $\mu$ M antes de transplantarlas a tierra.

Posteriormente, dentro de la misma línea, se compararon los frutos de las plantas tratadas (grupo B) y sin tratar con dexametasona (grupo A). Por último se eligieron varias plantas del grupo A y se sumergió una de sus inflorescencias en una disolución de dexametasona 5  $\mu$ M. Posteriormente se comparó el fenotipo de los frutos tratados (grupo C) con el de otros frutos de la misma planta pero de otra inflorescencia sin tratar (grupo D).

De las 4 líneas analizadas en el caso de *pMT2* ninguna mostró diferencias en el fenotipo del fruto al comparar plantas del grupo A frente a las del grupo B. Tampoco se encontraron diferencias entre los frutos de plantas del grupo C frente a las del grupo D. La mayoría de las plantas mostró un fenotipo muy parecido al silvestre independientemente de que se hubieran tratado con dexametasona o no y del momento del tratamiento. Sólo en algunas ocasiones e independientemente del grupo al que pertenecieran aparecieron frutos con el estilo más alargado que el silvestre. Por lo tanto en ningún caso se obtuvo el fenotipo de sobreexpresión esperado. Los fenotipos obtenidos recordaban el fenotipo de los alelos de pérdida de función como *top1-4* o *top2-2* en los que el estilo es más alargado que el silvestre por lo que este fenotipo observado podría deberse a problemas de cosupresión o la proteína quimérica podría estar comportándose con cierta actividad antimorfa.

El hecho de no observar el fenotipo de sobreexpresión esperado podía deberse a varios factores, que la concentración de dexametasona no fuera adecuada, que el momento de inducción no fuera adecuado, que hubiera que mantener más tiempo la inducción o quizá que la proteína quimérica estuviera respondiendo independientemente de la inducción, ya que en algunas ocasiones se había observado fenotipo en roseta en condiciones no inductivas. Para intentar conseguir el fenotipo de sobreexpresión se intentó, por una parte, inducir desde un principio las plantas, es decir sembrarlas en placas inductivas, con dexametasona, ya que sí se había observado fenotipo de sobreexpresión en roseta. Se utilizaron distintas concentraciones de dexametasona en las placas; 0,5 $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 25 $\mu$ M. Una vez crecidas las plantas, éstas se volvieron a inducir, sumergiendo una de sus inflorescencias en una disolución de dexametasona en igual concentración que las placas donde habían crecido. Posteriormente se analizó el fenotipo de los frutos.

En ningún caso se encontró el fenotipo de sobreexpresión esperado, la mayoría de las plantas tratadas mostraron estilos alargados. No se encontró ninguna correlación entre la concentración de dexametasona y el fenotipo del fruto. Además como ya se ha mencionado, el fenotipo de estilos alargados también se había observado en plantas

## RESULTADOS

---

crecidas en condiciones no inductivas por lo tanto no se continuó con el análisis de las líneas *pMT2* ya que probablemente el sistema no estaba funcionando adecuadamente.

De las 21 líneas analizadas en el caso de *pMT4*, sólo la línea *pMT4-14* mostró diferencias en el fenotipo del fruto al comparar plantas del grupo A y B. Los frutos de las plantas tratadas con dexametasona (grupo B) eran más parecidos al silvestre (categoría 2) que los frutos de las plantas que no se trataron con dexametasona (grupo A). Estos últimos mostraron fenotipo de categoría 4 (Fig. IV- 40).

En el resto de las líneas no se encontraron diferencias en el fruto entre plantas del grupo A y del grupo B apareciendo frutos de las distintas categorías indistintamente.

Tampoco se encontraron diferencias entre los fenotipos de frutos inducidos con dexametasona en flor (grupo C) frente a frutos no inducidos ( grupo D).

---



**Fig. IV-40: Comparación del fenotipo del fruto en la línea *pMT14-4* al tratar o no con dexametasona.**

Fruto de la izquierda (+ dex) tratado con dexametasona.  
Fruto de la derecha (- dex) no tratado con dexametasona.

---

Por lo tanto en el caso de las líneas *pMT4* a pesar de que sí se obtuvieron fenotipos de sobreexpresión, aunque no muy severos, no se encontró una correlación clara entre la adición o no de dexametasona y el fenotipo del fruto, independientemente del momento de adición de la misma. Por lo tanto, ya que los resultados parecían indicar que la construcción *pMT4* no era sensible a la dexametasona del modo deseado no se continuó el análisis de las líneas *pMT4*. Sin embargo como ya se ha mencionado, de los resultados se podría hipotetizar algún tipo de actividad fuera del núcleo de las proteínas TOP.

Como las líneas de sobreexpresión inducibles mostraron resultados variables respecto al fenotipo y no respondieron frente a las condiciones inductivas de forma clara y reproducible, no se podían utilizar en el análisis genético por lo que se realizó otra aproximación distinta con el fin de estudiar el efecto de la sobreexpresión de los genes *TOP*.

### 2-4-2. Obtención y caracterización de la línea de sobreexpresión pMT17.

Con el fin de conseguir una línea de sobreexpresión estable se diseñó la construcción 35S::TOP1 utilizando el sistema pGREEN ( Apartado 5-1 de materiales y métodos). El sistema pGREEN ofrece una serie de ventajas frente a otros sistemas binarios como pueden ser los derivados del pBIN (Bevan, 1984). Por ejemplo, se ha observado que la mayoría de las integraciones ocurren en un único *loci* (Hellens *et al.*, 2000), no se suelen producir inserciones en tándem y se reducen los fenómenos de silenciamiento (observaciones propias del laboratorio).

Se transformaron plantas de *Arabidopsis* con la construcción pMT17 y se obtuvieron 12 transformantes primarios.

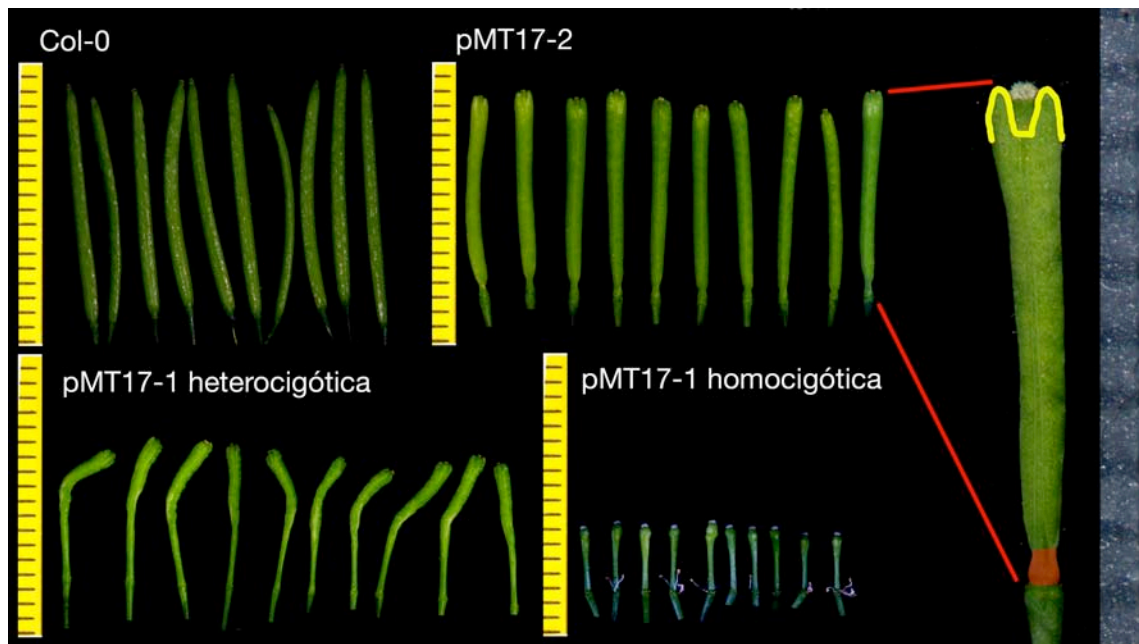
Todas las líneas mostraron fenotipo en las hojas de roseta parecido a los de la línea *top1-ID* (Fig.IV-41), es decir, hojas más alargadas y en ocasiones curvadas, y de color verde más oscuro que las del silvestre. Sin embargo, en los frutos se encontraron tres fenotipos distintos: frutos parecidos al silvestre, fenotipo mostrado por la mayoría de las plantas, fenotipo de sobreexpresión débil (tipoM) representado por la línea *pMT17-2* y el fenotipo de sobreexpresión fuerte similar al de los mutantes *ful*, con el replum en forma de zig-zag, representado por la línea *pMT17-1*. Se continuó el análisis de estas dos últimas líneas.



**Fig. IV-41: Fenotipo de las hojas de roseta de las plantas pMT17.**

Se compara con Col-0. Se repite el fenotipo de la línea de sobreexpresión de *TOP1*, *top1-ID*.

Se comparó el tamaño de los 10 primeros frutos de Col-0 frente a los 10 primeros frutos de *pMT17-1* y *pMT17-2*. El tamaño los frutos silvestres era muy homogéneo, siendo la media de longitud 16 mm. En el caso de *pMT17-1* el tamaño de los frutos también era muy homogéneo, pero éstos eran más pequeños que los silvestres, con una media de longitud de 10 mm (Fig. IV-42). Además, los frutos de *pMT17-1* presentaban el ginóforo muy alargado, de entre 4 o 5 mm, representando aproximadamente la mitad del tamaño final del fruto. El ginóforo silvestre apenas se diferenciaba del carpelo, midiendo menos de 1mm de longitud. En el caso de la línea de fenotipo menos severo *pMT17-2*, el tamaño de los frutos era homogéneo y con una media de longitud de 13 mm. Respecto al tamaño del ginóforo este también era mayor que en el silvestre, aproximadamente de 1 mm.



**Fig. IV-42: Comparación de los tamaños de los 10 primeros frutos de las líneas *pMT17* frente a los del silvestre.** Los frutos están colocados de izquierda a derecha según su posición en el tallo principal de la planta. Se muestra un fruto de la línea *pMT17-2* en el que se ha coloreado de rojo el ginóforo para dar una idea de la longitud del mismo. También se ha coloreado la zona apical del gineceo de color amarillo para poner de manifiesto el fenotipo tipo M.

En la figura IV-42 se muestran varios detalles de las alteraciones en el gineceo de la línea *pMT17-2* de fenotipo más débil. Ya que la línea *pMT17-1* mostró el fenotipo esperado de sobreexpresión, se realizó un análisis más detallado de la misma, sobre todo respecto a las alteraciones en el gineceo. Se analizó la siguiente generación.

#### Descripción de las alteraciones en el gineceo de *pMT17*.

En la siguiente generación de plantas, además de volver a aparecer el fenotipo tipo *ful*, se observó que algunas plantas mostraron otro fenotipo distinto que recordaba a los de mutantes como *pin* y *pid*. Este fenotipo apareció en una proporción 1:4 por lo que se dedujo que el fenotipo de las plantas *pMT17-1* podría ser dependiente de dosis, siendo el fenotipo tipo *ful* el correspondiente a los heterocigotos y el tipo *pin/pid* el que representaría a los homocigotos.

Los frutos de las plantas homocigóticas mostraron un tamaño muy homogéneo siendo mucho más pequeños que los del silvestre y que los frutos de las plantas heterocigóticas, midiendo aproximadamente 4 mm de longitud (Fig. IV-42). La valva en estos frutos apenas se podía reconocer, apareciendo como un pequeño “parche de células” en la mayoría de los frutos. El ginóforo era mucho más largo que en los heterocigotos, representando aproximadamente  $\frac{3}{4}$  de la longitud final del fruto. También se observó que en los frutos de las plantas *pMT17-1* homocigóticas la



abscisión de los órganos florales se producía más tarde que en el silvestre. Así en la figura IV-42 se pueden observar los estambres en la mayoría de los frutos.

Se realizó un análisis por separado del gineceo de las plantas homocigóticas y heterocigóticas. A continuación se describen los dos fenotipos.

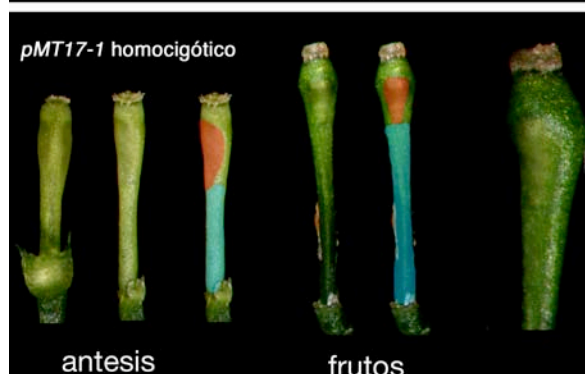
El gineceo de las plantas *pMT17-1* heterocigóticas en antesis presentaba valvas notablemente más pequeñas que el silvestre y ya se observaba el ginóforo alargado. Sin embargo, el replum en este estadio no mostraba todavía la característica disposición en zig-zag (Fig. IV-43 panel de arriba). Los frutos de estadio 16 aparecían curvados en muchas de las ocasiones (Fig. IV-43 panel de arriba), las valvas se reducían de tamaño respecto al silvestre y el replum presentaba característicamente la forma de zig-zag (Fig. IV-43 panel de arriba ). El estilo era más redondeado y ancho que el silvestre (Fig. IV-44 B).

Las plantas homocigóticas en antesis presentaban las valvas mucho más reducidas en tamaño que en el caso anterior y el ginóforo era más alargado que en los heterocigotos (Fig. IV-43 panel de abajo). En los frutos estas alteraciones eran más destacables, las valvas apenas representaban 1/4 de la longitud del gineceo, mientras que el ginóforo representaba aproximadamente el resto (Fig. IV-43 panel de abajo). En replum no mostraba la disposición en zig-zag de las plantas heterocigóticas (Fig. IV-43 panel de abajo). El estilo presentaba una forma más redondeada y ancha que el silvestre (Fig. IV-44 C).

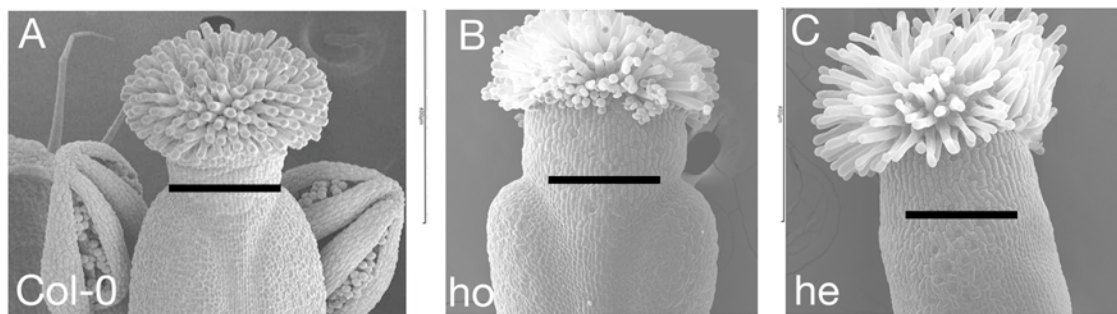
Ambos fenotipos en el gineceo se analizaron posteriormente mediante microscopia electrónica de barrido.



Las valvas se han coloreado en rojo y el ginóforo en azul.



**Fig. IV-43: Comparación de fenotipos de la plantas *pMT17-1* heterocigóticas (arriba) y homocigóticas (abajo).** Se compara los estadios de antesis y frutos maduros. también se muestra un detalle de las regiones apicales del gineceo y se han coloreado las valvas y el ginóforo para dar una idea del tamaño de los mismos.



**Fig. IV-44: Comparación del tamaño del estilo.**  
 (A) Col-0, (B) *pMT17-1* heterocigótica. (C) *pMT17-1* homocigótica.

- Estudio de los tipos celulares en el gineceo de *pMT17*.

*pMT17-1* heterocigótica.

En estadios previos a antesis, las plantas *pMT17-1* heterocigóticas ya presentaban el ginóforo alargado (Fig. IV-45 C). En antesis (Fig. IV-45 A y B) el estilo, al igual que el silvestre, presentaba las características células estriadas y los estomas (Fig. IV-45 E). Sin embargo, las valvas presentaban células más pequeñas que las del silvestre, parecidas a las de las valvas del mutante *ful* (Ferrándiz *et al.*, 2000a) (Gu *et al.*, 1998), aunque en las valvas de las plantas *pMT17-1* heterocigóticas aparecían estomas, a diferencia de lo que ocurre en el mutante *ful* y como ocurre en el silvestre (Fig. IV-45 F). El replum presentaba estomas como en el silvestre, aunque las células eran de menor tamaño y de forma más redondeada, como las de *ful*. Característicamente se observó que la zona entre la valva y el replum era más ancha que la del silvestre, apareciendo las típicas células pequeñas y redondeadas de la zona de dehiscencia (Fig. IV-45 G). El ginóforo presentaba estomas y, a diferencia del silvestre, se encontraron células ligeramente estriadas parecidas a las del estilo, fenotipo que también presentan los mutantes *ett* (Sessions, 1997) (Fig. IV-45 H).

En el fruto las células del estilo no presentaron diferencias respecto al silvestre (Fig. IV-45 I), aunque el estilo era de mayor tamaño y de forma más redondeada (Fig. IV-45 D), parecido al del mutante *ful* en fondo *erecta*. En las valvas se observaron estomas y células alargadas parecidas a las del silvestre, aunque estas últimas con una distribución ligeramente errática (Fig. IV-45 J). El replum presentaba estomas, a diferencia de lo que ocurre en el mutante *ful* pero, al igual que lo que ocurre en éste (Fig. IV-74), presentaba una disposición en forma de zig-zag, hecho que podría ser debido a la elongación defectuosa de las valvas y no así del replum (Ferrándiz *et al.*, 2000a) (Fig. IV-45 K). El ginóforo presentaba estomas y células muy alargadas (Fig. IV-45 L).

*pMT17-1* homocigótica.

En las plantas homocigóticas, se observó que, como en el caso anterior, el gineceo alargado ya era evidente en estadios previos a antesis (Fig. IV-45 Ñ y O). En



antes el estilo, también como en los heterocigotos, presentaba forma más redondeada y era más ancho que el silvestre (Fig. IV-45 N). En el estilo, como en el silvestre, se encontraron células estriadas y estomas (Fig. IV-45 Q). Las células del estilo se encontraban en ocasiones en las regiones mediales del mismo y en la zona del replum apical. Las valvas presentaban células muy pequeñas, como las de *ful*, y la presencia de estomas era menor que en el caso de los heterocigotos (Fig. IV-45 R). El replum y el ginóforo eran similares al de los heterocigotos (Fig. IV-45 S y T). Sin embargo, a diferencia de los heterocigotos, la separación entre la valva y el replum era más difícil de distinguir ya que las células eran todas muy parecidas, pequeñas y redondas como las de la zona de dehiscencia (Fig. IV-45 S).

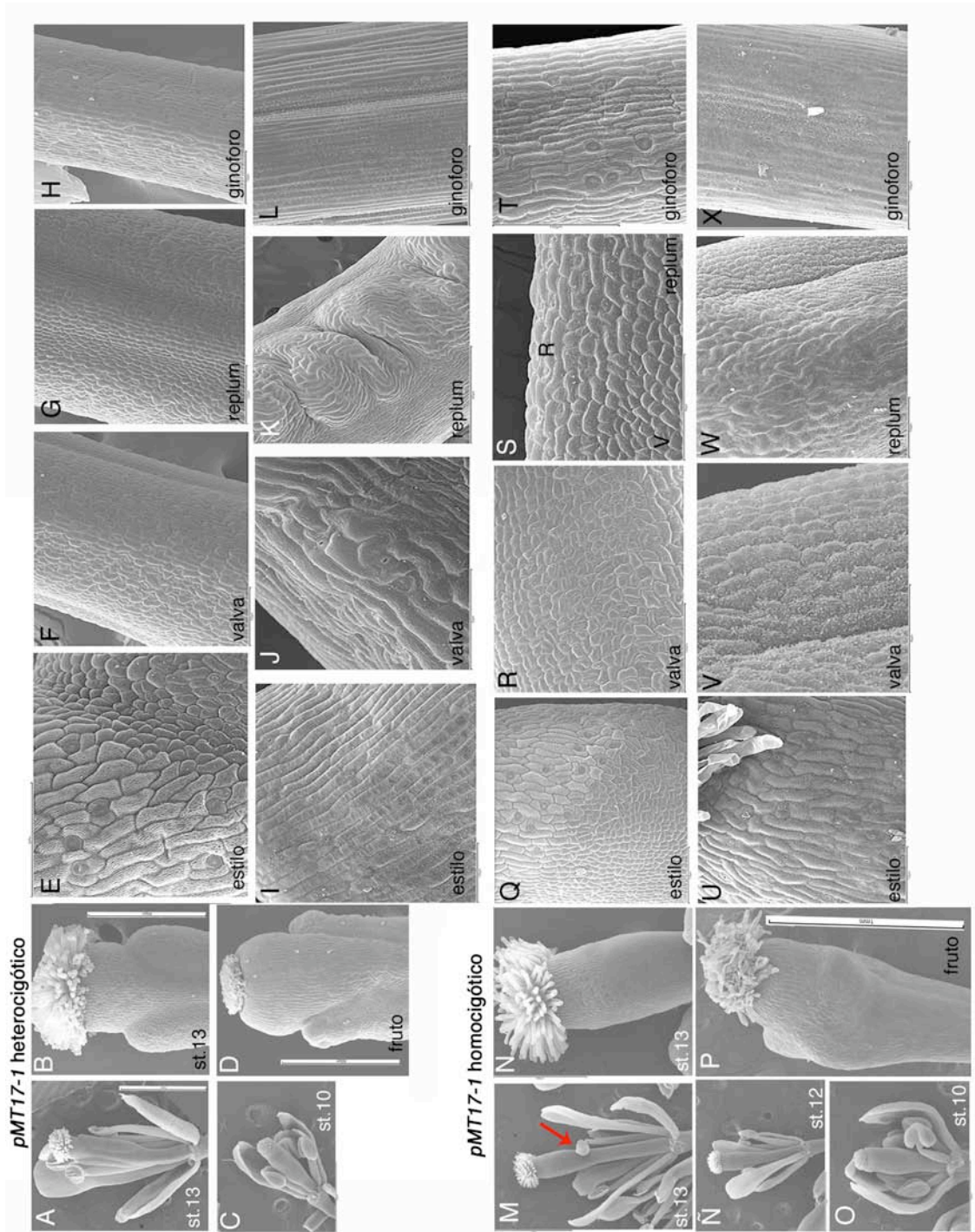
Además de los fenotipos en el gineceo también se observaron fenotipos en los estambres que tenían en ocasiones una morfología aberrante (Fig. IV-45 M flecha roja). Por otra parte al analizar las flores en anthesis, cuando los estambres liberan el polen, se observó que éstos no se encontraban a la misma altura que el estigma como ocurre en el silvestre, por lo tanto la polinización no podría producirse correctamente. Quizá esa fuera una de las explicaciones al hecho de que los homocigotos no produjeran apenas semillas.

En los frutos de las plantas *pMT17-1* homocigóticas (Fig. IV-45 P) se observó en el replum dispuesto en zig-zag sólo en la parte superior del mismo, manteniéndose los fenotipos descritos en anthesis y por lo tanto siendo difícil distinguir la valva del replum (Fig. IV-45 U-X).

Los fenotipos de ovarios reducidos, regiones apicales aumentadas y ginóforos largos recuerdan por una parte a los defectos en la polaridad apical-basal de mutantes *ett* (Sessions y Zambryski, 1995), sugiriendo una posible relación funcional con *ETT*, miembro de la familia *ARF*. Por otra parte, los fenotipos más severos recordaban a los de pérdida de función del transportador de flujo de salida de auxinas *PIN-FORMED 1* (*PIN1*) (Goto *et al.*, 1991) o a los de *PINOID* (*PID*) que controla la localización polar de éste (Bennett *et al.*, 1995), así como a los de plantas silvestres tratadas con NPA (Okada *et al.*, 1991). Por lo tanto, los fenotipos que presentaba la línea *pMT17* señalaban de nuevo a la implicación de los genes *TOP* en las vías de señalización de auxinas.

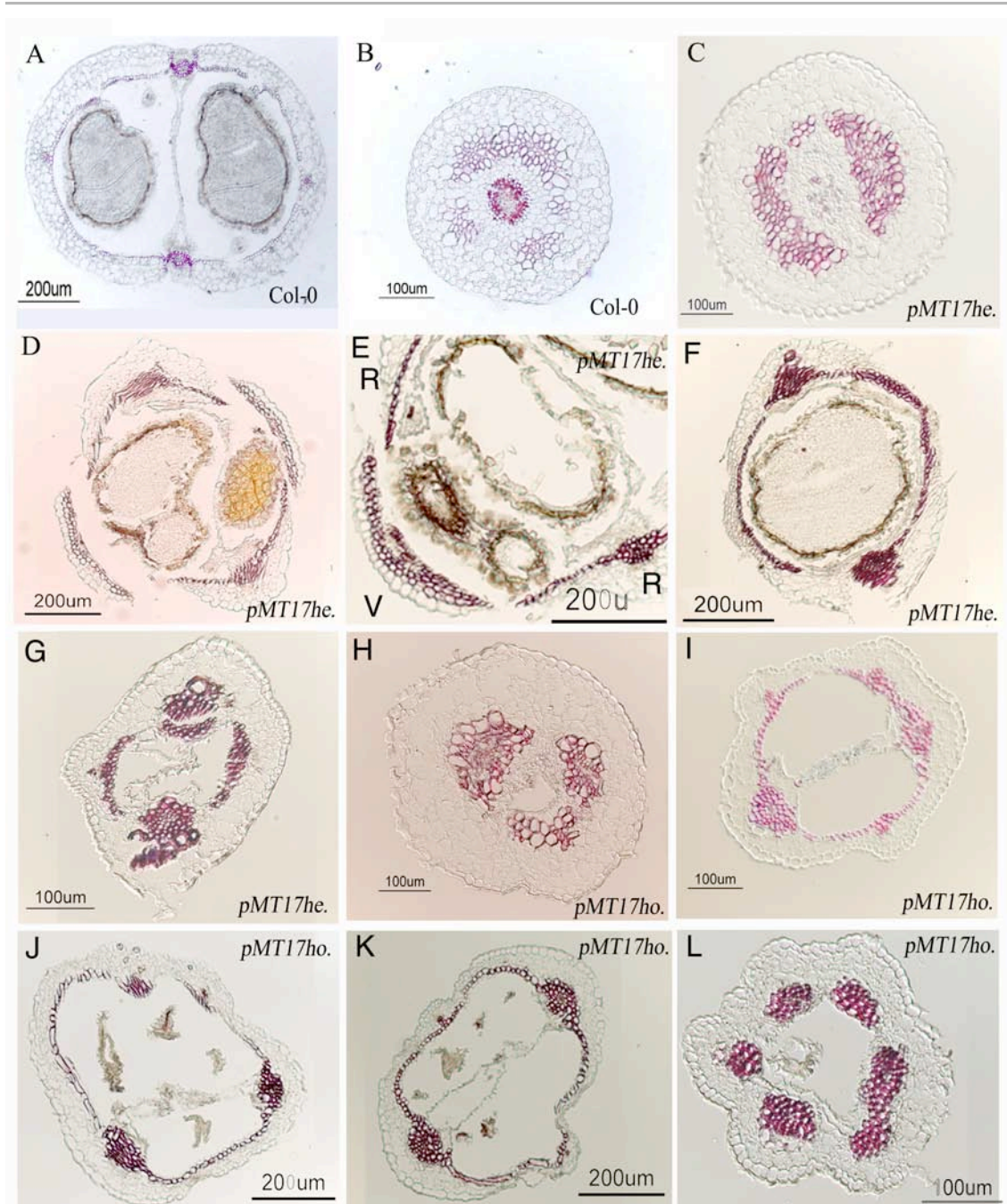
- Estudio de la organización interna del gineceo de *pMT17*.

Para determinar si como en el caso de *ful* aparecía una lignificación ectópica en la zona de la valva que pudiera causar el fenotipo de la línea *pMT17*, se analizó el patrón de lignificación en frutos de estadio 17B de plantas *pMT17*. Se analizaron tanto individuos homocigóticos como heterocigóticos.



**Fig. IV-45: Estudio de los tipos celulares del gineceo de *pMT17*.**

Micrografías electrónicas de barrido del gineceo de plantas *pMT17-1* homocigóticas y heterocigóticas. (A-L) *pMT17-1* heterocigótica. (M-X) *pMT17-1* homocigótica. (A) flor en antesis. (B) detalle de la zona apical del gineceo de una flor en antesis. (C) flor de estadio 10. (D) detalle de la zona apical del fruto. (E-H) detalles del gineceo en antesis. (E) detalle del estilo, se pueden observar las células estriadas y los estomas. (F) detalle de la valva. (G) detalle del replum. (H) detalle del ginóforo. (I-L) detalles del fruto. (I) detalle del estilo. (J) detalle de la valva. (K) detalle del replum. (L) detalle del ginóforo. (M) flor en antesis La flecha roja señala el estambre aberrante. (N) detalle de la zona apical del gineceo de una flor en antesis. (Ñ) flor de estadio 12 (O) flor de estadio 10. (P) detalle de la zona apical del fruto. (Q-T) detalles del gineceo en antesis. (Q) detalle del estilo. (R) detalle de la valva. (S) detalle del replum. R:replum, V:valva, (T) detalle del ginóforo. (U-X) detalles del fruto. (U) detalle del estilo. (V) detalle de la valva. (W) detalle del replum. (X) detalle del ginóforo.



**Fig. IV-46: Patrón de lignificación de *pMT17*.** Secciones transversales de frutos de *pMT17* y Col-0. (A y B) Col-0. (C-G) *pMT17* heterocigótico. (H-L) *pMT17* homocigótico. (B, C y H) zona del estilo. (D-F y I-K) zona del ovario. (G y L) zona del ginóforo. (D) se puede observar que el replum es mucho más ancho que el silvestre. (E) detalle de la zona de separación del replum y la valva, se puede observar la lignificación ectópica de la valva. (F) zona del ovario cercana al ginóforo, ya no se observa zona de valva. (I- K) no se puede distinguir la zona del margen de valva. La capa *enb* no parece estar alterada.

En los frutos *pMT17* heterocigóticos, aparecía lignificación ectópica en zonas de la valva. Así, en vez de la capa *enb* unicelular lignificada, aparecían dos e incluso tres capas lignificadas de células de la valva (Fig. IV-46 E). Además, el replum aparecía mucho más ancho (Fig. IV-46 D) y con una fila de células lignificadas adaxiales parecida a lo que podría ser la capa *enb* de la valva. En las zonas del ovario cercanas al



ginóforo (Fig. IV-46 F) en las que ya no había valva, sólo se observaban los haces vasculares lignificados y la capa *enb*. En el ginóforo (Fig. IV-46 G) sólo se observó lignificación de los haces vasculares. El resto de tipos celulares del gineceo no parecían estar alterados.

En los frutos *pMT17* homocigóticos no se encontró lignificación ectópica de las valvas aunque tampoco se observó que hubiese una zona de margen de valva. Así, todo el fruto parecía una continuación de la zona del ginóforo (Fig. IV-46 L), sólo que aparecía una capa *enb* (Fig. IV-46 I, J y K) que podría pertenecer a la zona del replum aunque no se podían distinguir claramente dónde acababa el replum y empezaba la valva. Internamente sólo se observan los haces vasculares del replum y los que normalmente discurrirían por las valvas (Fig. IV-46 I y K). NOTA: la zona del replum se distingue porque se puede observar el septum que une los dos repla.

- Estudio del desarrollo vascular del gineceo de *pMT17*.

Para determinar si los frutos *pMT17-1* sufrían alteraciones en el desarrollo de los haces vasculares, como ocurría con los mutantes de pérdida de función, se analizó el desarrollo de los mismos.

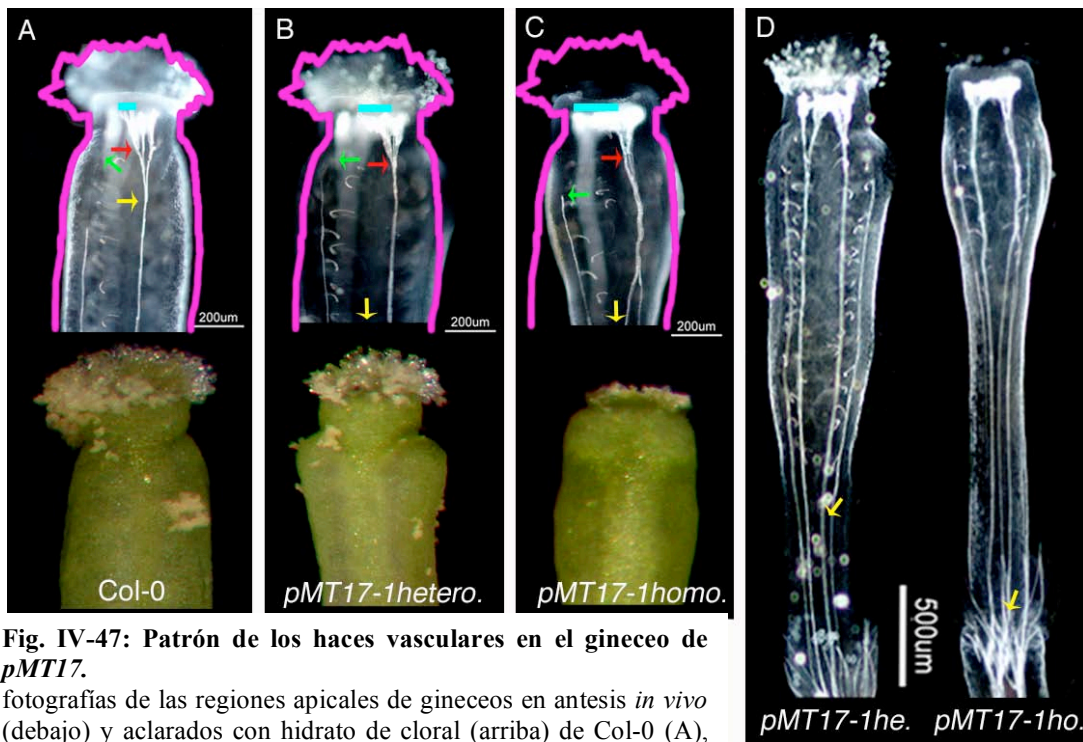
Los haces vasculares del gineceo de la línea *pMT17* presentaban alteraciones que ya se habían observado en la línea *top1-ID* y que en cierto modo eran contrarios a lo que ocurría en los mutantes de pérdida de función. El número de haces vasculares que irrigan el estigma se encontraba muy aumentado respecto al silvestre (Fig. IV-47, línea azul) mientras que en los mutantes de pérdida de función el número de haces del estilo disminuía en gran medida. Sin embargo, no se encontraron grandes diferencias respecto a las bifurcaciones secundarias (Fig. IV-47, flechas rojas) mientras que las bifurcaciones primarias, en este caso al igual que en los mutantes de pérdida de función, se encontraban basalizadas, aunque de forma más severa ya que la bifurcación primaria ocurría en la zona del ginóforo o incluso cerca de la zona de abscisión de los órganos florales (Fig. IV-47 flecha amarilla).

En los haces vasculares laterales, que irrigan las valvas, no se encontraron diferencias respecto al silvestre (Fig. IV-47 flecha verde).

### Descripción de las alteraciones en el desarrollo vegetativo de *pMT17*.

- Alteraciones en el desarrollo vascular de los cotiledones.

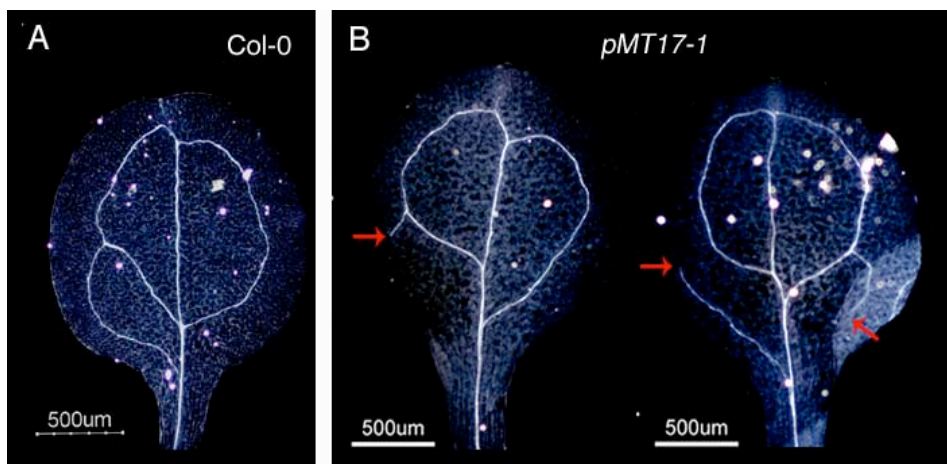
Se analizaron los haces vasculares de los cotiledones de *pMT17* y se observó que, al contrario de lo que ocurre en el silvestre, aparecían islas vasculares, es decir, los haces vasculares no se desarrollaban de forma continua dejando espacios entre ellos (Fig. IV-48).



**Fig. IV-47: Patrón de los haces vasculares en el gineceo de *pMT17*.**

fotografías de las regiones apicales de gineceos en antesis *in vivo* (debajo) y aclarados con hidrato de cloral (arriba) de Col-0 (A), *pMT17* heterocigótico (he.) (B) y *pMT17* homocigótico (ho.) (C). (D) vista general del gineceo de *pMT17*.

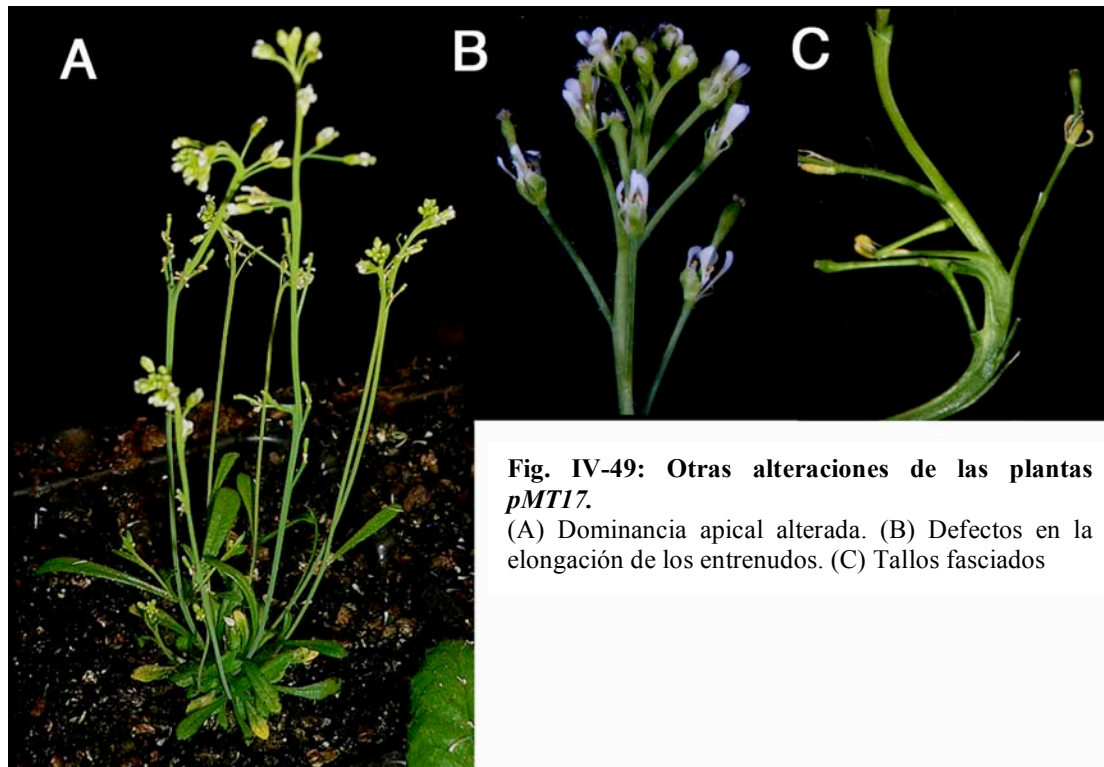
Las flechas amarillas señalan la bifurcación primaria de los haces vasculares mediales. Las flechas rojas señalan la bifurcación secundaria. La línea azul señala al abanico de haces estilares y la flecha verde señala el final de los haces laterales. NOTA: en A la flecha verde está más arriba porque el haz vascular acaba allí aunque no está muy lignificado y no se observa bien en la fotografía.



**Fig. IV-48: Alteraciones en el patrón vascular en cotiledones.** (A) Col-0. (B) *pMT17*. Las flechas señalan las “islas vasculares”.

• Otras alteraciones

Además de los fenotipos mencionados, las plantas *pMT17* mostraron otras alteraciones como defectos en la filotaxis, apareciendo grupos de frutos debido a la falta de elongación de los entrenudos. También se encontraron tallos fasciados así como defectos en la dominancia apical (Fig. IV-49).



**Fig. IV-49: Otras alteraciones de las plantas *pMT17*.**  
 (A) Dominancia apical alterada. (B) Defectos en la elongación de los entrenudos. (C) Tallos fasciados

### 3- ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES GENÉTICAS DE *TOP1* Y *TOP2* CON OTROS GENES RELACIONADOS.

Con el fin de dilucidar la función de los genes *TOP* en el contexto genético del desarrollo del fruto, se analizaron las interacciones de éstos con otros genes que participan en distintos procesos del desarrollo de *Arabidopsis*.

Los mutantes de pérdida de función de los genes *TOP* presentaban alteraciones, principalmente, en el eje apical-basal del gineceo. Se eligieron para el estudio de las interacciones genes conocidos implicados en la diferenciación del mismo como *STYLISH (STY)*, *LEUNIG (LUG)*, *SEUSS (SEU)*, *SPATULA (SPT)* y *ETTIN (ETT)*.

Por otra parte, los fenotipos en el fruto de las líneas de ganancia de función de *TOP1* eran parecidos a los del mutante *fruitfull (ful)*. *FUL* participa junto a *SHATTERPROOF (SHP)*, *INDEHISCENT (IND)*, *ALCATRAZ (ALC)* y *REPLUMLESS (RPL)* en la especificación del eje medio-lateral del fruto. Para determinar si los genes *TOP* estaban implicados en este proceso, se analizaron las posibles interacciones de las mutaciones *top* con distintos mutantes en estos genes.

#### **3-1. Análisis de las interacciones genéticas de los genes *TOP* con genes implicados en el desarrollo del eje apical- basal del gineceo de *Arabidopsis*.**

Como se ha descrito detalladamente en la introducción, en el fruto de *Arabidopsis* se pueden diferenciar, en un eje apical-basal, varias estructuras;

apicalmente se encuentra el estigma, formado por las papilas estigmáticas; a continuación se encuentra el estilo, que es una estructura corta y sólida por la que interiormente discurre el tracto de transmisión; después el ovario, formado por dos valvas fusionadas, en cuyo interior se localizan los óvulos; y por último, en la zona basal, se encuentra el ginóforo que une el ovario a la base de la flor.

### 3-1-1. Análisis de las interacciones con *STYLISH*.

Los genes *STYLISH* (*STY1* y *STY2*) (Kuusk *et al.*, 2002) son miembros de la familia *SHI* de factores de transcripción que codifican proteínas RING ZINC finger y controlan, de manera redundante, el desarrollo del estigma y del estilo. En el doble mutante *sty1-1 sty2-1*, tanto el estilo como el estigma se encuentran reducidos y se desarrollan anormalmente (Fig. IV-50 A). Además, el septum presenta problemas de fusión en la región apical del ovario. El mutante simple *sty1-1* tiene defectos parecidos pero menos severos, mientras que el mutante simple *sty2-1* no muestra defectos en el desarrollo del gineceo. Las mutaciones en los otros ocho miembros de la familia *SHI* no tienen defectos fenotípicos pero aumentan el fenotipo de *sty1* de forma gradual (Kuusk *et al.*, 2006). Además de los defectos en el carpelo, el doble mutante *sty1-1 sty2-1* presenta hojas tanto de roseta como caulinares, más aserradas que las del silvestre.

La expresión constitutiva de los genes *STY* provoca la formación de estilos romos y más cortos que los del silvestre, y la aparición de células del estilo ectópicas en las valvas. Las valvas de los frutos 35S::*STY* no elongan adecuadamente y se arrugan debido, presumiblemente, a que las células de estilo ectópicas en la valva, no crecen igual que las propias de la valva (Kuusk *et al.*, 2002) (Fig. IV-50 C).

El patrón de expresión de los genes *STY* ha sido descrito en (Kuusk *et al.*, 2002) en base tanto a experimentos de hibridación *in situ* como a la detección del gen delator *GUS* dirigido por el promotor de los genes *STY*. A continuación se hace un breve resumen del patrón de expresión de *STY1* a partir del descrito en (Kuusk *et al.*, 2002). La expresión de *STY1* se puede observar en el primordio floral desde estadios tempranos, en el meristemo floral joven, en la zona abaxial y en el primordio emergente del gineceo (Fig. IV-50 E). Conforme el gineceo elonga verticalmente, la expresión de *STY1* se va restringiendo en las zonas apicales de los carpelos, extendiéndose a lo largo de toda su circunferencia (Fig. IV-50 F y G), y queda limitada a partir de estadio 10 a las regiones apicales del gineceo, entre el estilo y el estigma (Fig. IV-50 H e I) hasta que decae en estadio 13. Dentro del ovario se localiza la expresión en los óvulos y en el septum, en este último en la capa de células más externa (Fig. IV-50 J). En los embriones se detecta desde estadio globular hasta corazón. En plántulas se detecta en el hipocotilo, cotiledones y primordios de hojas y raíz. Posteriormente en los márgenes de hojas e hidatodos (Fig. IV-50 6L), en el ápice de la raíz primaria (Fig. IV-50 6N) y en los primordios de las raíces laterales (Fig. IV-50 6M) (Kuusk *et al.*, 2002).

Se decidió analizar las interacciones genéticas de los genes *TOP* con los genes *STY1* y *STY2* por varias razones:

- el fenotipo del doble mutante *sty1-1 sty2-1* era muy parecido al fenotipo del doble mutante *top1-3 top2-2* (Fig. IV-50 A y B).

- los patrones de expresión de los genes *TOP1* y *STY1* eran muy parecidos. Este hecho se pone de manifiesto en los experimentos de hibridación *in situ* de los genes *TOP1*, *TOP2*, *STY1* y *STY2*, y al comparar los patrones de expresión de las líneas reportadoras *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* y *STY1<sub>pro</sub>::GUS* (Fig. IV-50).

- el fenotipo de la sobreexpresión de *STY1* podría considerarse similar al de la sobreexpresión de *TOP1* aunque en zonas complementarias, ya que la primera producía frutos en los que las valvas se arrugaban, y la segunda causaba un fenotipo similar pero en el replum (Fig. IV-50 C y D).

- se había demostrado que *STY1* y *STY2* actúan redundantemente en el desarrollo del estilo y del estigma (Kuusk *et al.*, 2002), al igual que ocurre con *TOP1* y *TOP2*. Conforme aumenta el número de mutantes en la familia *shi* el fenotipo del fruto es más severo (Kuusk *et al.*, 2006) al igual que ocurre en la familia *top* (cuádruple mutante *top*, M. Navarrete, resultados no publicados).

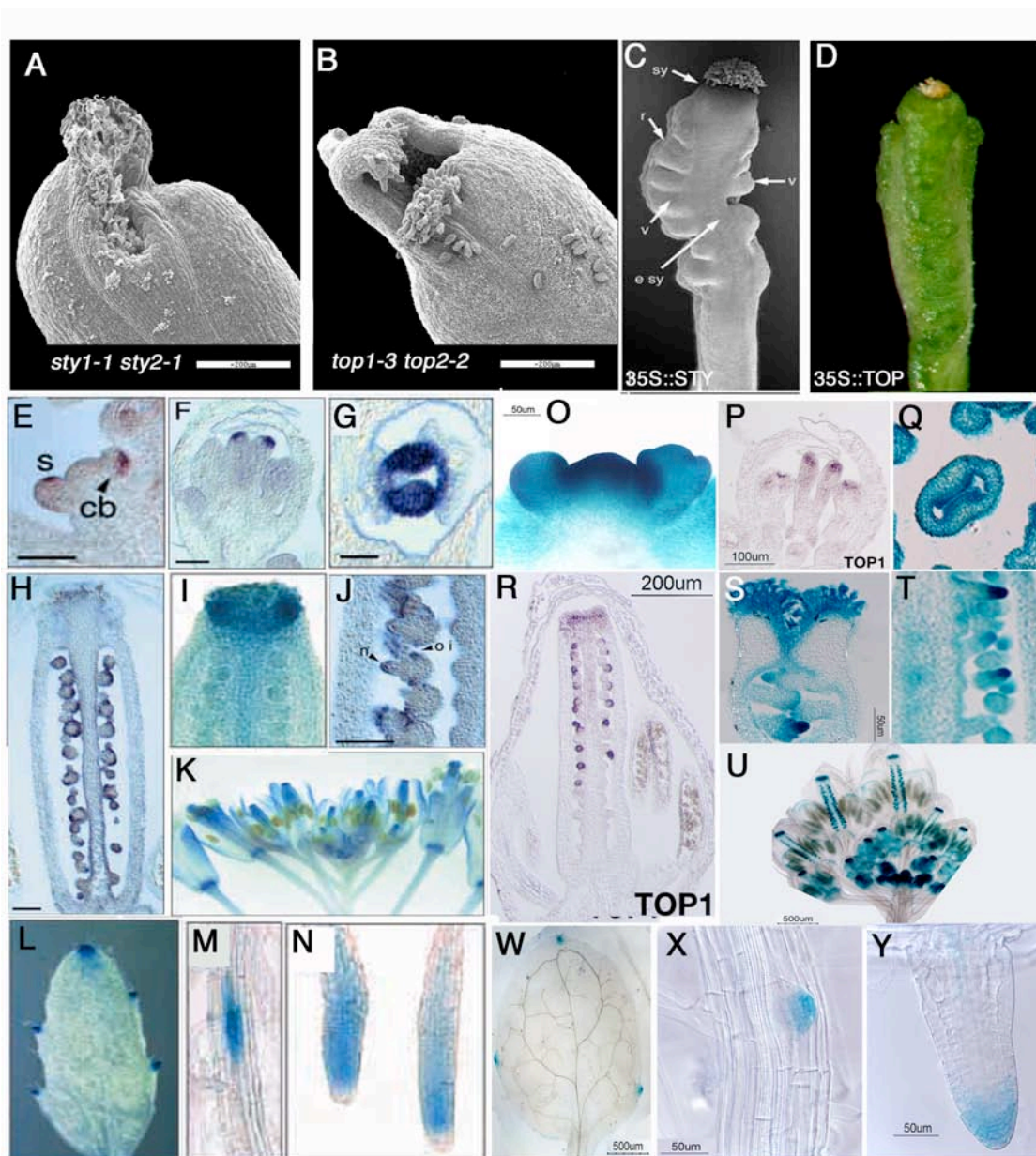
### Análisis de los fenotipos mutantes.

Como ya se ha mencionado, el aspecto macroscópico del fruto del doble mutante *sty1-1 sty2-1* era muy parecido al del doble mutante *top1-3 top2-2*. Sin embargo, estos defectos afectaban a estructuras diferentes. Mientras que el doble mutante *sty1-1 sty2-1* estaba más afectado en la zona medial del estilo, el doble mutante *top1-3 top2-2* estaba más afectado en la zona lateral del estilo (Fig. IV-50 A y B).

Se obtuvo el doble mutante *top1-3 sty1-1* mediante cruzamiento entre los mutante simples. Este doble mutante presentaba un fenotipo mucho más severo que los mutantes simples por separado. La zona apical del gineceo no se fusionaba y se reducía el número de papilas estigmáticas (Fig. IV-52 E). Además, tenía una fertilidad reducida (Fig IV-51) no presentando semillas en la zona más apical del ovario. Esta región presentaba otros defectos como la falta de fusión del septum, el replum y las valvas (Fig. IV-51 y IV-52 E)

Por otra parte, se obtuvieron los triples mutantes *top1-3 sty1-1 sty2-1* y *top1-3 top2-2 sty 1-1*, cuyo fenotipo era similar al del doble mutante *top1-3 sty1-1*, presentando defectos en la fusión de la región apical del ovario tanto en el septum, como en el replum y en las valvas, aunque con alteraciones más severas en el estigma, con ausencia casi completa de papilas estigmáticas (Fig. IV-52).





**Fig. IV-50: Comparación *STY-TOP*.**

(A)Detalle de las regiones apicales de fruto de estadio 16 de *styl1-1 styl2-1*.(B) Detalle de las regiones apicales de fruto de estadio 16 de *top1-3 top2-2*. (C) Fruto35S::*STY1*. (D) Fruto 35S::*TOP1*. (E-N) expresión de *STY1<sub>pro</sub>::GUS* en distintos tejidos: (E) primordio floral, zona abaxial. (F) zona apical del carpelo. (G) circunferencia del carpelo. (H) Región apical del carpelo y óvulos. (I) zona apical del carpelo. (J) óvulos. (K) Inflorescencia. (L) hidátodos. (M) primordio raíz lateral. (N) ápice raíz principal. (O-Y) expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en distintos tejidos. (O) primordio floral, zona adaxial. (P) zona apical del carpelo. (Q) circunferencia del carpelo. (R) Región apical del carpelo y óvulos. (S) zona apical del carpelo. (T) óvulos. (U) Inflorescencia. (W) hidátodos. (X) primordio raíz lateral. (Y) ápice raíz secundaria. (E-N) y (C) Tomado de Kuusk *et al* (2002).



**Fig. IV-51: Defectos en la fusión del septum y de fertilidad.**

Defectos en la fusión del septum de *top1-3 styl1-1*, *top1-3 styl1-1 sty2-1* y *top1-3 top2-2 styl1-1* (las tres fotos de la derecha). Las flechas indican hasta donde existen semillas en el doble mutante *top1-3 styl1-1*. NOTA: No se han colocado los septa a escala para poder apreciar mejor los defectos.

Todos los mutantes dobles y triples mostraron reducción en el tamaño de los frutos (Fig. IV-53) en comparación con el silvestre. La longitud media de los frutos disminuía conforme aumentaba el número de alelos mutantes, siguiendo la siguiente gradación:

*styl1-1* > *styl1-1 styl2-1* > *top1-3 styl1-1* > *top1-3 styl1-1 sty2-1* > *top1-3 top2-2 styl1-1* .

Estos resultados sugerían que la familia STY/SHI y la familia TOP podrían estar actuando en la determinación de las regiones apicales del gineceo de forma conjunta.

El fenotipo de los triples mutantes era muy parecido tanto si se encontraban afectados más miembros de la familia *SHI* como más miembros de la familia *TOP*. Podría ser que los miembros con un papel más importante dentro de las familias fueran *TOP1* y *STY1* por lo tanto al perder la función de los mismos se produzca el fenotipo más severo.

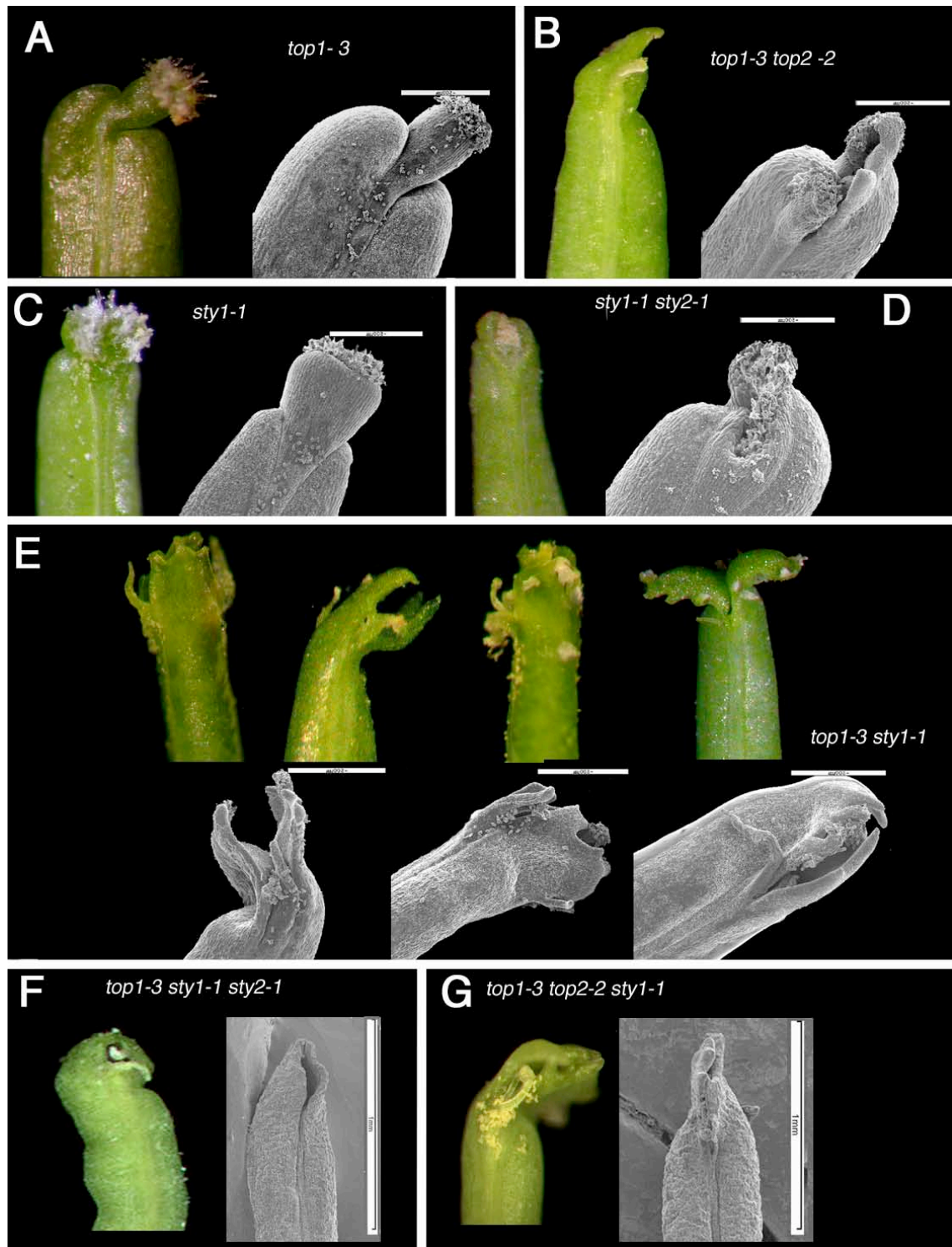
#### Análisis del patrón de los haces vasculares.

El doble mutante *styl1-1 styl2-1* tiene alterado el patrón de haces vasculares del gineceo (Kuusk *et al.*, 2002), produciéndose una basalización de las bifurcaciones primarias y secundarias, al igual que ocurre en los mutantes *top*.

Se analizó el patrón de los haces vasculares en el gineceo del doble mutante *top1-3 styl1-1* y en los triples mutantes *top1-3 styl1-1 styl2-1* y *top1-3 top2-2 styl1-1*, así como en los mutantes dobles *styl1-1styl2-1* y *top1-3 top2-2*, con el fin de comparar posibles cambios.

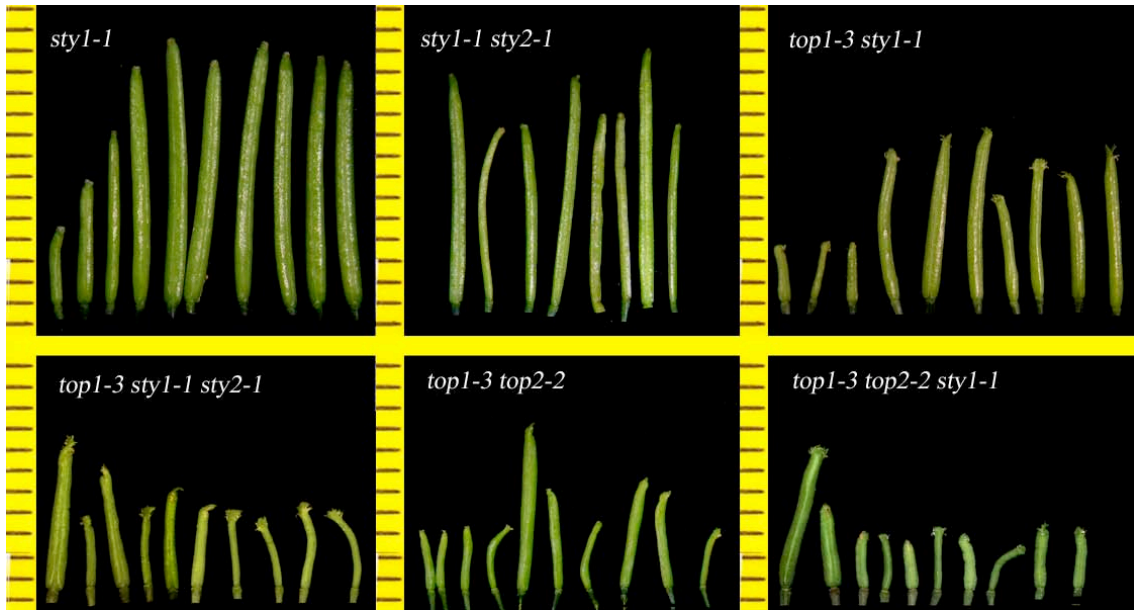
En todos ellos se produjo una basalización de las bifurcaciones primarias y secundarias y una reducción en el número de haces vasculares que llegaba al estigma en comparación con el silvestre. La reducción en el número de haces vasculares que llegaba al estigma en los mutantes *top1-3 styl1-1*, *top1-3 styl1-1 styl2-1* y *top1-3 top2-2 styl1-1* era más parecida a la que ocurría en los dobles mutantes *top1 top2* que a la que

se producía en los dobles mutantes *sty1 sty2*, en los cuales la reducción no era tan drástica. Además, de manera característica en el mutante *top1-3 sty1-1 sty2-1* las venas laterales se bifurcaban hacia las venas mediales como ocurre en el mutante *spt* y las mediales hacia las laterales como ocurre en el mutante *crc-1* (Alvarez y Smyth, 2002) (Fig. IV-65).



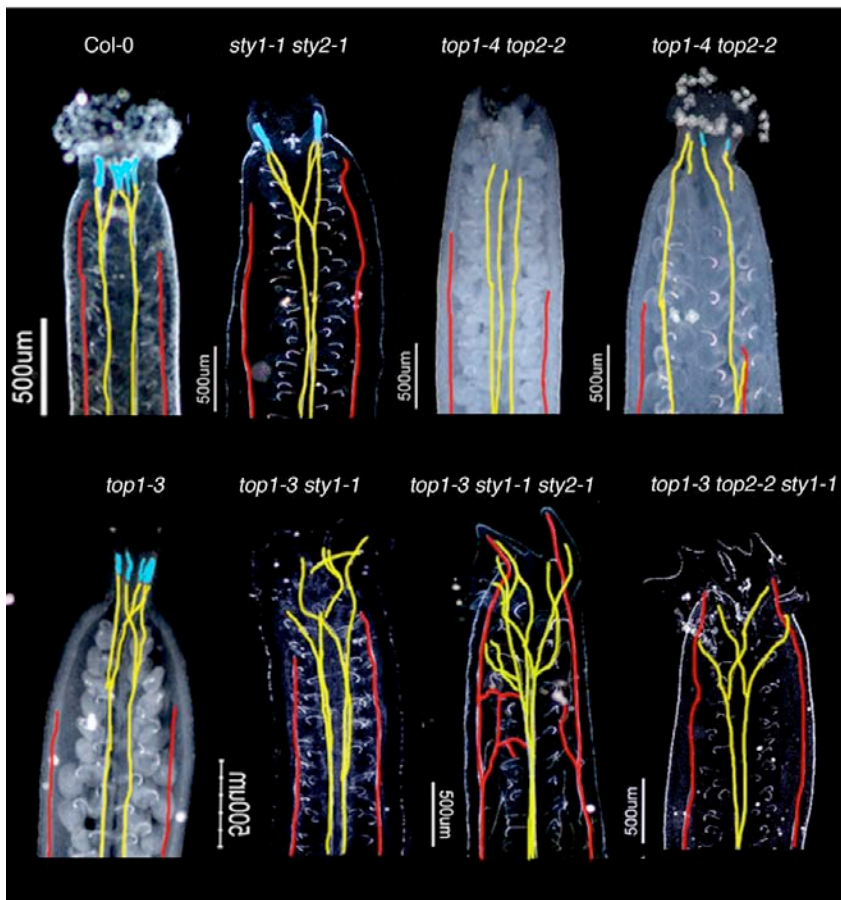
**Fig. IV-52:** Alteraciones en las regiones apicales del gineceo de las distintas combinaciones de mutantes *top* y *sty*. (A) *top1-3*. (B) *top1-3 top2-2*. (C) *sty1-1*. (D) *sty1-1 sty2-2*. (E) *top1-3 sty1-1*. (F) *top1-3 sty1-1 sty2-1*. (G) *top1-3 top2-2 sty1-1*





**Fig. IV-53: Comparación de los tamaños de los 10 primeros frutos de los mutantes *top* frente a los *sty* y las distintas combinaciones *top sty*.** Los frutos están colocados de izquierda a derecha según su posición en el tallo principal de la planta. Los distintos mutantes también se han colocado de mayor a menor longitud media de los frutos.

*sty1-1* > *sty1-1 sty2-1* > *top1-3 sty1-1* > *top1-3 sty1-1 sty2-1* > *top1-3 top2-2* > *top1-3 top2-2 sty1-1*.

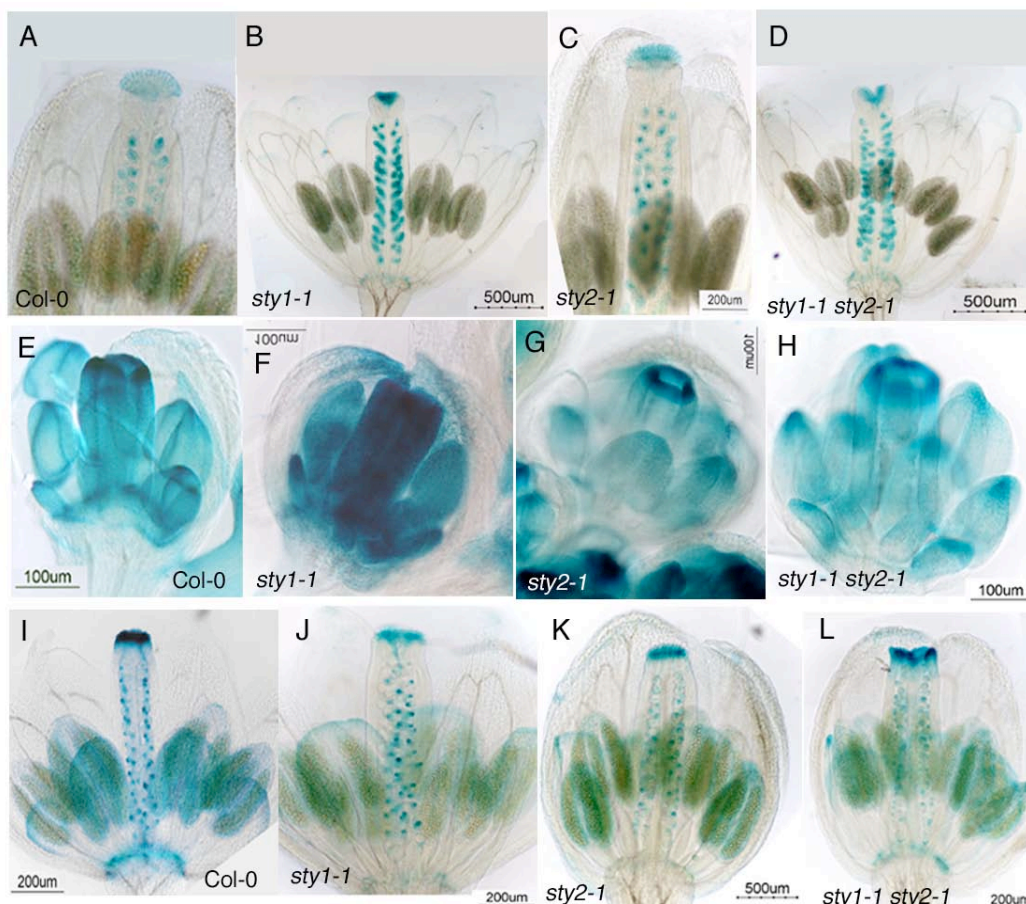


**Fig. IV-54: Comparación del patrón de los haces vasculares de las distintas combinaciones mutantes *top sty*.** Esquema de los haces vasculares que discurren por la región apical del gineceo de Col-0, *sty1-1 sty2-1*, *top1-3 top2-2*, *top1-4 top2-2*, *top1-3*, *top1-3 sty1-1*, *top1-3 sty1-1 sty2-1*, *top1-3 top2-2 sty1-1*. En rojo se han coloreado los haces laterales, en amarillo los haces mediales y en azul los haces estilares que irrigan el estigma.

Así, tanto los mutantes *top* como los *sty* tenían alteraciones en el desarrollo vascular del gineceo, que aumentaban de forma sinérgica en las distintas combinaciones de alelos mutantes, por lo que los genes *TOP* y *STY* podrían estar implicados en el desarrollo del mismo de forma conjunta. Los genes *STY1/SHI* se han involucrado en la regulación de la síntesis de auxinas, hormona implicada en el desarrollo de los haces vasculares (revisado por (Berleth *et al.*, 2000) ), ya que se ha demostrado que *STY1* activa a *YUCCA4*, un gen que codifica un enzima clave en la ruta biosintética de las auxinas (Sohlberg *et al.*, 2006).

Análisis de la expresión de las líneas reportadoras *STY1<sub>pro</sub>::GUS* y *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en distintos fondos mutantes.

Puesto que *STY1* y *TOP1* presentaban patrones de expresión muy similares se podría esperar que uno regulase al otro. Para detectar la posible existencia de una jerarquía de regulación entre ellos, se analizó la expresión de la línea reportadora *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en los fondos mutantes *sty1-1*, *sty2-1* y *sty1-1 sty2-1*, y la expresión de la línea reportadora *STY1<sub>pro</sub>::GUS* en los fondos mutantes *top1-3*, *top2-2* y *top1-3 top2-2*.



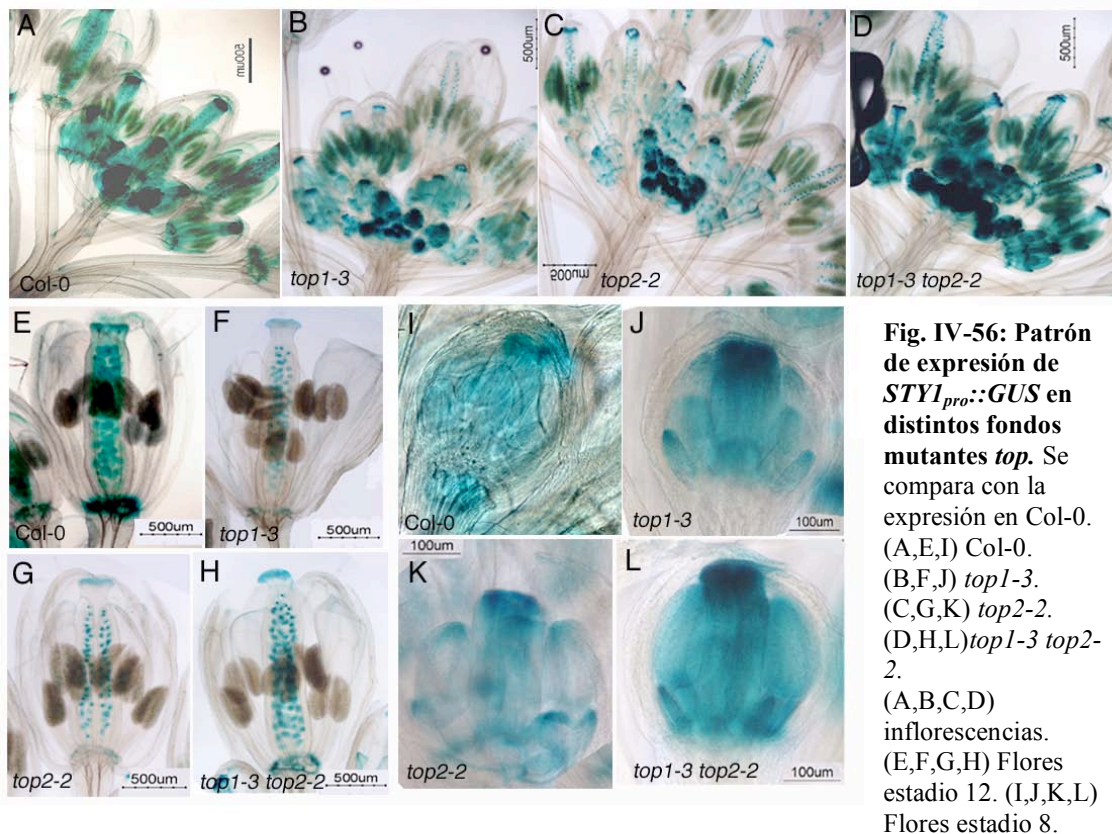
**Fig. IV-55: Patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en distintos fondos mutantes *sty*.** Se compara con la expresión en Col-0. (A,E,I) Col-0. (B,F,J) *sty1-1*. (C,G,K) *sty2-1*. (D,H,L) *sty1-1 sty2-1*. (A,B,C,D) Flores estadio 12. (E,F,G,H) Flores estadio 8. (I,J,K,L) Flores de estadio 11.



## RESULTADOS

La expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* no mostró cambios en las flores de los mutantes *styl-1*, *styl-2-1* ni *styl-1 styl-2-1* respecto al patrón en el fondo silvestre (Fig. IV-55). Tampoco se apreciaron cambios en la expresión de *STY1<sub>pro</sub>::GUS* en las flores de los fondos mutantes *top1-3*, *top2-2* ni *top1-3 top2-2* respecto a la expresión en el fondo silvestre (Fig. IV-56).

Por lo tanto, la expresión coincidente de *TOP1* y *STY1* no parecía corresponder a la regulación directa de uno sobre otro. De los datos obtenidos se podría hipotetizar que ambos estuvieran regulados por factores comunes y actuar en paralelo



### 3-1-2. Análisis de las interacciones con *LEUNIG*.

*LEUNIG* (*LUG*) codifica un correpresor de la transcripción relacionado con la proteína Tup1 de levadura y la proteína Groucho de *Drosophila*, con dos regiones ricas en glutaminas y siete repeticiones WD (Conner y Liu, 2000). *LUG* debe interactuar con otros factores de transcripción, para regular a sus dianas ya que no contiene ningún dominio de unión a DNA.

Los mutantes *lug* tienen defectos tanto en la fusión congénita de los carpelos en las partes apicales, como en la fusión postcongénita del septum. El ápice del gineceo de los mutantes *lug* característicamente se abre en cuatro protusiones sin fusionar (Chen *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000) (Liu *et al.*, 1995). Además, el número de carpelos varía de 1 a 3 (Liu *et al.*, 2000). La actividad de *LUG* no se restringe sólo al desarrollo del

gineceo, sino que también está involucrado en la expansión de la hoja y en la regulación negativa de *AG* en el primer y segundo verticilo de la flor (Liu *et al.*, 1995) (Cnops *et al.*, 2004; Conner y Liu, 2000). Por otra parte, el gen *STYLOSA*, ortólogo de *LUG* en *Antirrhinum*, ha sido relacionado con las respuestas a auxinas, bien mediando su producción o su transporte (Navarro *et al.*, 2004).

Se ha propuesto que *LUG* podría regular positivamente a *STY*, ya que las mutaciones *lug* son epistáticas sobre los fenotipos *sty* y además la sobreexpresión de *STY* rescata los fenotipos *lug*, lo que coloca a los genes *STY/SHI* genéticamente aguas abajo de *LUG* (Kuusk *et al.*, 2006).

Se decidió analizar las interacciones genéticas de los genes *TOP* y el gen *LUG* por varias razones:

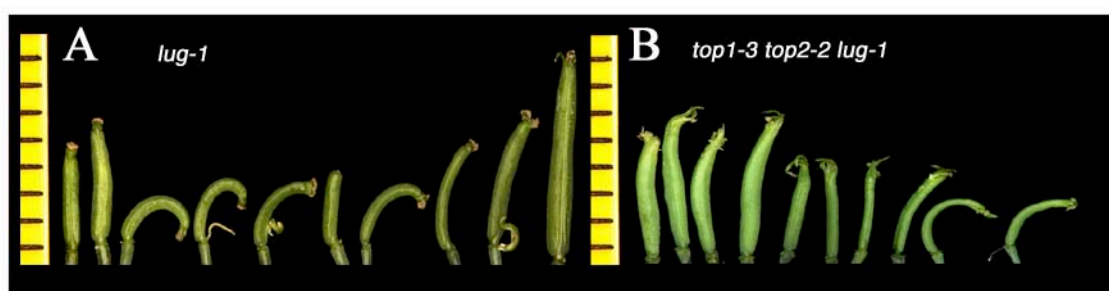
- las alteraciones en el fruto de los mutantes *lug* eran parecidas a las de los mutantes *top*, con defectos en las regiones apicales del mismo.

- dada la coincidencia de patrones de expresión de *TOP* y *STY*, ambos podrían estar regulados por *LUG*.

Por estos motivos, se obtuvo el triple mutante *top1-3 top2-2 lug-1* y se analizó la expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en el mutante *lug-1*.

#### Análisis de los fenotipos mutantes.

Los frutos del mutante *lug-1* eran mas pequeños que los del silvestre. En *lug-1* la media de longitud de los frutos variaba entre 4 y 5 mm, mientras que en el silvestre era de 16 mm. La longitud media de los frutos del triple mutantes *top1-3 top2-2 lug-1* era un poco menor que la del mutante simple *lug-1*. La media de longitud variaba entre 3 y 4 mm (Fig. IV-57 ).

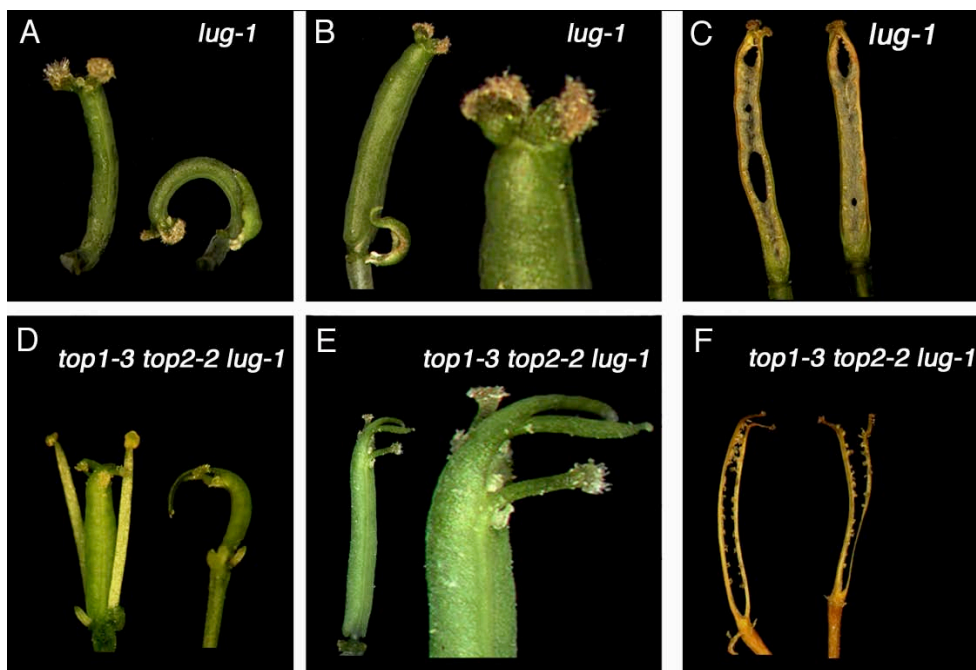


**FIG. IV-57: Comparativa de los tamaños de los 10 primeros frutos de los mutantes *lug-1* y *top1-3 top2-2 lug-1*.** Los frutos están colocados de mayor a menor estadio de desarrollo de izquierda a derecha respectivamente. (A) *lug-1*. (B) *top1-3 top2-2 lug-1*

A pesar de que las diferencias en longitud de los frutos no eran muy marcadas, el triple mutante *top1-3 top2-2 lug-1* mostró diferencias de fenotipo significativas en las regiones apicales respecto al mutante simple *lug-1* y al doble mutante *top1-3 top2-2* (Fig. IV-58). Los frutos del triple mutante estaban alterados en las regiones apicales del

gineceo de forma más severa que en los mutantes anteriores, aunque se curvaban en ocasiones al igual que los del mutante simple *lug-1*. En la región apical de los gineceos mutantes aparecían largas protusiones en cuyo ápice se encontraban las papilas estigmáticas, en número muy reducido. Por otra parte, el septum de los triples mutantes tenía defectos de fusión a lo largo de todo el eje apical-basal mientras que el septum del mutante *lug-1* sólo tenía defectos de fusión en algunas zonas y el septum de los dobles mutantes *top1-3 top2-2* presentaba defectos sólo en la zona apical (Fig. IV-58 C y F).

El hecho de que en el mutante *top1-3 top2-2 lug-1* apareciera un nuevo fenotipo en las regiones apicales del fruto, mucho más severo que en los mutantes *lug-1* y *top1-3 top2-2*, ponía de manifiesto diferencias con lo que ocurre entre *lug* y *sty*, donde el doble mutante *lug sty* es fenotípicamente igual que el mutante *lug*. Por lo tanto, parecía que, al contrario de lo que ocurre con *STY*, *TOP* no se encontraba, al menos exclusivamente, bajo la regulación de *LUG*, e indicando que ambos podrían actuar en vías paralelas en el desarrollo de las regiones apicales del gineceo, quizá convergiendo en algún punto aguas abajo.



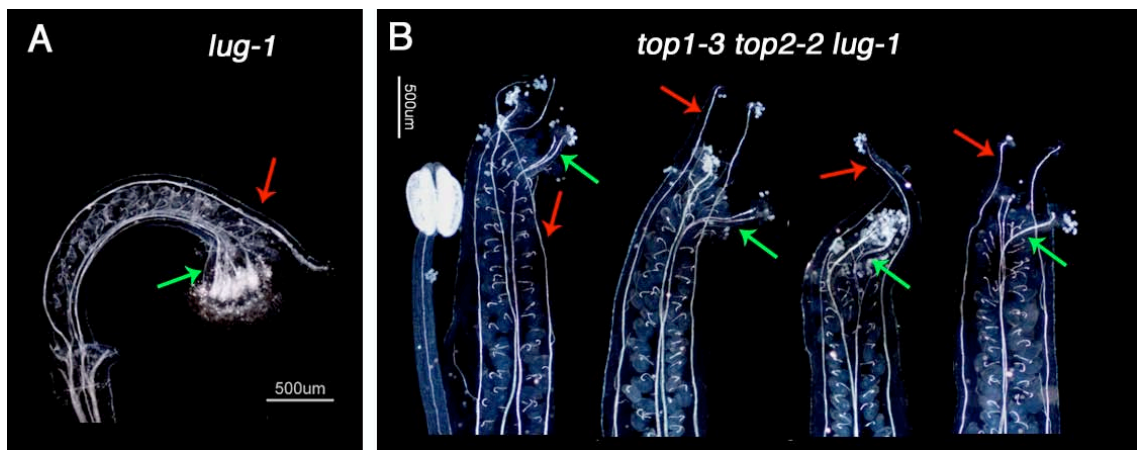
**Fig. IV-58: Alteraciones en el gineceo de los mutantes *top lug* en comparación con las de *lug*.** (A,B,C) *lug-1*. (D,E,F) *top1-3 top2-2 lug-1*. (A,D) flores en anthesis. (B,E) frutos y detalle de las alteraciones de las regiones apicales del gineceo. (C,F) alteraciones en el septum.

#### Análisis del patrón de los haces vasculares.

El análisis del patrón de los haces vasculares del gineceo del triple mutante *top1-3 top2-2 lug-1* al tratar con hidrato de cloral reveló diferencias respecto al mutante simple *lug-1* (Fig. IV-59). El triple mutante tenía reducido el número de haces vasculares que irrigan el estigma en comparación con el mutante simple *lug-1*. En el



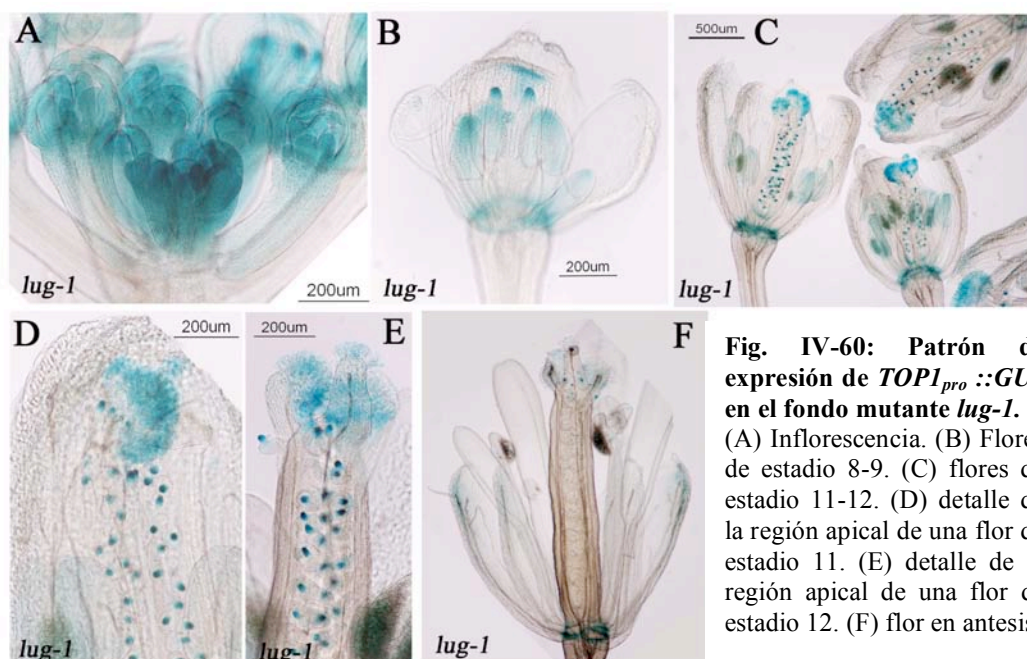
triple mutante también se observó una basalización de los haces mediales. Estos defectos en el desarrollo de los haces vasculares eran parecidos a los que ocurrían en el doble mutante *top1-3 top2-2*. Por lo tanto, este fenotipo, podría ser aditivo por lo menos en lo referente al desarrollo vascular de los haces del estilo.



**Fig. IV-59: Comparación del patrón de los haces vasculares del mutante *lug* frente a *top1-3 top2-2 lug-1*.** (A) *lug-1*. (B) *top1-3 top2-2 lug-1*. Las flecha verdes indican la localización de los haces laterales que discurren por la valva. Las flechas rojas indican la localización de los haces vasculares mediales que discurren por el replum

Análisis de la expresión de la línea reportadora *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en *lug-1*.

El análisis del patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en el fondo mutante *lug-1* no reveló diferencias respecto al silvestre. Por lo tanto, no parecía que *LUG* reprimiera o activara a *TOP*, al menos directamente, apoyando las hipótesis anteriores (Fig. IV-60).



**Fig. IV-60: Patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en el fondo mutante *lug-1*.** (A) Inflorescencia. (B) Flores de estadio 8-9. (C) flores de estadio 11-12. (D) detalle de la región apical de una flor de estadio 11. (E) detalle de la región apical de una flor de estadio 12. (F) flor en antesis.

### 3-1-3. Análisis de las interacciones con *YUCCA*.

Como se ha mencionado, los genes *TOP* y *STY* podrían actuar en vías convergentes por lo que podrían tener dianas comunes. Los genes *STY1/SHI* se han relacionado con la regulación de la síntesis de auxinas (Sohlberg *et al.*, 2006). Se ha identificado *YUCCA4 (YUC4)*, un gen que codifica un enzima clave en la ruta de biosíntesis de las auxinas, como diana de la activación de *STY1*.

Los genes *STY*, al igual que los genes *TOP*, se expresan en las regiones apicales del gineceo en desarrollo, fuente de auxinas según el modelo propuesto por (Nemhauser *et al.*, 2000). Varios genes *YUC* se expresan también en las regiones apicales del gineceo en desarrollo y cuando se mutan estos genes aparecen fenotipos severos en la morfogénesis del carpelo. Se ha descrito que los genes *YUC* tienen funciones solapantes, ya que la inactivación de uno sólo de los genes *YUC* no provoca ningún defecto obvio (Cheng *et al.*, 2006). Sin embargo, los fenotipos son más severos conforme aumenta el número de diferentes genes *YUC* mutados. Por ejemplo, en la región apical del gineceo del doble mutante *yuc1 yuc4* aparece un tejido de tipo estigmático formando un anillo, en el centro del cuál aparece una protusión de tejido de tipo placenta (Cheng *et al.*, 2006) (Fig. I-11).

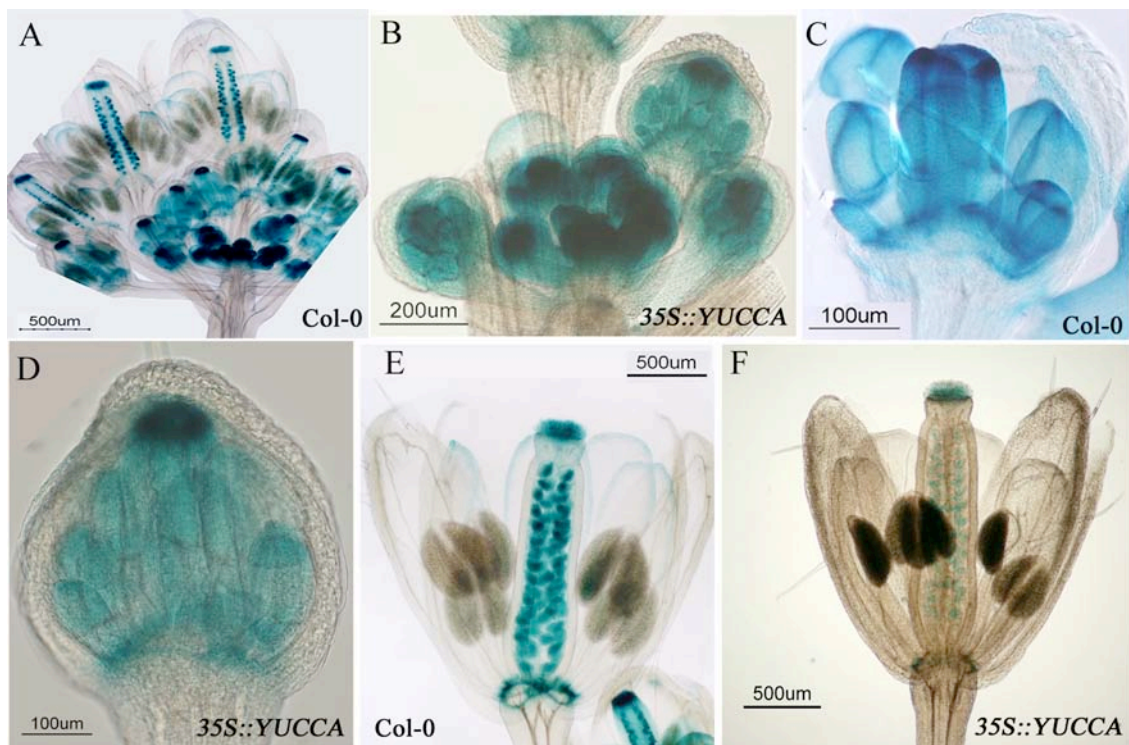
Los resultados obtenidos hasta el momento sugerían que los genes *TOP* y *STY* podrían tener dianas comunes. Por otro lado los patrones de expresión de los genes *TOP* coincidían con zonas de concentraciones máximas de auxinas, por lo que no se podía descartar que los genes *TOP* pudieran estar regulados por las mismas.

Para saber si los genes *TOP* podrían estar regulados por los genes *YUC*, se analizó la expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en líneas de sobreexpresión de *YUC1* (Cheng *et al.*, 2006). La sobreexpresión de los genes *YUC* provoca fenotipos en las hojas de roseta muy parecidos a los provocados por la sobreexpresión de *TOP1* y un aumento en la producción de auxinas (Zhao *et al.*, 2001), (Marsch-Martinez *et al.*, 2002), (Kim *et al.*, 2007).

No se observaron diferencias de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en la línea de sobreexpresión de *YUC1*, por lo tanto parecía que *YUC1* no dirigiría la expresión de *TOP1* (Fig. IV-61).

Por lo tanto, quizá los genes *TOP*, al igual que los *STY* podrían estar regulando a los genes *YUC*. En estudios recientes realizados en nuestro laboratorio (datos no mostrados) se ha analizado la expresión de *YUC4<sub>pro</sub>::GUS* en plantas en las que la expresión de los cuatro genes *TOP* está inhibida. Se ha analizado la expresión de *YUC4* porque ésta coincide con muchas de las zonas de expresión de los genes *TOP* al igual que también lo hace *YUC2*, como por ejemplo, la zona de abscisión de los órganos florales y las regiones apicales del gineceo (Cheng *et al.*, 2006). Se ha observado que la expresión del gen delator disminuye en las regiones apicales del gineceo. Este hecho podría indicar que los genes *TOP* activaran a los genes *YUC* como en el caso de *STY*,

implicando a los genes *TOP* en la regulación de la síntesis de auxinas (M. Navarrete, resultados no publicados).



**Fig. IV-61: Patrón de expresión de  $TOP1_{pro}::GUS$  en  $35S::YUCC1$ .** Se compara con la expresión en Col-0.

(A) inflorescencia de Col-0. (B) inflorescencia de  $35S::YUCC1$ . (C) flor en estadio 8 de Col-0. (D) flor en estadio 8-9 de  $35S::YUCC1$ . (E) flor en estadio 12 de Col-0. (F) flor en estadio 12 de  $35S::YUCC1$ .

### 3-1-4. Análisis de las interacciones con *SPATULA*.

El gen *SPATULA* codifica un factor de transcripción de tipo bHLH (Basic helix-loop-helix) (Heisler *et al.*, 2001). Los carpelos del mutante *spt* no se fusionan correctamente en la parte apical debido al crecimiento reducido del estilo, estigma y del septum; por otra parte, en el mutante *spt* el tracto de transmisión está ausente, lo que provoca una reducción de la fertilidad (Alvarez y Smyth, 1999). *SPT* ha sido propuesto como mediador de la respuesta a auxinas, ya que la inhibición química del transporte polar de auxinas restaura el desarrollo normal del gineceo en los mutantes *spt* (Heisler *et al.*, 2001). Por otra parte, existe una interacción sinérgica muy fuerte entre las mutaciones *spt* y *sty/shi* (Kuusk *et al.*, 2002) (Kuusk *et al.*, 2006). Por todos estos hechos se decidió analizar la posible interacción genética entre *SPT* y los genes *TOP*.

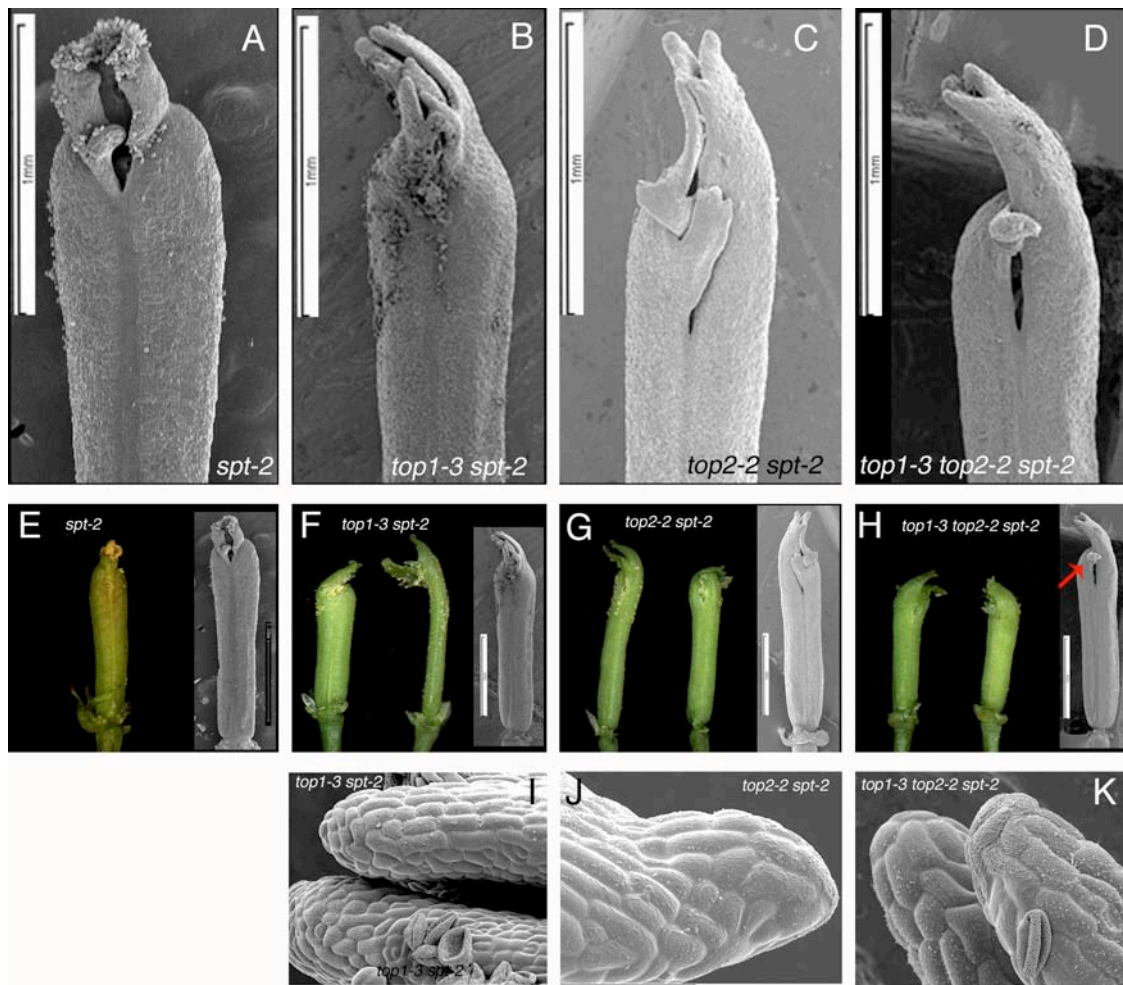
#### Análisis de los fenotipos mutantes.

Se obtuvieron mutantes dobles *top1-3 spt-2* y *top2-2 spt-2*, y mutantes triples *top1-3 top2-2 spt-2*.

El fenotipo que se observó en los dobles mutantes era más severo que el de los mutantes simples por separado. Los dobles mutantes tenían frutos con alteraciones en la



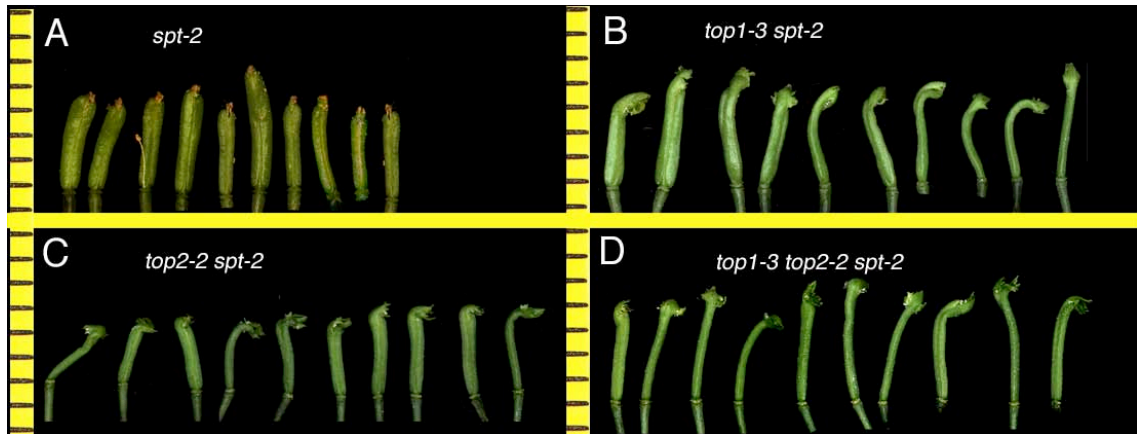
zona apical mucho más acusadas que el mutante simple *spt-2* y que *top1-3*, siendo muy parecidos los fenotipos de *top1-3 spt-2* y *top2-2 spt-2* entre sí. El estilo mostraba defectos de fusión más severos que en los mutantes simples provocando que el carpelo adoptara una forma parecida a la de dos hojas fusionadas (Fig. IV-62). No se encontraron papilas estigmáticas, y las células del estilo, en número muy reducido, se encontraban en los extremos apicales de los carpelos formando pequeños parches.



**Fig. IV-62: Alteraciones de las regiones apicales del gineceo de mutantes *top spt*.** Fenotipo de las regiones apicales del gineceo de *spt-2* (A), *top1-3 spt-2* (B), *top2-2 spt-2* (C), *top1-3 top2-2 spt-2* (D). (E, F, G, H) fotografías *in vivo* (izquierda) y micrografías electrónicas de barrido (derecha). *spt-2* (E), *top1-3 spt-2* (F), *top2-2 spt-2* (G), *top1-3 top2-2 spt-2* (H) Se muestran detalles de las regiones apicales del gineceo del mutante *top1-3 spt-2* (I), *top2-2 spt-2* (J), *top1-3 top2-2 spt-2* (K). Se observan las células estriadas del estilo .

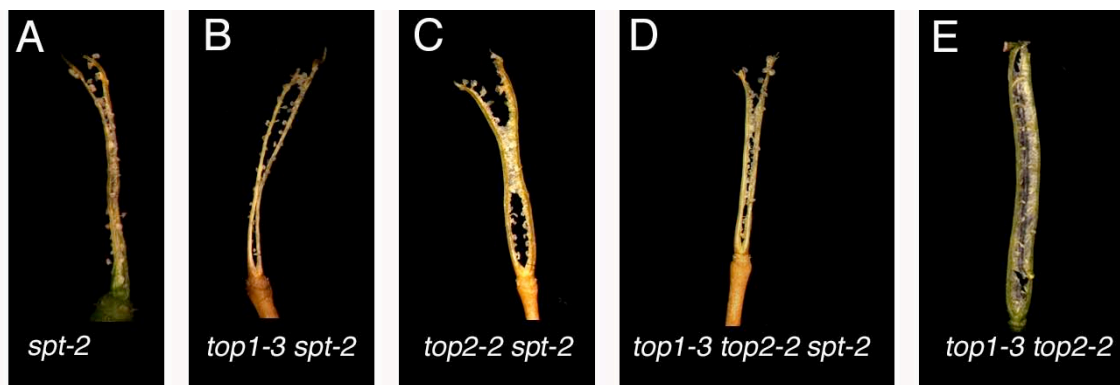
La longitud media de los frutos de los mutantes dobles *top1-3 spt-2* y *top2-2 spt-2* (3-4 mm) era menor que la del silvestre (16 mm), aunque parecida a la del mutante *spt-2* lo que podría reflejar una reducción en la fertilidad de los mismos (Fig. IV-63). Aunque no se realizó un estudio de la fertilidad de dichos mutantes, se observó que el número de semillas que producían era mucho menor que en las plantas silvestres. El triple mutante *top1-3 top2-2 spt-2* presentó fenotipos iguales a los de los mutantes

dobles, es decir, la combinación de las tres mutaciones no aumentó significativamente el fenotipo. En ocasiones, se observó la aparición de óvulos ectópicos en la zona externa del gineceo, a nivel apical, región en la que el estilo no está fusionado.



**Fig. IV-63: Comparación del tamaño de los 10 primeros frutos de *spt-2* (A), *top1-3 spt-2* (B), *top2-2 spt-2* (C), *top1-3 top2-2 spt-2* (D).** Los frutos están colocados de mayor a menor estadio de desarrollo de izquierda a derecha respectivamente.

Finalmente, el septum de los mutantes triples y dobles mostró defectos de fusión a lo largo del eje apical-basal del mismo, al igual que el del mutante *spt-2* (Fig. IV-64).



**Fig. IV-64: Aspecto del septum tras la dehiscencia de las valvas en frutos *spt-2* (A), *top1-3 spt-2* (B), *top2-2 spt-2* (C), *top1-3 top2-2 spt-2* (D) y *top1-3 top2-2* (E).**

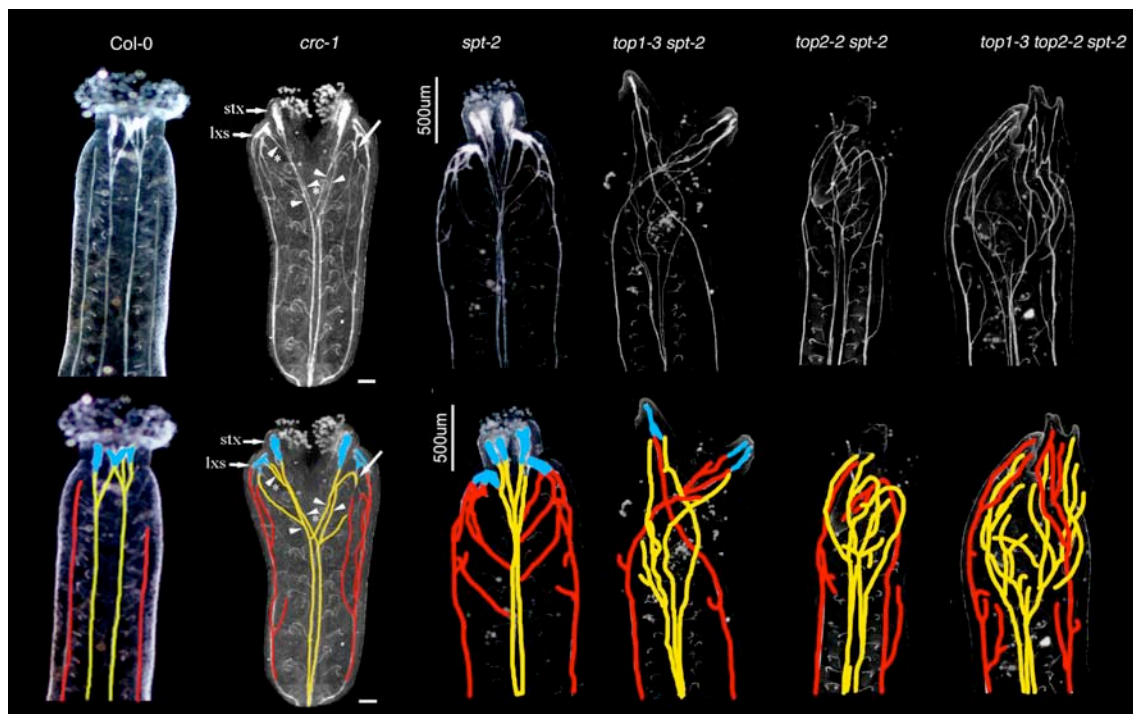
#### Análisis del patrón de los haces vasculares.

Como se ha mencionado anteriormente, *SPT* ha sido propuesto como mediador de la respuesta a auxinas y esta hormona juega un papel importante en la formación de los haces vasculares (Muller *et al.*, 1998), (Carland *et al.*, 1999) (Sieburth, 1999) (Mattsson *et al.*, 1999) (Deyholos *et al.*, 2000) entre ellos los que discurren por el gineceo.

## RESULTADOS

Se analizó la distribución de los haces vasculares en el gineceo de los mutantes *top1-3 spt-2*, *top2-2 spt-2* y *top1-3 top2-2 spt-2* comparándola con la distribución de los mismos en los mutantes *spt-2*, *top1-3 top2-2* y en el silvestre (Fig. IV-65).

En el mutante *spt-2*, el desarrollo de los haces vasculares que discurren por el replum, los haces mediales, se encuentra afectado en el ápice del gineceo. Éstos se bifurcan más basalmente de lo que ocurre en el silvestre y en ocasiones no llegan a alcanzar a los haces que irrigan el estigma. Estos últimos se encuentran en número reducido. Los haces mediales son alcanzados en ocasiones por los haces laterales, que normalmente discurren por la valva, y que en este caso se bifurcan hacia las zonas del replum. En algunas ocasiones, los haces laterales llegan a alcanzar los haces del estilo (Alvarez y Smyth, 2002) que en el silvestre son alcanzados por los haces mediales. Se ha descrito que las alteraciones en los haces mediales del mutante *spt* son debidas a una maduración más tardía de los mismos (Alvarez y Smyth, 2002).



**Fig. IV-65: Alteraciones en los haces vasculares de los mutantes *top spt*.**

Arriba de izquierda a derecha, región apical del gineceo aclarado con hidrato de cloral de Col-0, *crc-1*, *spt-2*, *top1-3 spt-2*, *top2-2 spt-2*, *top1-3 top2-2 spt-2*. Abajo de izquierda a derecha, esquema de los haces vasculares que discurren por la región apical del gineceo de Col-0, *crc-1 spt-2*, *top1-3 spt-2*, *top2-2 spt-2*, *top1-3 top2-2 spt-2*. En rojo se han coloreado los haces laterales, en amarillo los haces mediales y en azul los haces estilares que irrigan el estigma. La fotografía del mutante *crc-1* ha sido modificada a partir de Álvarez y Smyth (2002).

En los mutantes tanto dobles como triples con los genes *TOP*, los haces vasculares que discurren por el replum se bifurcaban más basalmente, al igual que ocurre en *spt* y en *top1-3 top2-2* y como en éstos, existía un número menor de haces vasculares que irrigarían el estigma respecto al silvestre. Sin embargo, el número de

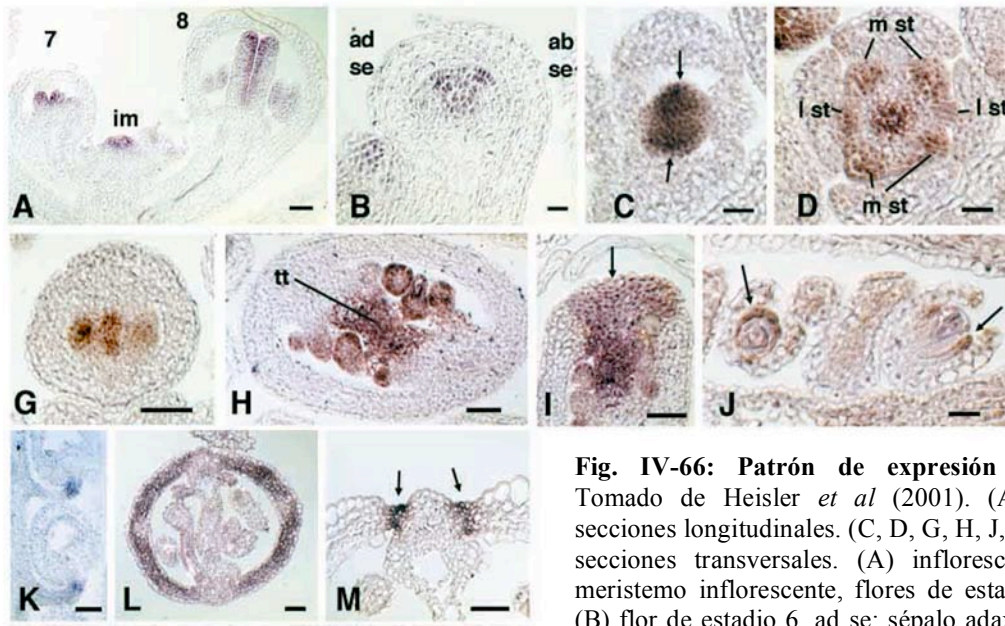
estos haces vasculares era menor que en *spt*, siendo más parecido al del doble mutante *top1-3 top2-2*. En los dobles y triples mutantes se observó que, como en *spt*, los haces laterales se bifurcaban hacia los haces mediales. Sin embargo, característicamente y a diferencia del silvestre y del resto de mutantes simples, los haces mediales de los mutantes dobles y triples se bifurcan hacia la zona de las valvas de forma parecida a lo que ocurre en el mutante *crc* (Alvarez y Smyth, 2002). En la zona apical del gineceo del mutante *crc* los haces mediales en ocasiones conectan con los haces laterales. Esta similitud de fenotipos podría sugerir una posible relación entre los genes *TOP* y *CRC* por lo menos en el desarrollo vascular. Por otra parte, es importante destacar que las bifurcaciones primarias de los haces mediales observadas en los dobles y triples mutantes ocurrían a nivel muy basal (datos no mostrados) de forma parecida a lo que se ha descrito que ocurre en el doble mutante *crc spt* y que ha sido relacionado con el patrón de haces vasculares que se produce en los sépalos (Alvarez y Smyth, 2002). A pesar de esta coincidencia en lo que al patrón vascular se refiere, cabe destacar que el fenotipo del gineceo del mutante *crc spt* es distinto al de los dobles y triples *top spt*, ya que éstos, a diferencia del primero, no se encuentran totalmente sin fusionar.

#### Análisis de la expresión de las líneas reportadoras *SPT<sub>pro</sub>::GUS* y *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en distintos fondos mutantes.

El patrón de expresión de *SPT* ha sido descrito en detalle en (Heisler *et al.*, 2001). La figura IV-66, tomado de (Heisler *et al.*, 2001), pretende poner de manifiesto aquellas zonas en las que la expresión de *SPT* puede solapar con la expresión de los genes *TOP* y por otra destacar las diferencias en los patrones de expresión. En general el patrón de expresión de *TOP1* y *TOP2* coincide con el de *SPT* a lo largo del desarrollo del gineceo. Sin embargo, *SPT* se expresa claramente en las regiones mediales que corresponden a los márgenes del carpelo desde estadios tempranos de desarrollo (Fig. IV-66 C) y durante el crecimiento del gineceo la expresión se restringe gradualmente a los márgenes de la valva en las células que formarán la zona de dehiscencia (Fig. IV-66 M). Aunque en estadio 12 la expresión se detecta a lo largo de las regiones de valva (excluyendo la epidermis y los haces vasculares) (Fig. IV-66 L), mientras que la expresión de los genes *TOP* va restringiéndose a las regiones apicales a lo largo del desarrollo del gineceo y no se ha detectado expresión en los márgenes de la valva (Deyholos *et al.*, 2000).

La línea reportadora *SPT<sub>pro</sub>::GUS*, donada por D. Smyth, reproduce el patrón de expresión descrito en (Heisler *et al.*, 2001). Se utilizó esta línea para comprobar si las mutaciones en los genes *TOP* podrían tener algún efecto en la regulación de *SPT*.

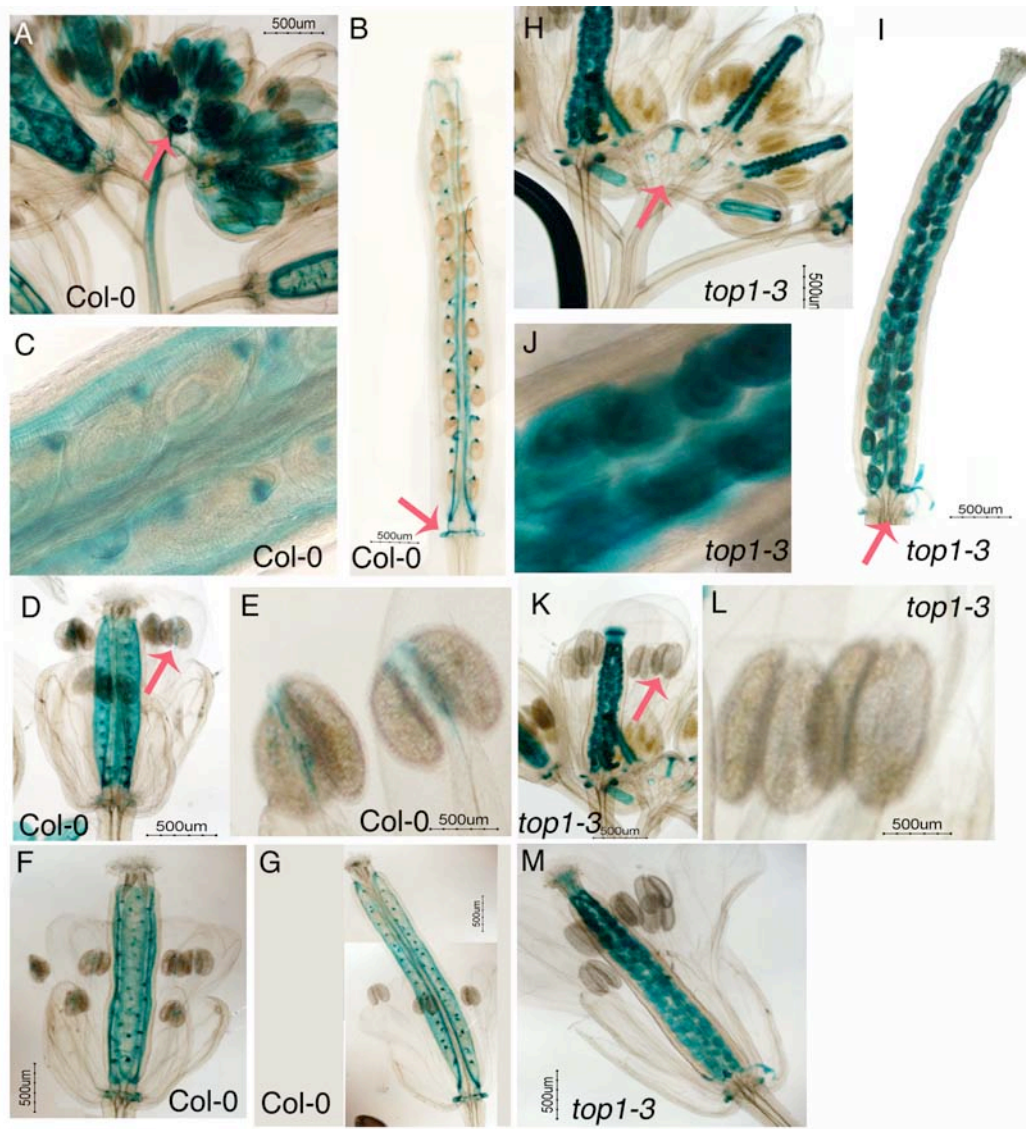




**Fig. IV-66: Patrón de expresión de *SPT*.** Tomado de Heisler *et al* (2001). (A, B e I) secciones longitudinales. (C, D, G, H, J, K, L y M) secciones transversales. (A) inflorescencia, im: meristemo inflorescente, flores de estadio 7 y 8. (B) flor de estadio 6, ad se: sépalo adaxial, ab se: sépalo abaxial.

(C) flor de estadio 6, las flechas señalan expresión en las regiones mediales del carpelo. (D) flor de estadio 6, m st: estambres mediales, l st: estambres laterales. (G) gineceo en estadio 10. (H) gineceo en estadio 11, tt: tracto de transmisión. (I) ápice del gineceo en estadio 11. (J) óvulos de un gineceo en estadio 12. (K) semillas de un gineceo en estadio 15. (L) gineceo de flor en estadio 13, expresión en la valva. (M) gineceo en estadio 17, las flechas señalan la expresión en la zona de dehiscencia.

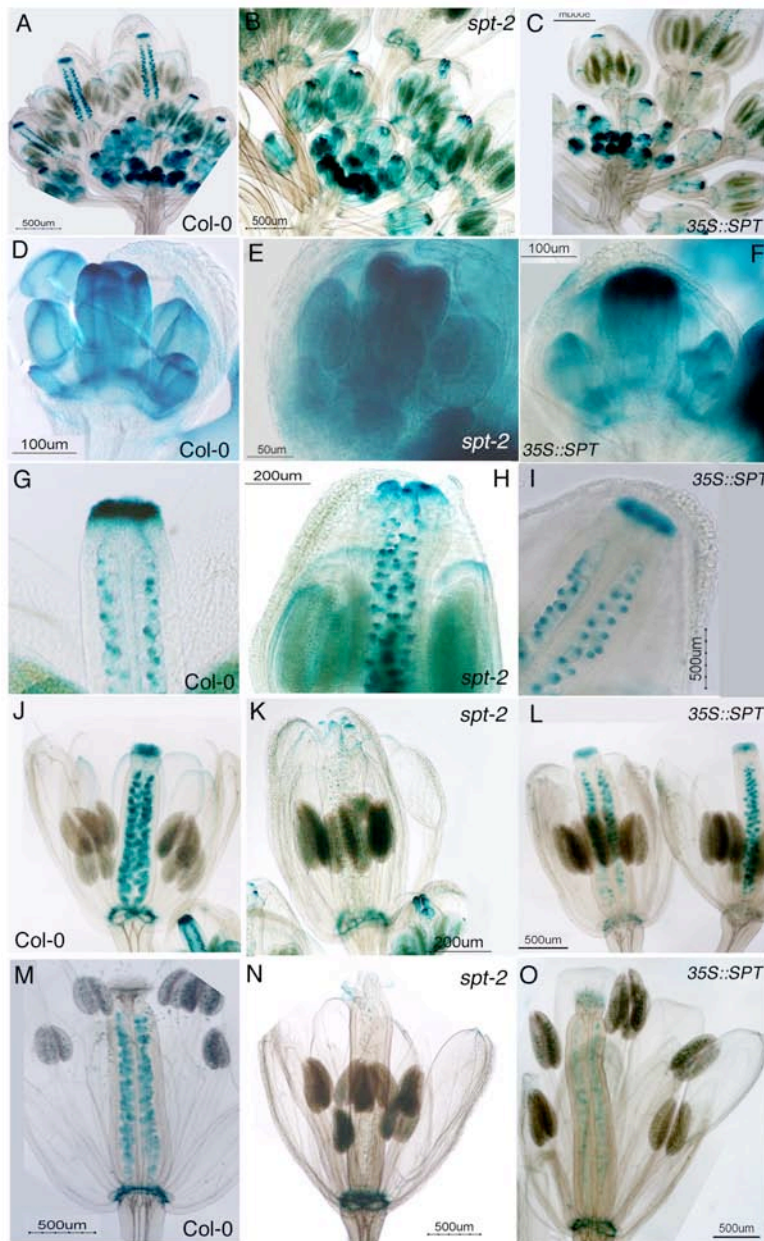
La expresión de *SPT<sub>pro</sub>::GUS* no cambió apreciablemente en los mutantes *top1-3* durante el desarrollo de la inflorescencia y de la flor (Fig. IV-67). Cabe destacar que curiosamente y al contrario de lo que se podía esperar por los fenotipos de sobreexpresión de *TOP1*, la expresión de *SPT* no varió en *top1-3* en comparación con el silvestre en la zona de los márgenes del carpelo que darán lugar a la zona de dehiscencia (Fig. IV-67 B vs I y G vs M). Sin embargo el patrón de expresión del gen delator en *top1-3* sí varió en otros tejidos respecto al silvestre. En *top1-3* no se observó expresión en la zona de abscisión de los órganos florales, aunque sí en los nectarios, a diferencia del silvestre (Fig. IV-67 C vs I). Tampoco se observó en la zona de dehiscencia de los estambres, ni en el meristemo apical del tallo (Fig. IV-67 E vs L y A vs B). Además se localizó la expresión del gen delator en los óvulos y en las semillas del mutante *top1-3*, mientras que en el silvestre sólo se localizó expresión en el funículo (Fig. IV-67 C vs J). Por lo tanto, parecía que *TOP* podría regular a *SPT* en determinados contextos, como por ejemplo, de forma clara, en las semillas. En el resto de los tejidos en los que no se observó expresión de *SPT* podría hipotetizarse que *TOP1* fuera necesario para dicha expresión.



**Fig. IV-67: Patrón de expresión de  $SPT_{pro}::GUS$  en fondo silvestre y en fondo  $top1-3$ .** (A, B, C, D, E, F, G) Col-0 y (H, I, J, K, L, M)  $top1-3$  (B). (A y H) inflorescencias. (B e I) frutos, la flecha indica la zona de abscisión de los órganos florales. (C y J) detalle de los óvulos. (D y K) flores en antesis. La flecha indica la zona de dehiscencia de los estambres. (E y L) detalle de la zona de dehiscencia de las anteras. (F) flor en estadio 12. (G) fruto post antesis, Estadio 14. (M) fruto estadio 14. Nótese la expresión en óvulos y semillas en el mutante  $top1-3$ .

Por otro lado, se analizó la posible regulación de  $TOP1$  por  $SPT$  determinando la expresión de  $TOP1_{pro}::GUS$  en el mutante  $spt-2$  y en la línea de sobreexpresión  $35S::SPT$ , esta última también donada por D. Smyth.

La expresión de  $TOP1_{pro}::GUS$  en el mutante  $spt-2$  no varió respecto a la expresión en el ecotipo silvestre (Fig. IV-68). Tampoco varió la expresión en plantas que sobreexpresaban  $SPT$ , por lo que no parecía que  $SPT$  estuviera regulando a los genes  $TOP$ .



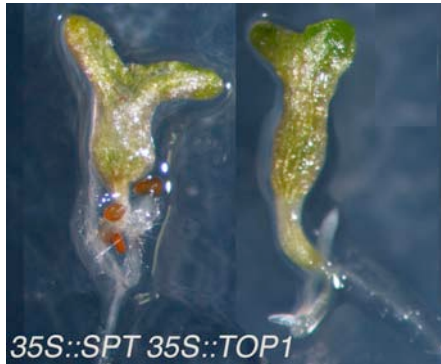
**Fig. IV-68: Patrón de expresión de  $TOP1_{pro}::GUS$  en fondo silvestre, en fondo *spt-2* y en fondo  $35S::SPT$ .**

(A, D, G, J, M) Col-0. (B, E, H, K, N) *spt-2*. (C, F, I, L, O)  $35S::SPT$ . (A, B y C) Inflorescencias. (D, E y F) Flores de estadio 8. (G, H e I) Detalle de las regiones apicales de flores estadio 11. (J, K y L) Flores de estadio 12. (M y O) Flores en antesis. (N) Flor en estadio 12 tardío.

Es importante destacar que las plantas que sobreexpresan *SPT* no tienen fenotipos florales, lo que puede sugerir que *SPT* necesite factores adicionales para desarrollar ciertas funciones. Como ya se ha mencionado, los fenotipos de pérdida de función de ambos genes revelaban cierta sinergia por lo que no se podía descartar que los genes *TOP* pudieran ser dichos factores adicionales. Para comprobar dicha hipótesis, se obtuvieron líneas que sobreexpresaban tanto *SPT* como *TOP1*.



Estas líneas mostraban un fenotipo muy severo; las semillas germinadas en placa no llegaban a desarrollar plántulas, generando sólo los cotiledones, que aparecían fusionados (Fig. IV-69).



**Fig. IV-69: Fenotipo de dos plántulas 35S::TOP1 35S::SPT, con los cotiledones fusionados**

Estos resultados sugerían fuertemente que los genes *TOP* y *SPT* podrían ejercer funciones conjuntamente debido al efecto sinérgico de sus mutaciones. Por otro lado, la posible regulación de *SPT* por parte de *TOP*, sugería que factores adicionales podrían estar interviniendo de modo complejo en las interacciones funcionales de *TOP* y *SPT*.

### 3-1-5. Análisis de las interacciones con *ETTIN*.

*ETTIN* (*ETT*), también conocido como *ARF3*, codifica un factor de transcripción con dominio de unión al DNA tipo ARF (Auxin Response Factor)(Sessions *et al.*, 1997). La proteína ETT probablemente funciona mediando la respuesta a auxinas en el gineceo. Al igual que otros factores de transcripción de tipo ARFs, la expresión de *ETT* no se induce por auxinas (Nemhauser *et al.*, 2000).

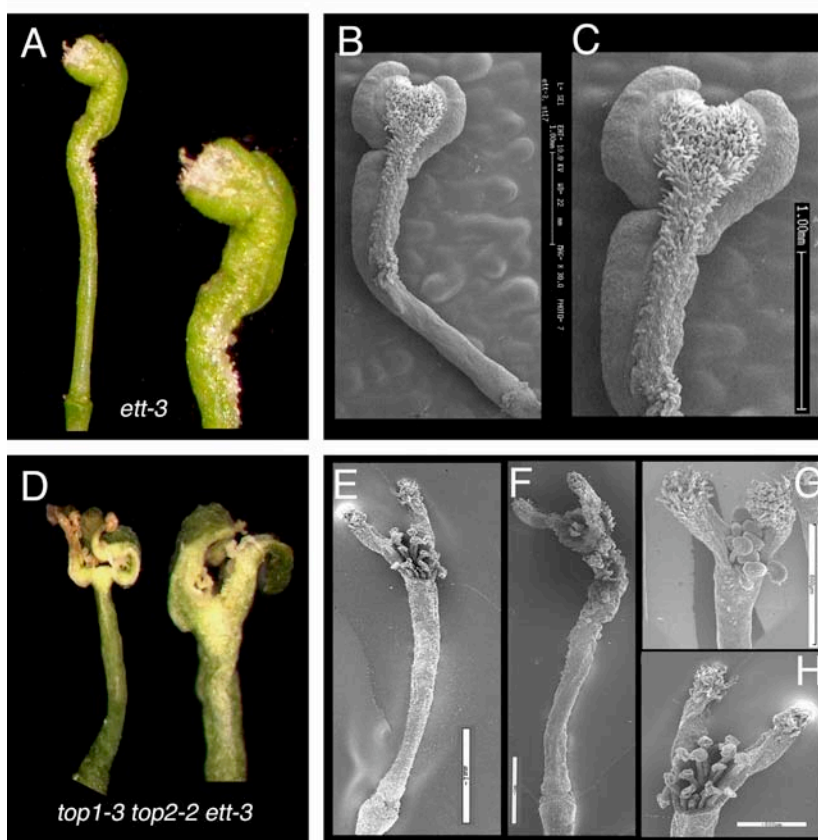
Las mutaciones en *ETT* provocan alteraciones en el eje apical-basal del fruto: el ovario se reduce en tamaño, mientras que el ginóforo, basalmente, y el estilo y estigma, apicalmente, aumentan de tamaño (Sessions *et al.*, 1997; Sessions y Zambryski, 1995). Por otra parte también se producen alteraciones en la polaridad de los órganos, apareciendo en el exterior de las valvas crecimiento del tracto de transmisión. El papel de *ETT* promoviendo la formación del ovario está mediada a través de la represión de la expresión de *SPT* en este dominio. Las mutaciones *spt* son epistáticas a *ett*, suprimiendo el desarrollo ectópico del tejido apical y adaxial que se observa en los mutantes *ett* y rescatando también el tamaño del ovario y del ginóforo (Heisler *et al.*, 2001). Además *SPT* se expresa fuertemente en el tracto de transmisión ectópico de los mutantes *ett*. Por otro lado, los tratamientos con NPA sobre plantas silvestres provocan la aparición de estigmas y estilos más grandes, recordando el fenotipo de alelos débiles de *ett* (Nemhauser *et al.*, 2000). Asimismo, la aplicación de diferentes concentraciones de NPA revela un aumento de la sensibilidad de los alelos débiles de *ett* a la interrupción del transporte polar de auxinas. De manera contraria, los defectos encontrados en el gineceo

de *spt* se rescatan parcialmente por los tratamientos con NPA. Estos experimentos relacionan los fenotipos que presentan ambos mutantes con defectos en la percepción de la señal de auxinas.

Análisis de los fenotipos mutantes.

Se obtuvo el triple mutante *top1-3 top2-2 ett-3* y se analizó su fenotipo (Fig. IV-70). Se eligió el alelo mutante *ett-3* por su fenotipo intermedio, de modo que durante el análisis del fenotipo del triple mutante fuera más fácil la observación tanto de un fenotipo más severo como de uno más débil.

El triple mutante presentaba un fenotipo más severo que el mutante *ett-3* en cuanto a la reducción del tamaño del ovario. En el ovario era todavía menor que el del mutante *ett-3*. En lo referente al tamaño del ginóforo, aunque ambos ginóforos eran más alargados que el silvestre, los del triple mutante lo eran mucho más que los de *ett*. Sin embargo, en el triple mutante *top1-3 top2-2 ett-3* el número de papilas estigmáticas disminuía respecto a *ett-3*, presentando además severos defectos de fusión de las regiones apicales. Por otra parte, en el triple mutante aparecían óvulos ectópicos agrupados en la región apical del gineceo. Este fenotipo podría ser debido a que la reducción del tamaño del ovario y la falta de fusión apical dejara la placenta expuesta.

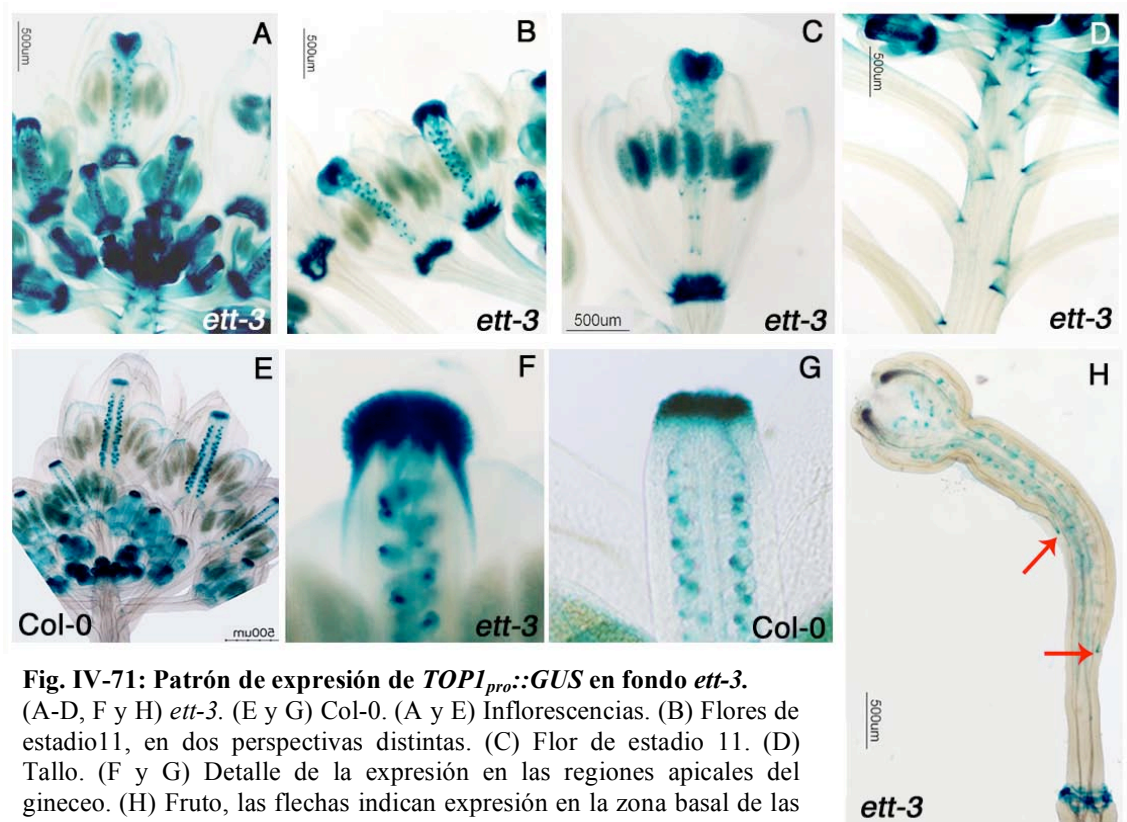


**Fig. IV-70: Alteraciones del gineceo del triple mutante *top1-3 top2-2 ett-3*.** (A-C) *ett-3*. (D-H) *top1-3 top2-2 ett-3*. (A y D) fotografías del gineceo y detalle de la región apical del gineceo *in vivo*. (B,C, E-H) micrografías electrónicas de barrido. (B, E y F) gineceo. (C, G y H) detalle de las regiones apicales del gineceo.

Por lo tanto, en el triple mutante parecía que algunas de las alteraciones de *ett-3*, como la proliferación de papilas estigmáticas, se rescataban, mientras que otras, como la reducción del tamaño del ovario y la elongación del ginóforo, eran más severas. Estas alteraciones podían ser reflejo de cierta interacción entre los genes *TOP* y *ETT*. Para determinar si la reducción en el número de papilas estigmáticas en el triple mutante podría ser reflejo, como en el caso de *spt ett*, de cierta represión de los genes *TOP* por parte de *ETT*, se analizó el patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en el mutante *ett-3*.

Análisis de la expresión de la línea reportadora *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en el mutante *ett-3*.

La expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en el mutante *ett-3* se localizó, al igual que en el silvestre, en flores de estadios tempranos, en el estigma y estilo, en los óvulos, en la zona de abscisión de los órganos florales y en la zona de unión entre tallo y pedicelos de las flores (Fig. IV-71). Sin embargo, la expresión del gen delator en la zona del estilo era muy intensa en el mutante *ett-3* en comparación con el silvestre y se extendía hacia zonas más basales, abaxiales y mediales del gineceo. Por otra parte, se observó expresión en la zona basal de las valvas en frutos *ett-3* de estadio 15 (Fig. IV-71 G, flecha), zona en la que en frutos silvestres no se observó expresión.



**Fig. IV-71: Patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en fondo *ett-3*.**  
 (A-D, F y H) *ett-3*. (E y G) Col-0. (A y E) Inflorescencias. (B) Flores de estadio 11, en dos perspectivas distintas. (C) Flor de estadio 11. (D) Tallo. (F y G) Detalle de la expresión en las regiones apicales del gineceo. (H) Fruto, las flechas indican expresión en la zona basal de las valvas.

La expansión del dominio de expresión de *TOP1* en *ett* es similar a la observada para *SPT*. En *ett*, *SPT* se expresa ectópicamente en las regiones mediales del gineceo y

en las proliferaciones de células abaxiales que aparecen apicalmente en dicho mutante (Heisler *et al.*, 2001). Se ha propuesto que *ETT* previene la expresión de *SPT* en las regiones basales del gineceo silvestre (Heisler *et al.*, 2001). Además, aunque no se detecta la expresión de *SPT* en el ginóforo de las flores *ett* a partir de estadio 7, sí que se extiende hacia la base del gineceo en estadio 6 (Heisler *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos parecían indicar que *ETT* podría reprimir, directa o indirectamente, la expresión de los genes *TOP*, al igual que ocurre con *SPT*, impidiendo que éstos se expresen en el ovario a partir de estadio 10. Es importante destacar que a diferencia de lo que ocurre en el mutante *spt ett*, en el triple mutante *top1-3 top2-2 ett-3* no se recupera el tamaño del ovario ni del ginóforo, al contrario, éstos son más pequeño y más largo respectivamente, lo que podría indicar cierta sinergia entre los genes *TOP* y *ETT* en la distribución apical-basal de los tejidos.

### **3-2. Análisis de las interacciones genéticas de los genes *TOP* con genes implicados en el desarrollo del eje medio-lateral del gineceo de *Arabidopsis*.**

Como se describe en detalle en la introducción, la distribución de los tejidos en el eje medio lateral del fruto está controlada por dos grupos de genes, uno que promueve el desarrollo del margen de la valva (*SHP1,2*, *IND* y *ALC*) y otro (*FUL* y *RPL*) que restringe al primero en las regiones adyacentes. En las valvas actuaría *FUL* y en el replum actuaría *RPL* (Dinneny y Yanofsky, 2005) (Ferrándiz *et al.*, 2000b). Además se ha descrito que los genes *FIL*, *JAG* y *YAB3* actúan promoviendo, de forma redundante, la expresión tanto de los genes del margen de la valva como de *FUL* y que dichas actividades se encuentran reguladas negativamente por *RPL* en el replum (Dinneny *et al.*, 2005). En el esquema I-10 de la introducción se muestra un modelo de las interacciones genéticas en la especificación del margen de la valva.

A pesar de que los frutos de la línea *top1-ID* presentaban similitudes con los del mutante *fruitfull* (Fig. IV-73 A), al analizar los fenotipos de los mutantes de pérdida de función *TOP* no se encontraron alteraciones en el desarrollo de las regiones del fruto a lo largo del eje medio lateral, sino defectos en las regiones apicales del gineceo. El análisis de las interacciones genéticas con mutantes afectados en dichas regiones como *SPT* y *STY* reveló cierta redundancia entre éstos y los genes *TOP* en el correcto desarrollo de las mismas. Sin embargo, durante el análisis del doble mutante *top1-3 sty1-1* se observó cierta indehiscencia de los frutos, por lo que se realizó un análisis del patrón de lignificación de los mismos en el eje medio-lateral para determinar posibles alteraciones a este nivel.

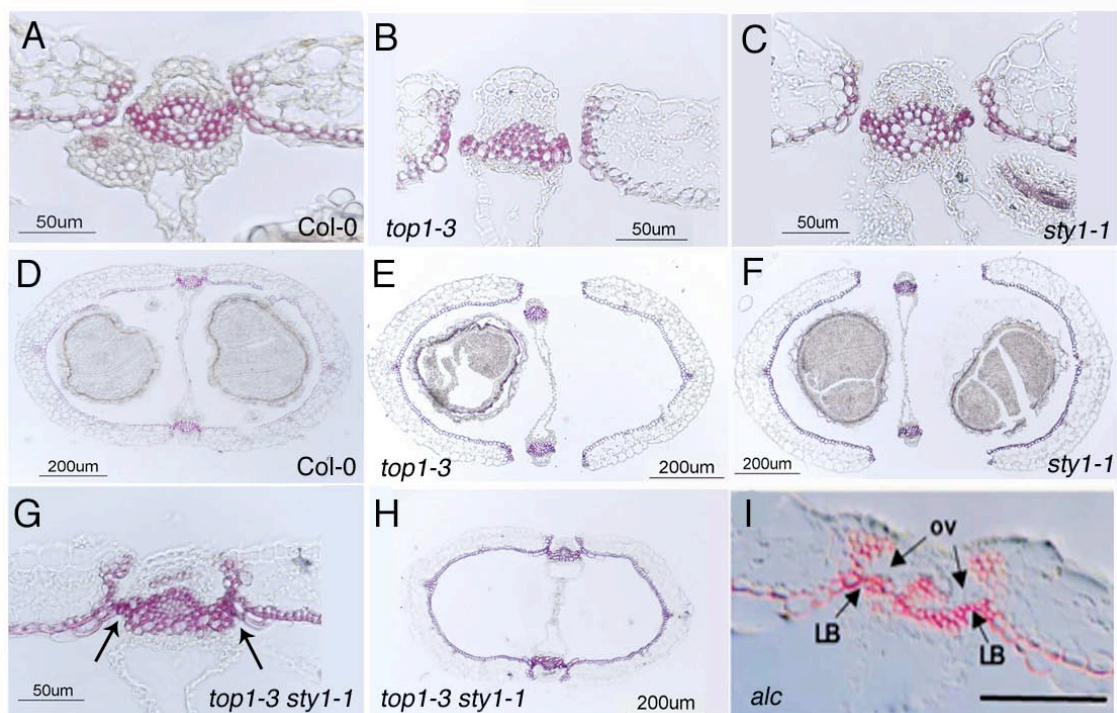
#### **3-2-1. Análisis de la lignificación del doble mutante *top1-3 sty1-1*.**

Para analizar posibles cambios en la estructura del eje medio-lateral y en el patrón de lignificación de los frutos de los dobles mutantes *top1-3 sty1-1*, se incluyeron



en parafina frutos de estadio 17 tardío y se realizaron cortes histológicos transversales que se tiñeron con floroglucinol. Esta sustancia tiñe específicamente de color rosado las células lignificadas. También se analizaron los mutantes simples *top1-3* y *styl-1* y se compararon con frutos del ecotipo silvestre Col-0. En la figura IV- 16 se muestra un esquema de la zona de dehiscencia de un fruto de *Arabidopsis*.

El análisis del patrón de lignificación del doble mutante *top1-3 styl-1* reveló alteraciones en la zona de dehiscencia del mismo (Fig. IV-72). En frutos del doble mutante *top1-3 styl-1* se encontró un puente de células lignificadas que conectaba el margen de valva lignificado y la capa *enb* con el tejido vascular lignificado del replum, similar al que se encuentra en el mutante *alc* (Rajani y Sundaresan, 2001)(Fig. IV-72 I). Debido a estos defectos los frutos del mutante *alc* son parcialmente indehiscentes, ya que se abren bajo presión. Este es un fenotipo menos severo que el de los frutos de los mutantes *shp* o *ind*, en los que no se desarrollan las paredes lignificadas adyacentes a la zona de dehiscencia. El doble mutante *top1-3 styl-1* era dehiscente aunque no completamente.



**Fig. IV-72: Secciones transversales de frutos teñidos con floroglucinol para la detección de lignina.** (A, B, C, G e I) Detalle de la zona de dehiscencia. (D, E, F y H) Secciones transversales de frutos. La barra de escala en I corresponde a 100µm. (A y D) Col-0. (B y E) *top1-3*. (C y F) *styl-1*. (G y H) *top1-3 styl-1*. Las flechas en G señalan el puente lignificado (I) *alc* tomado de Rajani *et al* (2001). LB:puente lignificado, ov: margen de valva externo.

El patrón de lignificación observado en los dobles mutantes *top1-3 styl-1* podría indicar cierta función, quizá de manera conjunta, de los genes *TOP* y *STY* en la especificación de dicha zona, a pesar de que no se observó expresión de *STY* o *TOP* en

## RESULTADOS

la misma, lo que podría sugerir quizá cierta actividad a distancia. El fenotipo de la línea de sobreexpresión *top1-ID* relacionaba a los genes *TOP* con *FUL*. Los mutantes *ful* sufren alteraciones en el eje medio-lateral del fruto, diferenciándose en la valva tipos celulares de la LL y SL (Ferrándiz *et al.*, 2000b). Se ha demostrado que los fenotipos *ful* en el fruto son debidos principalmente a la expresión ectópica de *IND* en la valva, ya que en el doble mutante *ful ind* se suprime en gran medida el fenotipo *ful* (Liljegren *et al.*, 2004). Sin embargo, no sólo la expresión ectópica de *IND* es la responsable del fenotipo *ful*, puesto que conforme aumenta el número de mutantes de genes implicados en el desarrollo del margen de valva se rescata más el fenotipo *ful*. Así en el quintuple mutante *ful ind shp1 shp2 alc* se llega a recuperar prácticamente en su totalidad el tamaño del fruto (Liljegren *et al.*, 2004).

Los fenotipos del fruto de la línea *top1-ID* podrían explicarse por varias hipótesis (Fig. IV-73 B), dentro de las cuales las tres más sencillas serían:

- a - *TOP* podría reprimir a *FUL*.
- b - *TOP* podría activar ectópicamente a *IND* en la valva o ser necesario para la actividad de éste.
- c - *IND* podría activar a *TOP* y ser la activación ectópica de *TOP* la responsable del fenotipo de *ful*.

Otras posibles explicaciones podrían implicar la interacción física de los distintos factores o regulaciones indirectas de los mismos.

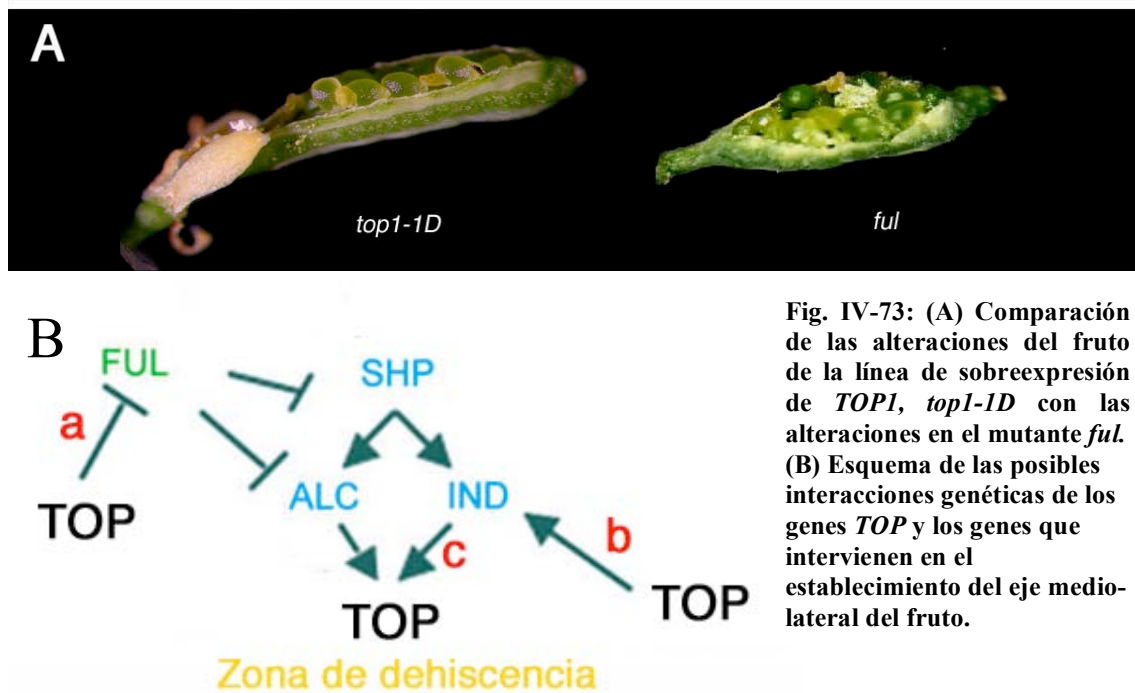


Fig. IV-73: (A) Comparación de las alteraciones del fruto de la línea de sobreexpresión de *TOP1*, *top1-ID* con las alteraciones en el mutante *ful*. (B) Esquema de las posibles interacciones genéticas de los genes *TOP* y los genes que intervienen en el establecimiento del eje medio-lateral del fruto.

Posibilidad a - *TOP* podría reprimir a *FUL*.

Posibilidad b - *TOP* podría activar ectópicamente a *IND* en la valva o ser necesario para la actividad de éste.

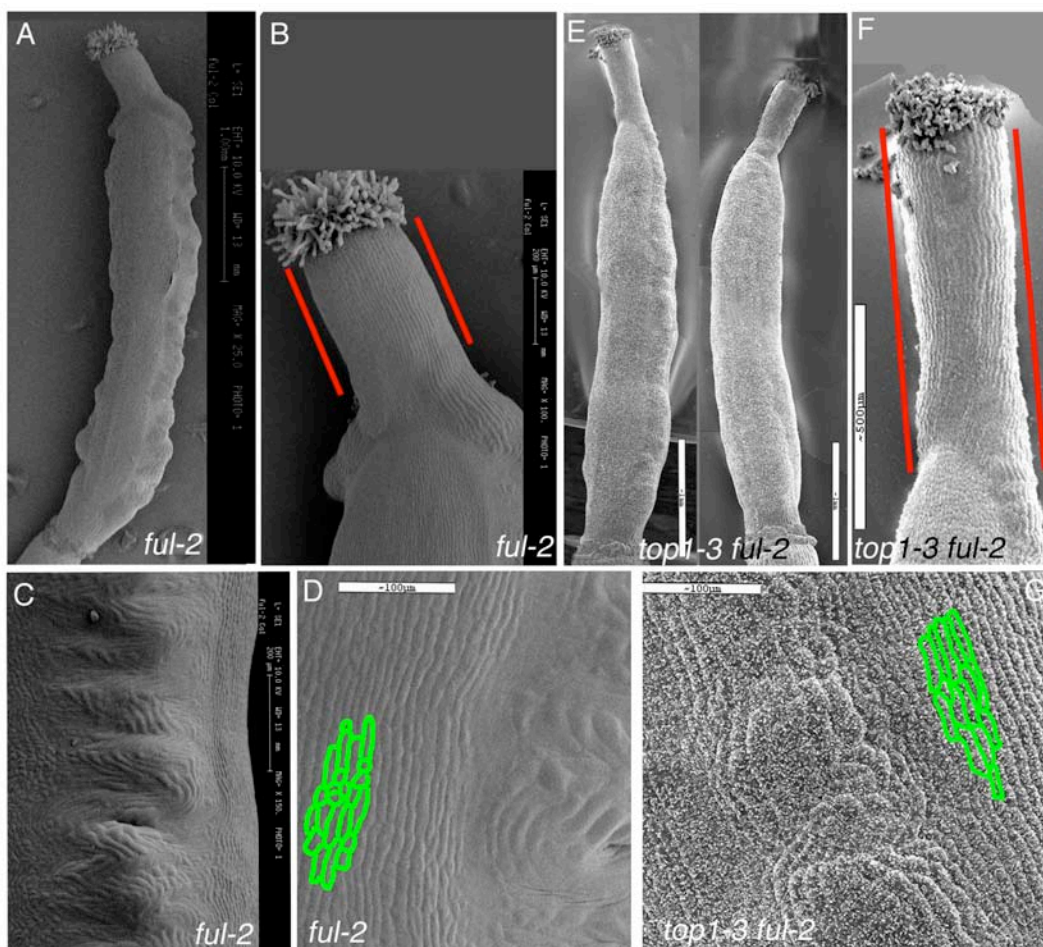
Posibilidad c - *IND* podría activar a *TOP* y ser la activación ectópica de *TOP* la responsable del fenotipo de *ful*.

Para determinar cuál de estas hipótesis era la correcta se comenzó el análisis de las interacciones de los genes *TOP* con genes implicados en el desarrollo del eje medio-lateral del fruto de *Arabidopsis* como *FUL*, *SHP*, *IND* y *RPL*.

A continuación se describen los resultados preliminares que se han obtenido durante el desarrollo de esta tesis utilizando el análisis genético. Es importante destacar que todos estos resultados sólo abren una puerta para el inicio de este trabajo que necesitará de un desarrollo posterior.

### 3-2-2. Análisis de las interacciones con *FRUITFULL*.

El gen *FRUITFULL* (*FUL*), codifica un factor de transcripción de tipo MADS-box. Su función principal es la especificación de la identidad de las células de la valva, especialmente tras la polinización. Las plantas *ful* presentan frutos de reducido tamaño como resultado de la formación ectópica en la valva de pequeñas células como las de la zona de dehiscencia. Como consecuencia, las células de la valva no elongan correctamente y el replum de estos frutos se dispone en zig-zag (Gu *et al.*, 1998).



**Fig. IV-74: Alteraciones del doble mutante *top1-3 ful-2*.** Micrografías electrónicas de barrido. (A-D) *ful-2*. (E-G) *top1-3 ful-2*. (A y E) frutos. (B y F) detalle del estilo. La barra roja en B representa 400 μm, y la barra roja en F representa 1mm. Se puede comparar la longitud del estilo de *ful-2* (B) y *top1-3 ful-2* (F). (C, D y G) detalle del replum. se ha coloreado en verde el contorno de algunas células de la valva para destacar la diferencia entre *ful-2* y *top1-3 ful-2*.

Se obtuvo el doble mutante *top1-3 ful-2*, y se observó que el grado de zig-zag del replum era menos severo que en *ful-2* (Fig. IV-74). Este resultado se puede interpretar como una supresión parcial del fenotipo *ful*, aunque cabe destacar que muy débil. Esto podría apoyar la hipótesis de que *TOP* fuera importante en la especificación del margen de valva, como podría indicar también el fenotipo parecido a *alc* de los mutantes *top sty*, o bien que tuviera algún papel en la especificación del replum. Cabe destacar que la morfología del replum del doble mutante *ful alc* no ha sido descrita aunque sí se ha descrito que en este mutante doble se recupera ligeramente el tamaño del fruto del mutante *ful*. En el doble mutante *top1-3 ful-2* sin embargo, no se observó recuperación del tamaño del fruto. Por otra parte, también se observó que el doble mutante *top1-3 ful-2* tenía el estilo más largo que el mutante *ful-2*. Es importante recordar que los mutantes de pérdida de función, sobre todo *top2-2* presentaban estilos alargados, al igual que el mutante *ful*, sobre todo en fondo *ERECTA+*, por lo que podría existir alguna relación entre ambos genes en el desarrollo del estilo y quizá también con *ER* (Ferrándiz *et al.*, 2000a) (Woodward *et al.*, 2005).

A continuación se analizó la interacción genética de los genes *TOP* con genes del margen de valva como los genes *SHP* y el gen *IND*.

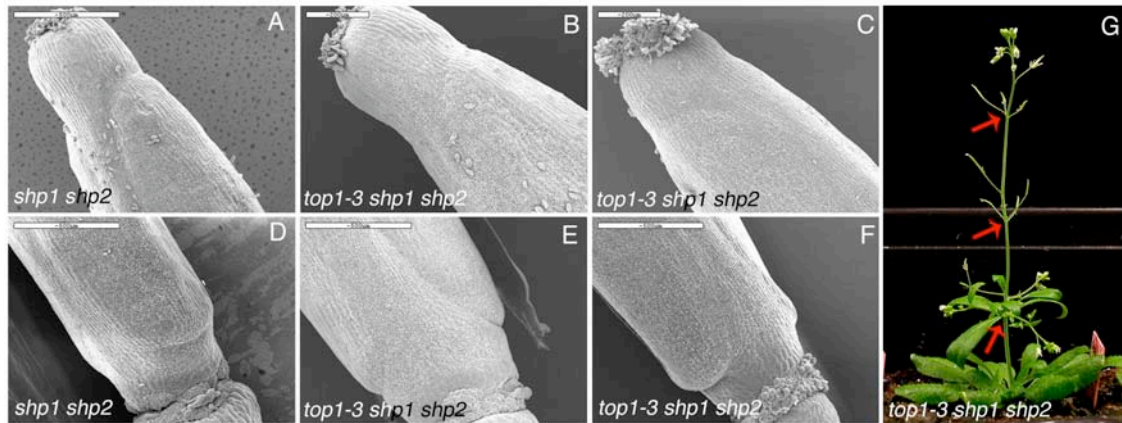
### **3-2-3. Análisis de las interacciones con *SHATTERPROOF*.**

*SHATTERPROOF1* (*SHP1*) y *SHP2* pertenecen a la familia MADS-box de factores de transcripción y son funcionalmente redundantes (Liljegren *et al.*, 2000; Liljegren *et al.*, 2004). Los frutos del doble mutante *shp1 shp2* son indehiscentes, ya que no se diferencia la zona de dehiscencia y disminuye la lignificación del margen de la valva, necesaria para la apertura del fruto (Liljegren *et al.*, 2000).

Se obtuvo el triple mutante *top1-3 shp1 shp2* y se observó que la zona de dehiscencia a nivel apical se encontraba menos diferenciada que en el doble mutante *shp1 shp2*, mientras que a nivel basal no se encontraron diferencias (Fig. IV-75). Este resultado podría indicar que la actividad de los genes *TOP* contribuyera, quizá en paralelo a los genes *SHP*, en la especificación de dicha zona.

Por otra parte, se encontró un fenotipo inesperado en el triple mutante *top1-3 shp1 shp2*. Éste mostraba defectos en la filotaxis (Fig. IV-75 G) no descritos en *shp1 shp2* ni en *top1-3*. Los entrenudos del triple mutante no tenían una longitud uniforme apareciendo, como se muestra en la figura, las hojas caulinares agrupadas y los frutos dispuestos en el tallo de un modo irregular. Quizá estos defectos podrían deberse a que los genes *TOP* y *SHP* pudieran tener alguna relación con los procesos de filotaxis en *Arabidopsis*, en los que las auxinas juegan un papel fundamental. Estos defectos se han observado en el mutante *rpl* (Byrne *et al.*, 2003), en el que el patrón de iniciación de los órganos está alterado y los órganos laterales aparecen con mayor frecuencia que en el silvestre.



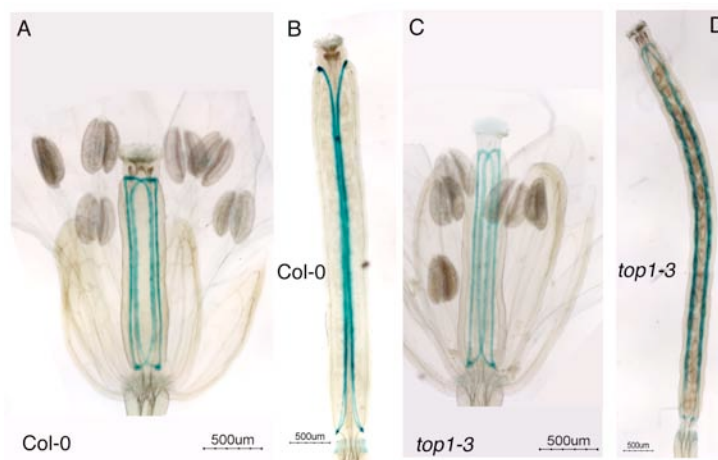


**Fig. IV-75: Alteraciones del triple mutante *top1-3 shp1 shp2*.**

(A y D) *shp1 shp2*. (B, C, E-G) *top1-3 shp1 shp2*. (A, B y C) Detalle de las regiones apicales del gineceo. (D-F) Detalle de las regiones basales del gineceo. (G) Las flechas señalan los defectos de filotaxis que muestran los mutantes *top1-3 shp1 shp2*.

### 3-2-4. Análisis de las interacciones con *INDEHISCENT*.

*INDEHISCENT* (*IND*) es un factor de transcripción de tipo bHLH (basic Helix-Loop-Helix) y junto a los *SHP* especifica la identidad del margen de valva. *IND* juega un papel muy importante en el desarrollo de la zona de separación (SL) y la zona lignificada (LL) (Liljegren *et al.*, 2004) (Wu *et al.*, 2006). En alelos fuertes de *ind* tanto la SL como la LL están ausentes, siendo los frutos indehiscentes. *IND* se expresa estrictamente en la región del margen de valva desde justo antes de la polinización y durante el desarrollo del fruto. Una demostración del papel central que juega *IND* en el desarrollo del margen de valva es que la mutación *ind* es capaz de rescatar varios aspectos del fenotipo del mutante *ful*, suprimiendo la lignificación ectópica de las valvas de *ful*. Las mutaciones en *IND* también rescatan substancialmente la elongación del fruto de los mutantes *ful* y la expansión de la valva (Liljegren *et al.*, 2004).



**Fig. IV-76: Patrón de expresión de *INDpro::GUS* en distintos fondos genéticos.**

(A y B) Col-0. (C y D) *top1-3*. (A y C) Flores en antesis. (B y D) Frutos.

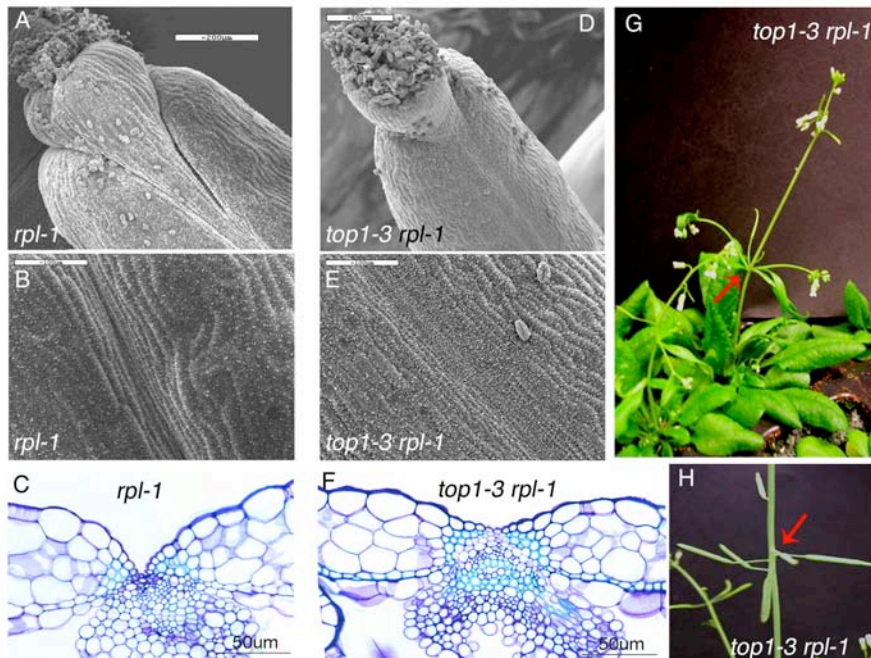
Se analizó la expresión del gen delator *GUS* bajo el control del promotor de *IND* en el mutante *top1-3*, y no se observaron cambios de expresión respecto al silvestre

(Fig. IV-76). Esto podría indicar que *TOP1* no regulara a *IND* o que los posibles efectos se vieran enmascarados por la redundancia de otros miembros de la familia *TOP*. Otra posibilidad sería que otros genes, pudieran actuar redundantemente con los *TOP* en esta regulación.

### 3-2-5. Análisis de las interacciones con *REPLUMLESS*.

*REPLUMLESS* (*RPL*) pertenece a la clase BELL (BELL-1 like) de factores de transcripción con homeodominio. En los mutantes de pérdida de función se reduce drásticamente la anchura del replum, y además aparecen defectos en la filotaxis y el porte de la planta. *RPL* realiza una función en el replum similar a la de *FUL* en las valvas, impidiendo que se expresen genes de identidad de margen de valva (Roeder *et al.*, 2003).

Se obtuvo el doble mutante *top1-3 rpl-1*. Mediante microscopía electrónica de barrido se observó que el replum parecía más ancho en el doble mutante *top1-3 rpl-1* que en *rpl-1* (Fig. IV-77). Sin embargo mediante cortes de frutos en parafina, no se encontraron diferencias entre ambos mutantes en cuanto al tamaño del replum, aunque se observó que en el caso del mutante *rpl-1*, el replum aparecía como un depresión más profunda que en el doble mutante (Fig IV-77 C y F). Por otra parte, el doble mutante *top1-3 rpl-1* presentaba errores de filotaxia al igual que el mutante simple *rpl-1* (Fig. IV-77 G y H).



**Fig. IV-77: Alteraciones del doble mutante *top1-3 rpl-1*.** (A-C) *rpl-1*. (D-H) *top1-3 rpl-1*. (A, B, D y E) Micrografías electrónicas de barrido. (A y D) Detalle de las regiones apicales del fruto. (B y E) Detalle de la zona del replum. (C y F) Secciones transversales de frutos, detalle de la zona de dehiscencia. (G) Porte de la planta *top1-3 rpl-1*, se observan alteraciones en la filotaxis (flecha). (H) Detalle de las alteraciones en la elongación de los entrenudos (flecha).

Por lo tanto estos resultados preliminares parecían apuntar hacia la hipótesis c como algo más probable ya que por una parte se observó cierto rescate, aunque débil, del fenotipo *ful* en el doble mutante *top1 ful*. Por otra parte, se observó cierto paralelismo en la especificación del margen de valva entre los genes *SHP* y *TOP*, aunque también se observó cierta sinergia en los defectos de filotaxis. Además los genes *TOP* no parecía que actuaran regulando a *IND*, aunque no se podía descartar la redundancia funcional de otros miembros de la familia *TOP*.

#### **4. RASTREO DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN EN LEVADURAS DE cDNA DE *Arabidopsis* MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO.**

Los resultados obtenidos sugerían que los genes *TOP* podrían estar actuando en vías complejas y de modo sinérgico con otros genes. Una posibilidad era que las proteínas TOP actuaran formando parte de complejos multiméricos con otras proteínas. Para detectar posibles proteínas de *Arabidopsis* que interaccionaran físicamente con TOP1 y TOP4 y de este modo pudieran regular su actividad, se realizó el rastreo de una genoteca de doble híbrido de levadura. Se eligieron *TOP1* y *TOP4* por ser los miembros de la familia *TOP* más diferentes entre sí y así poder evaluar un rango más amplio de posibles interactores. La identificación de estos interactores era especialmente relevante puesto que diversos resultados sugerían que la función de *TOP1* y *TOP4* podía estar regulada por la formación de complejos diferentes en los distintos tejidos, y como respuesta a la señalización hormonal, y por tanto, podrían jugar un papel clave en la coordinación que presentan los procesos de diferenciación y maduración del fruto y la semilla. La identificación de los posibles miembros de estos complejos aportarían una información muy valiosa sobre la base molecular de estos mecanismos.

La técnica del doble híbrido ha sido aplicada con éxito a la determinación de interacciones proteína-proteína en plantas en un gran número de estudios. Este experimento fue realizado durante una estancia en el laboratorio del Dr. Brendan Davies (Leeds, Reino Unido), grupo de experiencia contrastada en este tipo de técnica.

El plan de trabajo que se realizó se detalla a continuación:

- Se originaron dos construcciones para la expresión de TOP1 y TOP4 en los vectores adecuados para realizar el rastreo. Se generaron levaduras recombinantes que expresaban dichas construcciones.
- Se realizaron controles positivos y negativos que confirmaran la idoneidad de las construcciones generadas y se pusieron a punto las condiciones experimentales adecuadas para la realización del rastreo.
- Se realizó el rastreo de la genoteca de doble híbrido y se obtuvieron clones positivos, realizando posteriormente el análisis preliminar de los mismos.
- Se validaron los resultados positivos mediante distintos ensayos que



descartaran las interacciones espurias y confirmaran los resultados con significado biológico.

### **4-1. Generación de las construcciones cebo pMT22 y pMT23 y levaduras recombinantes.**

Como cebo para el rastreo de la genoteca se emplearon dos construcciones distintas pMT22 (BD-*TOP1*) y pMT23 (BD-*TOP4*) que se utilizaron en dos rastreos distintos de la misma librería de cDNA de *Arabidopsis*. Estas construcciones se detallan en el anexo II-2.

La construcción pMT22 (BD-*TOP1*) contenía el cDNA de *TOP1* en el vector PGBT9, que posee el dominio de unión a DNA. La construcción pMT23 (BD-*TOP4*) contenía el cDNA de *TOP4* en el vector PGBT9.

Antes de proceder al rastreo de la genoteca con estas construcciones, se transformaron con ellas las distintas cepas de levadura (apartado 7-1-8-1 de materiales y métodos) que se iban a emplear (AH109 y Y187). La cepa Y187 se utilizó en el rastreo de la librería de doble híbrido y la cepa AH109 se utilizó para comprobar que las construcciones BD-*TOP1* y BD-*TOP4* no eran capaces de activar, por sí solas, la transcripción de los genes delatores de estas levaduras. En este último caso, se determinó que 5 mM de 3-AT era, para ambas construcciones, la concentración óptima para controlar el fondo de crecimiento en un medio sin histidina. Se comprobó que las construcciones no activaban por sí solas la transcripción de los genes delatores (ver apartado 7-5 de materiales y métodos).

### **4-2. Rastreo de la genoteca de doble híbrido y obtención de clones positivos.**

Se realizó el escrutinio de la librería de cDNA de *Arabidopsis* mediante “Mating”( ver apartado 7-1-8-2 de materiales y métodos) o apareamiento de levaduras.

El número de clones rastreados de la librería se determinó mediante la fórmula descrita en el apartado 7-1-9 de materiales y métodos. Con la construcción pMT22 (BD-*TOP1*) se consiguió rastrear  $1 \times 10^6$  clones de la librería y con la construcción BD-*TOP4* el número de clones rastreados de la librería fue de  $4 \times 10^5$ . Estos números indican la cantidad de posibles interactores con las proteínas cebo que se habían rastreado. Tras realizar la selección de los recombinantes positivos, se rescataron 50 colonias positivas en la interacción con TOP1 y 20 colonias positivas en la interacción con TOP4. Posteriormente, se aisló el DNA plásmidico de estas colonias positivas de levadura. Éste es una mezcla del plásmido DNA-BD/cebo y el plásmido AD/genoteca, por lo tanto, se debía transformar *E.coli* para separarlos y aislar sólo el plásmido que contiene el cDNA de la librería. Esto se realizó para cada una de las colonias positivas. A continuación se secuenciaron estos plásmidos y se realizó un BLAST con la secuencia obtenida, para determinar las distintas proteínas interactoras codificadas por dichas secuencias.

En la tabla IV-1 se muestran los resultados obtenidos en la secuenciación de los clones positivos de la interacción con TOP1 y con TOP4.

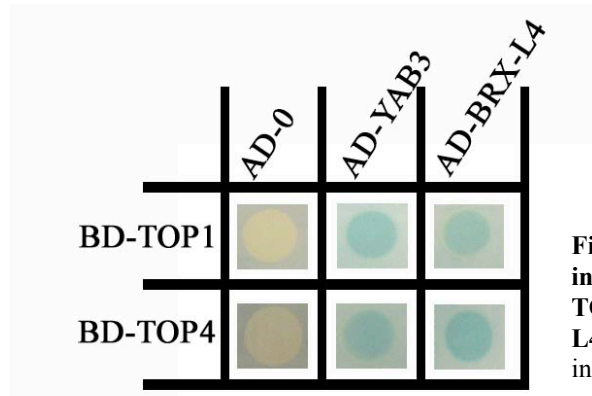
**Tabla IV-1. Proteínas que interactúan con TOP1 y TOP4.**

<b>Proteínas que interactúan con TOP1</b>		
<b>Proteína</b>	<b>Características</b>	<b>Función</b>
At2g01070	Similar a las proteína transmembrana PTM1 y Lung seven.	Posible receptor transmembrana
At2g01720	Proteína de la familia de la Riboforina I.	La Riboforina I es la subunidad catalítica de un complejo que glicosila proteínas
At2g10940	Contiene dominio típico de inhibidor de proteasa, proteínas de almacenamiento en semilla y de transferencia de lípidos	Posible transportador de lípidos en el cloroplasto
At2g19670	Posible actividad Arginina N-metiltransferasa	Metilación de proteínas, ácidos nucleicos u otras moléculas
At2g36580	Posible piruvato kinasa	Actúa en el paso final de la glucólisis, generando ATP
At3g01180	Posible glicosil transferasa	Síntesis de almidón en el cloroplasto
At3g06650	Subunidad B de la enzima ATP citrato liasa	Regeneración citosólica de acetil-CoA para el ciclo de Krebs
At4g00180	YABBY3, factor de transcripción	Involucrada en el desarrollo del fruto y otros órganos
At4g08950	Posible proteína de respuesta a fosfato	Desconocida
At4g32520	SHM3 (SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE 3)	Síntesis de Serina, en cloroplasto
At5g01530	CP29, proteína de unión a clorofila A-B	Involucrada en la fotosíntesis
At5g20540	BRX-L4 (BREVIS RADIX-LIKE 4)	Regulación de la proliferación celular y la elongación en la raíz
At5g22120	Contiene dominio de unión a nucleótidos	Desconocida
<b>Proteínas que interactúan con TOP4</b>		
<b>Proteína</b>	<b>Características</b>	<b>Función</b>
At2g17705	Metionina sulfóxido reductasa	Reversión de la inactivación de proteínas mediada por la oxidación de residuos críticos de metionina
At2g22360	Proteína de la familia DNAJ heat shock	Chaperona, protege y ayuda al plegamiento de otras proteínas
At3g55410	Posible componente de la 2-oxoglutarato dshidrogenasa E1	Enzima del ciclo de Krebs
At4g00180	YABBY3, factor de transcripción	Involucrada en el desarrollo del fruto y otros órganos
At4g03280	Centro del complejo del citocromo b6f	Fotosíntesis
At5g11720	AGLU1 (Alfa-glucosidasa1)	Metabolismo de carbohidratos

Durante el desarrollo de esta tesis no dio tiempo a analizar todas las colonias positivas de los experimentos de doble híbrido por lo tanto, quedan posibles interactores por detectar. Las colonias que quedan por analizar son aquellas que crecieron más tarde en medio sólido por lo que puede tratarse de interactores débiles.

De las proteínas que interactuaron con TOP1 y TOP4, cabe destacar el factor de transcripción YABBY3 y el posible cofactor transcripcional BRX-L4.

Se confirmó la interacción proteína-proteína mediante ensayos en placa. En la figura IV-78 se muestra el crecimiento de colonias azules que indican interacción proteica.



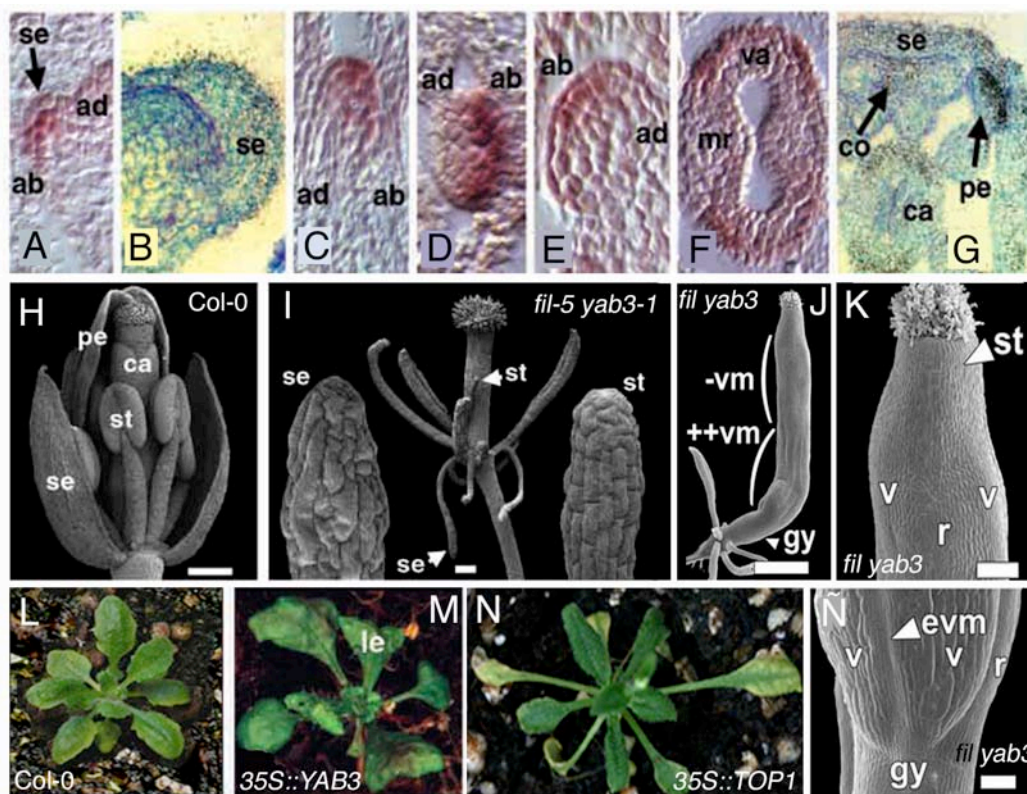
**Fig. IV-78: Confirmación de las interacciones proteína-proteína de TOP1 y TOP4 con YAB3 y BRX-L4. Las colonias azules indican interacción proteína-proteína**

#### 4-2-1. YABBY3.

*YABBY3* (*YAB3*) es miembro de la familia *YABBY*. Algunos de los miembros de esta familia, entre ellos el mismo *YAB3*, están implicados en el establecimiento de la polaridad en distintos momentos del desarrollo de la planta, expresándose en posiciones abaxiales del SAM, de las hojas y del gineceo (Eshed *et al.*, 1999; Eshed *et al.*, 2004; Sawa *et al.*, 1999; Siegfried *et al.*, 1999). La sobreexpresión de *YAB3* provoca la abaxialización de los órganos laterales, apareciendo hojas epinásticas y pequeñas (Fig. IV-79 M) (Siegfried *et al.*, 1999). Mientras que el mutante simple *yab3-1* no tiene fenotipo distinto al silvestre, el doble mutante *fil-5 yab3-1* sí, indicando la redundancia entre ambos genes. Casi todos los órganos de la flor del doble mutante se encuentran radializados. Los carpelos exhiben el estilo alargado y en la valva no se puede distinguir la epidermis abaxial de las células adaxiales subepidérmicas.

Los genes *YABBY* han sido implicados no sólo en dirigir la polaridad adaxial/abaxial sino también en el establecimiento de los dominios medio-laterales, regulando positivamente tanto a *FUL* como a los genes *SHP* en la valva y en el margen de valva respectivamente (Dinneny *et al.*, 2005). Además los genes *YABBY* (en concreto *FIL*), junto a *ANT/LUG/SEU*, se han involucrado en el desarrollo de los tejidos marginales, derivados de las regiones mediales del primordio del gineceo (Nole-Wilson y Krizek, 2006). *ANT*, *LUG* y *SEU* parecen estar involucrados en el mantenimiento de la expresión y/o actividad de *FIL* (Franks *et al.*, 2006; Nole-Wilson y Krizek, 2006). Además *CRC*, miembro de la familia *YABBY* (Bowman y Smyth, 1999), está involucrado en distintos aspectos del desarrollo del carpelo. Los mutantes *crc* tienen defectos en el desarrollo del mismo, como la pérdida de fusión en las regiones apicales. Que tanto TOP1 como TOP4 interaccionaran con YAB3 podría aportar datos acerca de

las posibles funciones de los genes *TOP* en el establecimiento no sólo del eje medio-lateral del gineceo, sino también en la polaridad del mismo.



**Fig. IV-79: *YAB3* y los genes *TOP*.**

(A-G) Patrón de expresión de *YAB3*. (A-I y M) Tomadas de Siegfried *et al* (1999). (A-C) Secciones longitudinales. (D-G) Secciones transversales. (A) Sépalos de un ápice de estadio 3. (B) Pétalos de un gineceo de estadio 5. (C) Pétalos de un gineceo de estadio 8. (D) Pétalos de un gineceo de estadio 8. (E) Primordio de un estambre de un gineceo de estadio 6. (F) Gineceo de estadio 8. (G) Flor en estadio 9. se: sépalo, ad: adaxial, ab: abaxial, va: valva, pe: pétalo, ca: carpelo, mv: borde medial, co; tejido conectivo. (H) Flor silvestre. (I) Flor *fil-5 yab3-1* con detalle de la parte apical del sépalo (se) izquierda y del estambre (st) derecha. (J, K y Ñ) Tomadas de Dinneny *et al* (2005). (J) Micrografía electrónica de barrido de un fruto *fil yab3*. Los paréntesis marcan la región donde no se encuentra margen de valva visible (-mv) y la región donde se desarrolla el margen de valva ectópico (++mv). Se observa la expansión del ginóforo. (K) Región apical de *fil yab3*. st: estilo, v: valva, r: replum. (Ñ) Región basal de *fil yab3*. Aparece una banda de tejido de margen de valva (emv) a lo largo de la mitad de la valva. (L) Roseta Col-0. (M) Roseta *35S::YAB3*. (N) Roseta *35S::TOP1*.

#### 4-2-2. *BRX-L4*.

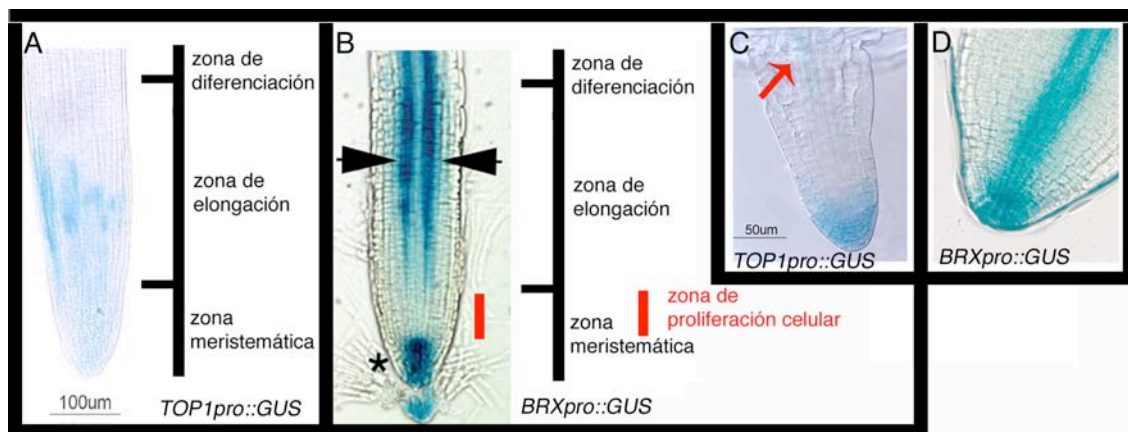
Otra de las proteínas que interaccionó con las *TOP*, fue *BREVIS RADIX LIKE 4 (BRX-L4)*. *BRLX-L4* pertenece a la familia *BRX*. Esta familia está compuesta por cinco miembros, *BREVIS RADIX (BRX)*, que fue identificado como regulador del crecimiento de la raíz (Mouchel *et al.*, 2004), *BRX-LIKE1 (BRX-L1)*, *BRX-L2*, *BRX-L3* y *BRX-L4*. Los genes de la familia *BRX* comparten elevados niveles de similitud entre ellos y tienen varios dominios conservados, sin embargo, las proteínas *BRX* muestran redundancia funcional limitada. Es importante destacar que no se ha descrito el fenotipo de pérdida de función de *BRX-L4*, aunque los datos conocidos sobre los otros miembros de la familia indican que sólo *brx* tiene fenotipo en la raíz, siendo más corta que la

## RESULTADOS

silvestre. El resto de los miembros de la familia no tienen ningún fenotipo observable ni parecen ser redundantes con *BRX* puesto que en el cuádruple *brx brxl1 brxl2 brxl3* no se aumenta el fenotipo de *brx* (Briggs *et al.*, 2006).

Todos los miembros de la familia se expresan, a parte de en la raíz, en todos los órganos aéreos, aunque no se ha encontrado ningún fenotipo aparente, ni siquiera en el cuádruple mutante (Briggs *et al.*, 2006).

*BRX* no se expresa en la zona de proliferación celular del meristemo de la raíz, pero sí en la columella y en la vasculatura del floema, tanto en raíz como en tallo (Fig. IV-80). La mutación *brx* influye en el tamaño del meristemo, posiblemente interrumpiendo el transporte polar de auxinas, ya que esto provoca fenotipos similares a *brx* (Mouchel *et al.*, 2006). Que los *TOP* interaccionaran con *BRX-L4* podría aportar datos sobre la posible función de los *TOP* en la raíz.



**Fig. IV-80: Comparación de los patrones de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* y *BRX<sub>pro</sub>::GUS*.**

(A y C) *TOP1<sub>pro</sub>::GUS*. (B y D) *BRX<sub>pro</sub>::GUS*. (A y B) Expresión en la raíz principal. (C) Expresión en la raíz secundaria. (D) Expresión en embrión de estadio torpedo. (B y D) Modificado a partir de Mouchel *et al* (2006).

## **V. DISCUSIÓN**

---





### 1. *TOP1* y *TOP2* son factores de transcripción con dominio B3.

Los genes *TOP1* y *TOP2* forman junto a *TOP3* y *TOP4* una pequeña subfamilia dentro de los factores de transcripción con dominio B3. El dominio B3 es un dominio de unión a DNA exclusivo de plantas (Bateman *et al.*, 2004). En un trabajo todavía no publicado, Thomas Jack describe que el dominio B3 se ha encontrado en genes de Gimnospermas, musgos y algas verdes, implicando que dicho dominio existe en el linaje de las plantas desde antes de que fueran multicelulares. Además, el hecho de que exista una gran diversidad de factores con dominio B3 (363) podría dar una idea de la importancia de dicho dominio, que puede haberse diversificado adoptando todo tipo de funciones.

Cabe destacar que la proteína (Q8H6E4) que tiene el dominio B3 más parecido al de los miembros de la familia *TOP* pertenece a la planta dioica *Marchantia polymorpha* (División Bryophyta), aunque en este caso, la proteína tiene dos dominios B3 (Ishizaki *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2001). En la figura V-1 se muestran fotografías de los esporocarpos, femenino y masculino de *Marchantia polymorpha*.



**Fig. V-1 :**  
**Esporocarpos de**  
***Marchantia***  
***polymorpha*.**  
 (A) esporocarpo  
 femenino  
 (B) esporocarpo  
 masculino

El gen homólogo a *TOP* se encuentra tanto en el cromosoma Y, en varias copias, como en el cromosoma X y en los autosomas, lo que indica que es un gen que no se encuentra ligado al sexo y que su función ancestral precede a la aparición de los órganos reproductivos.

En *Arabidopsis* podemos encontrar 118 genes que contienen dominios B3 y que se pueden dividir en 4 grupos distintos (Thomas Jack, no publicado) dentro de los cuáles sólo un pequeño número ha podido relacionarse con funciones determinadas. Varios de estos genes se han descrito como factores de respuesta a distintas hormonas como: el ácido abscísico, en el caso de la familia LAV (Luerßen *et al.*, 1998); las auxinas, en el caso de la quizá más profundamente estudiada familia ARF (ver revisiones (Guilfoyle y Hagen, 2007) (Liscum y Reed, 2002) (Remington, 2005) (Wang *et al.*, 2007); el etileno (Alonso *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004) y los brasinoesteroides (Vert *et al.*, 2005) (Mouchel *et al.*, 2006).

Las hormonas tienen un papel instructivo fundamental en el desarrollo general de las plantas y son básicas en los procesos de morfogénesis (Alabadi, 2008). Como se acaba de explicar, muchos de los miembros de la familia B3 están relacionados con las respuestas hormonales. En este trabajo hemos puesto de manifiesto que los genes *TOP* también parecen participar de estas relaciones, al interactuar con las vías de señalización por auxinas. Puede que el escaso número de hormonas pero la gran variedad de procesos en los que están involucradas durante el desarrollo de las plantas esté ligada con la gran variedad de factores con dominio B3 existente y que éstos puedan ser los nexos de unión entre las hormonas y la gran diversidad de “instrucciones” que éstas proporcionan.

Como ya se ha descrito en la Introducción, hasta el momento la superfamilia B3 está formada por 363 miembros dentro de varias especies de plantas (Waltner *et al.*, 2005) agrupados en distintas arquitecturas estructurales basadas en su asociación con otros dominios conservados (Bateman *et al.*, 2004). Dentro de la superfamilia B3, las proteínas TOP estarían dentro de la familia RAV. Dentro de ésta, los genes *TOP* forman un subgrupo ya que, a diferencia del resto de miembros que poseen dominios AP2, los TOP no poseen otros dominios de unión a DNA y sin embargo, comparten otros motivos característicos de la subfamilia TOP.

Si nos fijamos en el árbol filogenético de la familia RAV propuesto por Thomas Jack (Fig. IV-4) se puede observar que los miembros más antiguos de la familia RAV, pertenecientes a arroz, no poseen el dominio AP2. Si la topología del árbol es correcta, considerando estos genes como ancestrales, se puede hipotetizar que este dominio AP2 se ha debido de adquirir en un momento posterior de la evolución y que el subgrupo al que pertenece la familia *TOP* podría haberlo perdido posteriormente.

En un trabajo sobre la caracterización molecular de *RAVI* se muestra que la unión a DNA se produce de modo cooperativo mediante el dominio B3 y el AP2, que por separado se unen con baja afinidad (Kagaya *et al.*, 1999; Okamuro *et al.*, 1997). Es posible especular que los genes *TOP*, con un solo dominio B3, podrían “necesitar” dominios de unión a DNA adicionales, de tipo AP2 o no, para aumentar su afinidad por el DNA, que podrían ser reclutados mediante interacciones proteína-proteína.

Acerca de la proteínas TOP y sus posibles funciones controlando la transcripción, es interesante destacar que dentro de los motivos conservados que hay en la familia TOP se encuentra un motivo semejante a la secuencia consenso de dominio de represión EAR (Fig. IV-5, al final del motivo 4). La secuencia del dominio EAR ha sido analizada por diversos autores y se han postulado varios consensos, entre ellos el propuesto en (Tsukagoshi *et al.*, 2005) sería [(L/F)DLN(L/F)xP]. Otros autores han propuesto la secuencia consenso LxLxL que se encuentra en el dominio I de muchas proteínas Aux/IAA (Tiwari *et al.*, 2004). La existencia de este motivo podría indicar un

papel de los genes *TOP* como represores. Apoyando esta hipótesis, en los ensayos de doble híbrido se observó que los genes *TOP* no activaban por sí mismos la transcripción por lo que puede que su papel sea más represor que activador, aunque carecemos de datos experimentales adicionales que lo apoyen.

También otros tres miembros de la familia B3 que pertenecen a la subfamilia VAL que se encuentra dentro de la familia LAV, tienen dominios de represión tipo EAR (Suzuki *et al.*, 2007) (Tsukagoshi *et al.*, 2005) (Thomas Jack no publicado). Estos miembros de la subfamilia VAL parece que ejercen un papel represor en los programas de desarrollo del embrión, probablemente mediante la regulación negativa de los genes *ABI3* y *FUS3*, estrechamente emparentados con los genes *VAL* y que se encuentran sobreexpresados en los mutantes *val1 val2* (Suzuki *et al.*, 2007) (Tsukagoshi *et al.*, 2007).

Como ya se ha descrito anteriormente, por la homología en la secuencia de nucleótidos, *TOP1* y *TOP2* formarían un subgrupo dentro de la familia *TOP* y *TOP3* y *TOP4* otro. Las regiones genómicas 5' y 3' de *TOP1* y *TOP2* son muy parecidas entre sí (Fig. IV-3), y esta homología se extiende a los genes adyacentes, lo que indica que podrían provenir de una duplicación reciente. Las duplicaciones génicas preceden a la diversificación funcional, pero cuando son recientes suelen dar lugar a genes con funciones redundantes (Moore *et al.*, 2005). Ejemplos claros en *Arabidopsis* son los genes SHP (Liljegren *et al.*, 2000; Liljegren *et al.*, 2004) y *APETALA1/CAULIFLOWER (API/CAL)* (Ferrándiz *et al.*, 2000).

## **2. *TOP1* y *TOP2* actúan redundantemente en el desarrollo de las regiones apicales del gineceo.**

•¿Están los genes *TOP* implicados en la determinación de la identidad de los tejidos apicales o en el crecimiento/proliferación celular del gineceo?

La pérdida de función de los genes *TOP* provoca alteraciones en las regiones apicales del gineceo de *Arabidopsis*. Dichas alteraciones consisten en un desarrollo defectuoso de dichos tejidos, sobre todo del estilo y del estigma. Así, el número de papilas estigmáticas disminuye en comparación con el silvestre y aparecen defectos de fusión en el estilo y en el septum apicalmente.

El gineceo crece por divisiones celulares de las células apicales (Hill y Lord, 1989), por lo que estas alteraciones podrían ser reflejo de un menor crecimiento del gineceo provocado por una disminución de la división celular que como consecuencia provocara que los defectos sean más visibles en las regiones apicales. Alternativamente, podrían deberse a la función de *TOP* en la especificación de la identidad de los tejidos apicales, concretamente el estilo y el estigma.

El gineceo crece como un tubo que se cierra en estadio 10 y posteriormente se desarrollan los tejidos apicales, el estilo y el estigma. En los mutantes *top* los defectos

en las regiones apicales ya se observan en estadios previos a la fusión del gineceo y son evidentes en estadio 10, por lo que se podría pensar que los genes *TOP* tendrían una función asociada al crecimiento y/o proliferación celular del gineceo. Varios datos apoyan esta hipótesis. Los genes *TOP* se expresan en zonas asociadas a la proliferación y/o crecimiento celular tanto en el gineceo, como en las hojas. En el caso del gineceo, la expresión de *TOP1* y *TOP2* se observa extendida uniformemente en los órganos florales en estadios tempranos de desarrollo, en los que están creciendo. En estadios posteriores la expresión se observa en las zonas apicales de los órganos florales, es decir, zonas también de crecimiento y/o proliferación celular de los órganos en formación. De igual forma, en las hojas, la expresión de *TOP1* se observa en zonas en las que se está produciendo una proliferación celular para la expansión de las hojas, como es el caso del meristemo intercalar (Donnelly *et al.*, 1999). También se observa la expresión de *TOP1* en las regiones apicales de las hojas que también serían zonas de crecimiento (Donnelly *et al.*, 1999). Además, el cuádruple mutante *top1 top2 top3 top4* tiene hojas aserradas reflejando posibles problemas de crecimiento, dado que la forma final de las hojas depende de que se produzca la división celular y la expansión de una forma coordinada (Ohno *et al.*, 2004).

Sin embargo, no se puede descartar que los genes *TOP* tengan un papel en la especificación de la identidad de los tejidos apicales ya que, aunque los tejidos apicales, como ya se ha descrito en la introducción, son observables claramente sólo en estadios posteriores a la fusión del gineceo, todavía no se sabe si la determinación de la identidad de los mismos es previa a la fusión. Apoyando esta hipótesis, la sobreexpresión de *TOP1* provoca la aparición de células de estilo ectópicas.

Es interesante destacar que en las líneas *top1-ID* se encontraron células del estilo claramente distinguibles en la zona del replum, mientras que en las líneas *pMT17* las células del estilo en el replum sólo se han observado en algunas ocasiones. Este hecho puede ser debido a que, mientras que en la línea *pMT17* la región bajo el control del promotor 35S era sólo la ORF, en la línea generada por “Activation tagging” se incluía, además de la ORF, parte de la región promotora de *TOP1*. Por lo tanto, en estas líneas la expresión constitutiva de *TOP1* provocada por el 35S podría superponerse al patrón propio de *TOP1*. Es decir los factores que actuaran sobre *TOP1* podrían continuar haciéndolo y el fenotipo no sería igual que en la línea *pMT17*. Sería interesante analizar el patrón de expresión de *TOP1* en ambas líneas de sobreexpresión y compararlos para determinar si existen diferencias que puedan explicar la diferencia de fenotipos.

•¿Son los genes *TOP* funcionalmente redundantes o tienen funciones específicas?.

Las alteraciones en el gineceo de los mutantes *top* son más severas en los mutantes múltiples de miembros de la familia *TOP* que en los mutantes simples por

separado, lo que indicaría redundancia funcional de los miembros de la familia. Las proteínas TOP son muy parecidas. Además, como ya se ha descrito, se expresan en las mismas zonas y de hecho hay secuencias en las regiones promotoras similares entre los cuatro miembros de la familia *TOP* (Fig. V-4, cuadro rojo).

Asimismo, la sobreexpresión de cualquiera de los miembros de la familia *TOP* provoca fenotipos muy similares (Navarrete y Ferrándiz, resultados no publicados). Se ha visto que la sobreexpresión de *TOP1*, cuando se utilizan líneas que sobreexpresan débilmente *TOP1*, suprime el fenotipo del doble mutante *top1-3 top2-2* lo que implicaría que *TOP1* es capaz de rescatar la pérdida de función de *TOP2*. Este hecho apoyaría la redundancia funcional de los miembros de la familia *TOP*.

Además, la interacción proteína-proteína con YAB3 o BRX-L4 tanto de *TOP1* como de *TOP4* apoya la hipótesis de la redundancia funcional de los genes *TOP*, ya que *TOP1* y *TOP4* son los miembros de la familia *TOP* menos similares entre sí y aún así parece que interaccionan con los mismos factores.

Es interesante destacar que la redundancia funcional sería parcial ya que cada uno de los mutantes por separado tiene fenotipo, aunque débil. También es importante poner de manifiesto que aunque existe redundancia funcional, *TOP1* y *TOP2* podrían tener además funciones diferentes. En el caso de los mutantes *top2* se observa un aumento destacado de la longitud del estilo lo que podría involucrar a *TOP2* de manera preferente en la determinación de la longitud del mismo. Así mismo, los mutantes *top1* parecen tener alteraciones más claras que los mutantes *top2* en el crecimiento asimétrico de las valvas, que provoca la inclinación del estilo, y en la fusión del mismo, lo que podría involucrar a *TOP1* en dichos procesos quizá de manera más destacable que *TOP2*.

La redundancia funcional entre miembros de familias génicas dificulta la identificación de *loci* responsables de determinadas funciones, complicando el análisis de los fenotipos causados por la pérdida de función de los mismos mediante mutagénesis clásica y estrategias de genética directa. *TOP1* fue identificado en una mutagénesis por Activation tagging, en la que se podían encontrar, generalmente, fenotipos de sobreexpresión (Weigel *et al.*, 2000). En este caso, la línea que sobreexpresaba *TOP1* tenía un fenotipo observable que consistía en alteraciones en el desarrollo del carpelo por lo que se eligió para el posterior análisis. Gracias a la identificación del gen afectado en dicha línea posteriormente se realizó la búsqueda de mutantes de pérdida de función que, como hemos mencionado, hubieran sido difíciles de identificar mediante abordajes de genética directa.

#### •¿Qué nos dicen los diferentes alelos sobre las funciones de los genes *TOP*? .

Como se ha mencionado los mutantes simples *top1* y *top2* muestran fenotipos menos severos que los mutantes dobles, Sin embargo, el alelo *top1-3* muestra un

fenotipo más severo que otros alelos *top1*. En un principio, este hecho, junto a que no se transcribe el cDNA completo de *TOP1* en este alelo y además el cDNA truncado que se transcribe lo hace en menor cantidad que en el silvestre, hizo que se eligiera dicho alelo para realizar los experimentos posteriores. Sin embargo, como se discutirá a continuación puede que el alelo *top1-4* esté más cerca de ser alelo nulo que *top1-3*.

En comparación con el alelo *top1-4*, la localización de la inserción del transposón (T-DNA en el caso de *top1-4*) en *top1-3*, podría permitir la traducción de una proteína con un dominio B3 casi completo. Aunque los dominios adicionales no se traducirían, el dominio B3, que es el dominio de unión a DNA, sí lo haría (Bateman *et al.*, 2004). Si se estuviera traduciendo una proteína truncada con dicho dominio, aunque éste no estuviera completo, la proteína truncada podría quizá seguir uniéndose al promotor de sus dianas. Sin embargo, el resto de la proteína no estaría completa, lo que podría provocar que ésta actuara como una proteína antimorfa. Por ejemplo, en el caso de que la proteína TOP1 silvestre actuara mediante una unión proteína-proteína, la proteína traducida en el alelo *top1-3* quizá podría unirse al DNA, pero probablemente no podría interactuar correctamente con las posibles proteínas interactoras. *top1-3* es un alelo recesivo, por lo que quizá simplemente, la unión al DNA de la proteína truncada podría impedir la unión de otros miembros de la familia TOP que ya no actuarían correctamente disminuyendo en conjunto la actividad TOP.

Para comprobar esta hipótesis sería interesante analizar el fenotipo de sobreexpresión de *TOP1-3* y compararlo con el de sobreexpresión de *TOP1*. En un principio se podría esperar que la sobreexpresión de *TOP1-3* provocara fenotipo *top* aunque también podría provocar otros fenotipos distintos que pudieran revelar factores adicionales.

Por lo tanto, a pesar de que el fenotipo del alelo *top1-4* era más débil que el de *top1-3* y por este motivo no se analizó tan profundamente en un principio, se decidió incluir posteriormente el alelo *top1-4* en el estudio. En el caso del alelo *top1-4* la inserción ocurre en el principio de la región que codifica el dominio B3, por lo que se puede suponer que, en caso de producir una proteína truncada, no podrá unirse al DNA.

A pesar de las características del alelo *top1-3*, el haber realizado el análisis de las interacciones con este alelo ha permitido observar los fenotipos con mayor claridad que si se hubieran realizado sólo con *top1-4*.

### **3. La implicación de los genes *TOP* en el desarrollo del eje apical-basal del gineceo de *Arabidopsis*.**

El tipo de alteraciones que muestran los mutantes *top* implica a los genes *TOP* en el desarrollo del eje apical-basal del gineceo de *Arabidopsis*. Por lo tanto, se ha

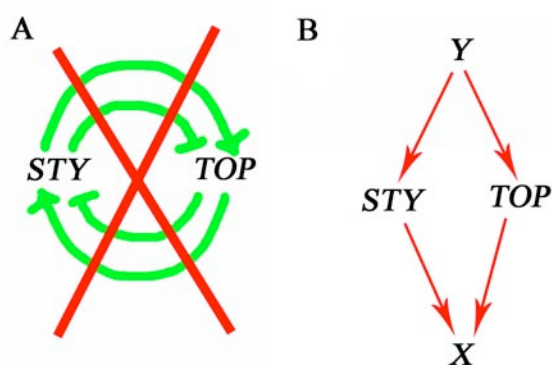
analizado la posible interacción de éstos con otros genes ya conocidos involucrados en dicho proceso.

• Los genes *TOP* y *STY* están estrechamente relacionados.

- Similitudes funcionales entre los genes *TOP* y los genes *STY*.

Los fenotipos de pérdida de función de los genes *TOP* (esta tesis) y *STY* (Kuusk *et al.*, 2002) son muy parecidos, por lo que podrían sugerir que actuaran en los mismos procesos. Además, los genes *STY* (Kuusk *et al.*, 2002) se expresan en las mismas zonas que los genes *TOP* por lo que podría existir alguna regulación directa entre ellos. Para determinar si existe una regulación directa de *TOP* por parte de *STY* o viceversa, se ha analizado la expresión de las líneas reportadoras *STY1<sub>pro</sub>::GUS* y *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en distintos fondos mutantes *top* y *sty* respectivamente. No se han encontrado cambios en el patrón de expresión en ningún caso, incluso en un trabajo realizado en el laboratorio, fuera de esta tesis, se ha observado que en el cuádruple mutante *top1 top2 top3 top4*, la expresión de *STY1<sub>pro</sub>::GUS* no varía significativamente. Por lo tanto, no parece que exista una regulación directa de unos sobre otros. Así, la coincidencia del patrón de expresión podía sugerir que los genes *TOP* y *STY* estén regulados por factores comunes.

Además, en el análisis de los dobles mutantes *top1 sty1* se ha observado que los fenotipos son más severos que los encontrados en los mutantes por separado. Estos resultados podrían sugerir que los genes *TOP* y *STY* actuaran en vías convergentes, quizá sobre las mismas dianas.



**Fig. V-2: Distintas posibilidades de interacción genética entre *TOP* y *STY*.**

(A) No se ha observado que ninguno de los dos regule al otro.

(B) Podrían actuar en vías convergentes, y podrían estar regulados por factores comunes.

- Los genes *TOP* y *STY* podrían tener dianas comunes.

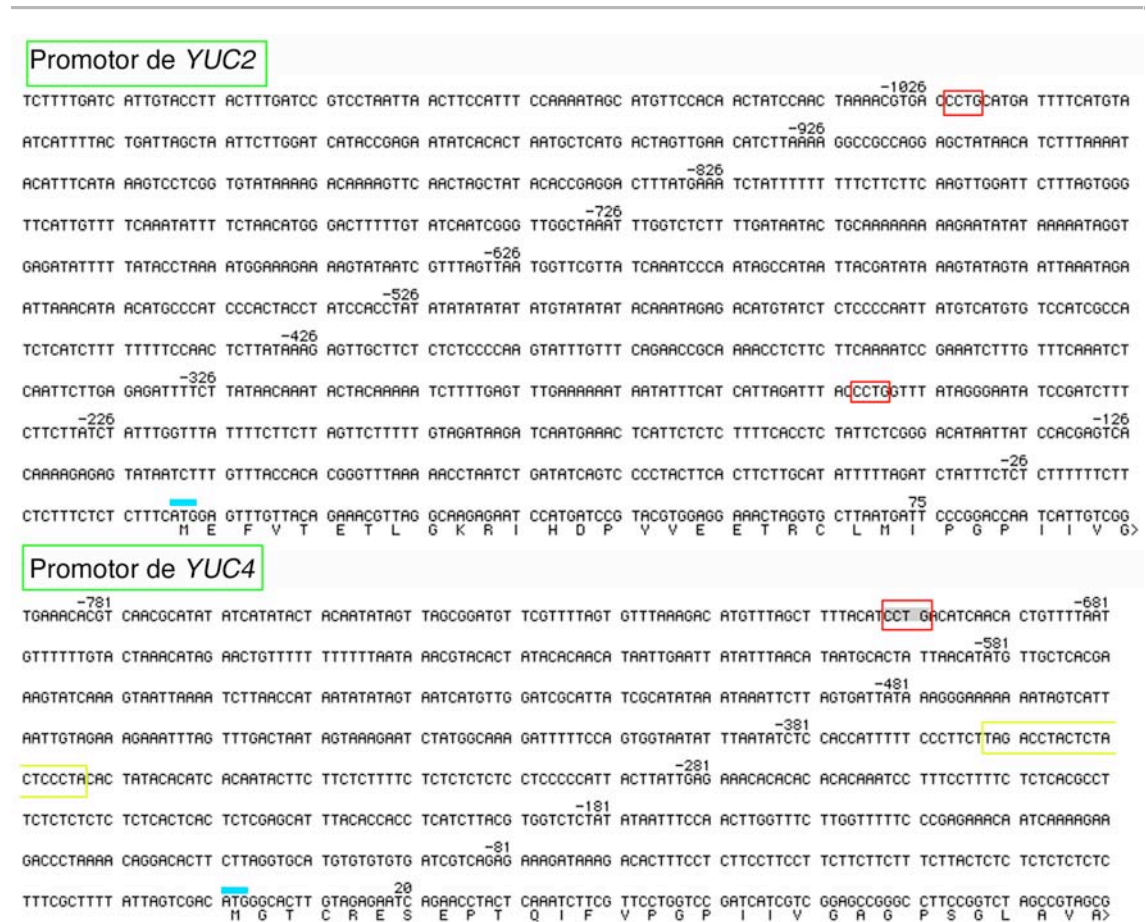
En el artículo (Sohlberg *et al.*, 2006) se han determinado varias de las dianas de los genes *STY*. En concreto en este artículo, se ha descrito que los genes *STY* podrían regular la síntesis de auxinas activando al gen *YUCCA4*, que codifica enzimas clave en la ruta de biosíntesis de auxinas. Diversos resultados indican que los genes *TOP* podrían estar implicados en vías de señalización por auxinas. Por ejemplo, la expresión de los genes *TOP* coincide con regiones de máximos de auxinas (Benkova *et al.*, 2003) (Reinhardt *et al.*, 2003) (Zgurski *et al.*, 2005) y tanto la pérdida como la ganancia de función de los genes *TOP* provocan fenotipos relacionados con la disminución y con el



aumento de auxinas respectivamente (Scheres, 2002)), como se puede observar en los fenotipos de las raíces y en el desarrollo vascular del gineceo.

Como ya se ha discutido, *STY* y *TOP* podrían converger en dianas comunes siendo los genes *YUC* buenos candidatos a ser dichas dianas. Se han encontrado secuencias en el promotor de *YUC2* y *YUC4* que son similares a los sitios de unión del dominio B3 de *RAVI* (Kagaya *et al.*, 1999), miembro de la familia *RAV* al igual que los genes *TOP*. El sitio de unión de *RAVI* es caCCTG pero la región más conservada dentro de este motivo es CCTG (Kagaya *et al.*, 1999). En la figura V-3 se muestra donde se localizan dichas secuencias.

Durante el desarrollo de esta tesis no ha dado tiempo a realizar un análisis en profundidad de las interacciones con los genes *YUC*; aún así, sí se ha podido determinar que los genes *TOP* no están regulados por los genes *YUC* ya que en las líneas de sobreexpresión de *YUC1* (Cheng *et al.*, 2006), no varía la expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS*. Sin embargo, resultados recientes de nuestro laboratorio han implicado a los genes *TOP* en la activación de los genes *YUC2* y *YUC4* (Navarrete y Ferrándiz, comunicación personal). Así, los genes *TOP* y *STY* podrían converger en la síntesis de auxinas, mediante la regulación de los genes *YUC*.



**Fig. V-3: Secuencias promotoras de *YUC2* y *YUC4*.** En azul se ha marcado el ATG. En rojo se han encuadrado aquellas secuencias (CCTG) similares a los sitios de unión del dominio B3 de *RAVI* (caCCTG). En amarillo se ha destacado el sitio de unión de *STY* (Kuusk, comunicación personal)

Por otra parte cabe destacar que las zonas de expresión de los genes *TOP* coinciden con las zonas de expresión de algunos genes involucrados en la síntesis de ligninas (Kim *et al.*, 2007) como *AtCAD7* y *AtCAD8* (Cinamil Alcohol Deshidrogenasas). No se ha estudiado el fenotipo que provoca la pérdida de función de estos genes en el gineceo de *Arabidopsis* aunque se han observado defectos en el porte de las plantas, que no crecen tan erguidas como las silvestres (Sibout *et al.*, 2005). Los mutantes *top* muestran defectos en los patrones de lignificación, por lo que quizá sería interesante analizar las interacciones de los genes *TOP* con estos genes de síntesis de ligninas para saber si los genes *TOP* podrían estar regulando a dichos genes.

- Otras posibles dianas de los genes *TOP* sugeridas por otros miembros de la familia B3.

Aunque se puede especular sobre cuáles podrían ser las dianas de los genes *TOP* no se sabe cuáles son las secuencias de DNA que reconocen los genes *TOP*. Sin embargo, ya que pertenecen a la familia RAV se podría pensar que podrían reconocer las mismas secuencias de DNA que los miembros de esta familia (caCCTG) (Kagaya *et al.*, 1999) y por lo tanto, tener dianas comunes.

Por otra parte, las secuencias de DNA que reconocen los dominios B3 de las distintas familias son de seis pares de bases y comparten cierta similitud. Se ha propuesto que los dominios B3 comparten una estructura común de reconocimiento aunque difieran en las bases específicas a reconocer (Yamasaki *et al.*, 2004). Quizá esa estructura común de reconocimiento podría permitir en algunas ocasiones a los miembros de las diferentes familias reconocer secuencias distintas a las de reconocimiento específico, aunque similares, pero quizá con menor especificidad.

Sería interesante determinar las implicaciones en la regulación génica que puede tener el hecho de que los dominios B3 pudieran reconocer secuencias distintas, aunque similares, a las específicas de cada subfamilia. ¿Podrían en ese caso interferir los miembros de una subfamilia de factores con dominio B3 con la regulación que llevan a cabo los miembros de otra subfamilia de factores B3?

- Los genes *TOP* y *STY* podrían tener reguladores comunes.

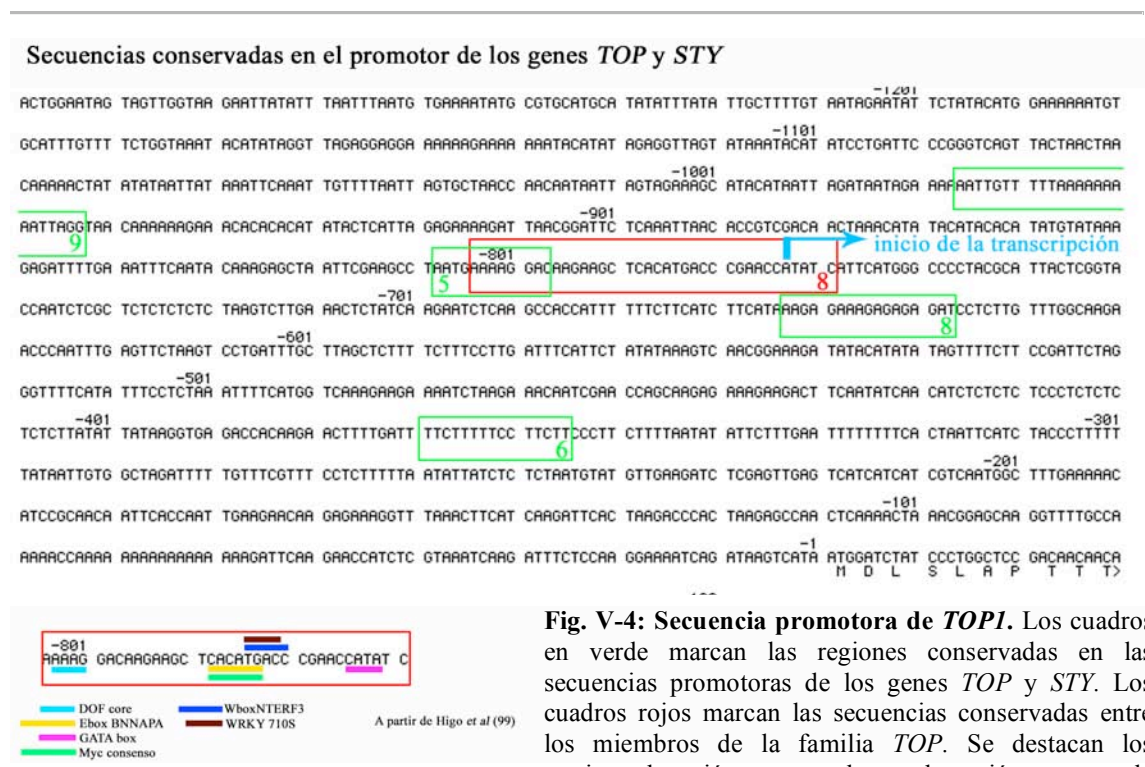
Como ya hemos mencionado los patrones de expresión coincidentes (aunque como se explicará más adelante no son exactamente iguales) de los genes *TOP* y *STY* y el que no exista una regulación de unos sobre otros podría indicar que estén regulados por algún factor común. Apoyando esta hipótesis, se han encontrado regiones conservadas comunes en las secuencias promotoras de los miembros de las familias *TOP* y *STY* (Fig. V-4, cuadros verdes). Sería interesante conocer posibles factores que se unieran específicamente a dichas regiones para determinar posibles reguladores comunes a los *TOP* y *STY*. En la Figura V-4 se muestran los posibles dominios de unión

que se han encontrado en la región 5' promotora que es muy similar entre los distintos miembros de la familia *TOP*.

Durante el desarrollo de esta tesis se llevó a cabo un experimento de híbrido simple con la intención de conocer posibles reguladores de *TOP1* y *TOP4* que no se ha incluido en esta Tesis ya que no salió adecuadamente.

Un posible candidato para esta regulación común podría ser *LUG*, un cofactor transcripcional, que ha sido propuesto como regulador de *STY*. Los fenotipos *lug* son epistáticos sobre los fenotipos *sty*, como se observa en el doble mutante *lug sty* (Kuusk *et al.*, 2006). Además, la sobreexpresión de *STY* es capaz de rescatar los fenotipos *lug* por lo que parece que *LUG* podría estar regulando a los genes *STY* directa o indirectamente. Si como ya se ha discutido, los genes *TOP* y *STY* pueden tener reguladores comunes, quizá *LUG* podría ser uno de ellos.

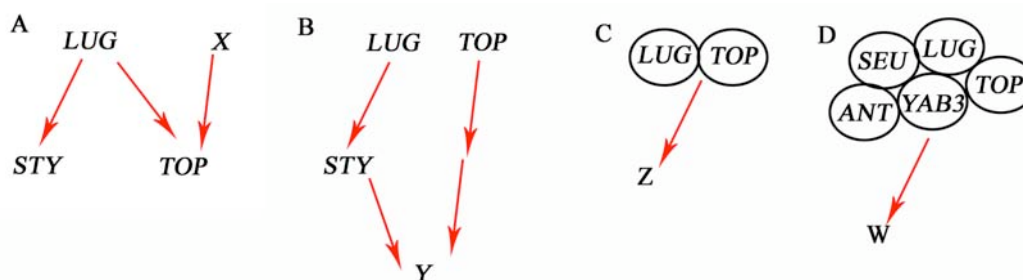
Sería interesante analizar si la sobreexpresión de *TOP1* es capaz de rescatar los fenotipos *lug* al igual que ocurre con la sobreexpresión de *STY*. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con *STY*, el análisis de los fenotipos mutantes *top lug* no ha revelado epistasia como en el caso de *sty* sino que en dichos mutantes aparecen nuevos fenotipos mucho más severos en el desarrollo del carpelo. Además, el análisis de la expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en fondo *lug* no ha revelado alteraciones evidentes respecto al silvestre. Por lo tanto, no parece que *LUG* regule a los genes *TOP* como se ha propuesto para los genes *STY* aunque no se puede descartar que además de *LUG*, otros factores puedan regular a *TOP* independientemente de *LUG* de forma redundante (Fig. V-5 A).



Nuestros resultados indican que existe interacción genética entre *LUG* y los genes *TOP*. Por un lado, algunos aspectos del fenotipo de los triples mutantes *top1 top2 lug* son sinérgicos, como las alteraciones relacionadas con el desarrollo de los tejidos marginales, que en el triple mutante son más severas que el de los mutantes por separado. Por otro lado, otros aspectos del fenotipo de los triples mutantes *top1 top2 lug* podrían considerarse aditivos, como ocurre en el desarrollo de los haces vasculares. En los triples mutantes *top1 top2 lug* los haces vasculares mediales están alterados de igual forma que en el doble mutante *top1 top2*, es decir disminuyen en número y se basalizan, mientras que el mutante *lug* no muestra alteraciones en el desarrollo de los haces vasculares mediales.

Estas evidencias sugieren que la interacción de *LUG* con *TOP1* y *TOP2* no es equivalente a la de *LUG* con *STY*, aunque quizá cabe destacar que la epistasia de *lug* sobre *sty* no ha sido documentada en gran profundidad, sobre todo en lo referente a los haces vasculares. Así, se podría pensar que *LUG* no regula a *TOP* sino que la interacción es de otra naturaleza.

En base a los resultados anteriores se podría especular que los genes *TOP* pudieran formar parte de la ruta *ANT/LUG/SEU/YAB* para la especificación de los tejidos marginales. Se ha propuesto que estos factores podrían actuar formando un complejo, aunque con poca evidencia experimental, en el desarrollo de las regiones marginales (Balanzá *et al.*, 2006) (Franks *et al.*, 2002) (Sridhar *et al.*, 2004) (Navarro *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que *TOP1* y *TOP4* son capaces de interaccionar proteína-proteína con *YAB3* es tentador pensar que las proteínas *TOP* pudieran formar parte de dicho complejo si es que éste existe realmente.



**Fig. V-5: Distintas posibilidades de interacción genética entre *TOP* y *LUG*.**

(A) Podrían existir factores adicionales que activaran a *TOP* independientemente de *LUG*. (B) *LUG* y *TOP* podrían actuar en vías convergentes. (C) *TOP* y *LUG* podrían interaccionar proteína-proteína. (D) *TOP* podría formar parte de un posible complejo *SEU*, *LUG*, *ANT*, *YAB3*.

Como ya se ha descrito en la introducción, las mutaciones en *ANT*, que provocan fenotipos de pérdida de función similares a los mutantes *top* en el gineceo, aumentan el fenotipo de las mutaciones *lug* (Liu *et al.*, 2000) al igual que ocurre en el caso de los mutantes *top*. Cabe destacar que *ANT* tiene un dominio de unión AP2 (Hu *et al.*, 2004)

al igual que muchos de los miembros de la familia RAV a la que pertenecen los genes *TOP*. La subfamilia *TOP* parece haber perdido el dominio AP2 durante la evolución, y quizá, mediante la formación de complejos con factores transcripcionales con estos dominios, pueda realizar parte de sus funciones.

- A pesar de sus similitudes, los genes *TOP* y *STY* no tienen funciones idénticas.

Como ya se ha descrito existe una relación funcional muy estrecha entre los genes *TOP* y *STY*, como revelan los fenotipos sinérgicos de los mutantes *top sty*. Sin embargo, a pesar de que la similitud de los fenotipos de pérdida de función de los mutantes *top* y *sty* es muy elevada, afectando severamente al desarrollo de las regiones apicales del gineceo de *Arabidopsis*, no son fenotipos completamente iguales.

Mientras que los mutantes *top* muestran alteraciones más severas en las regiones apicales laterales y el replum no muestra defectos tan severos, los mutantes *sty* muestran alteraciones en las regiones apicales mediales y las valvas muestran defectos menos severos (Fig. IV-57). Estos fenotipos podrían indicar que los genes *TOP* y *STY*, aunque convergen en determinados procesos, también podrían actuar en procesos distintos.



Fig. V-6: *STY* y *TOP* podrían convergen en el desarrollo de las regiones apicales del gineceo de *Arabidopsis*, aunque podrían estar implicados en otros procesos por separado.

Otra posibilidad es que *TOP* y *STY* actúen en los mismos procesos sobre las mismas dianas, pero que dependiendo de posibles diferencias en sus dominios de expresión, regulen preferentemente a dichas dianas en regiones diferentes.

Apoyando esta última hipótesis se ha observado que los patrones de expresión de *TOP1* y *STY1* no solapan por completo. Mientras que en el meristemo floral en estadio 3 la expresión de *STY* parece situarse en zonas abaxiales (Kuusk *et al.*, 2002), la de *TOP* parece ser más adaxial (Fig. IV-57). Para estar seguros de que las expresiones de los genes *TOP* y *STY* no son completamente iguales sería necesario realizar un análisis más detallado de la expresión de los mismos. Así, por ejemplo sería interesante realizar hibridaciones *in situ* de *TOP1* y *STY1* en cortes seriados en diferentes estadios de desarrollo para poner de manifiesto estas posibles diferencias.

Otro resultado que podría sugerir que las dianas comunes puedan estar preferentemente reguladas por *TOP* o *STY* en diferentes dominios sería que la sobreexpresión de *TOP1* y *STY1* provoca fenotipos que, aunque relacionados, podrían



considerarse espacialmente complementarios. Mientras que la sobreexpresión de *TOP1* provoca la aparición de valvas más pequeñas, el replum adopta una forma de zig-zag y aparecen células del estilo ectópicas en el ginóforo y en ocasiones en el replum, la sobreexpresión de *STY1* provoca la aparición de valvas arrugadas por la aparición de células del estilo ectópicas en la zona central de la valva (Kuusk *et al.*, 2002).

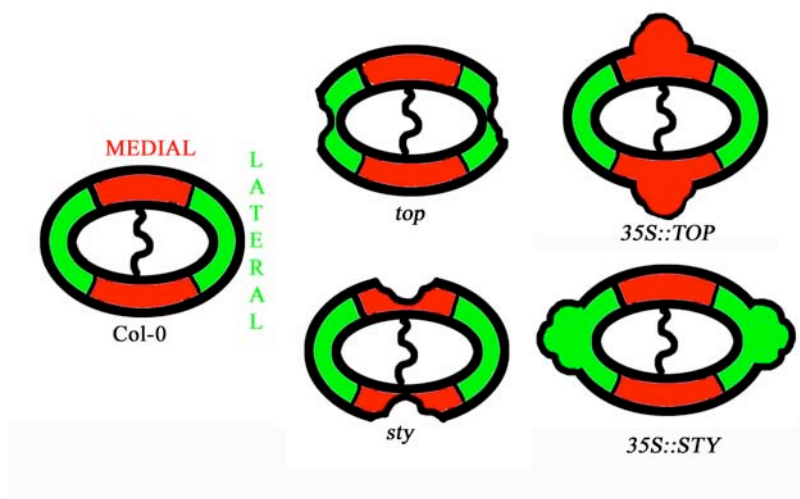


Fig. V-7: Esquema representativo de las alteraciones en las regiones mediales (rojo) y laterales (verde) del gineceo en los mutantes *top* y *sty* y en las líneas de sobreexpresión de *TOP1* y *STY1*.

• *SPT* podría ser un tercer factor importante junto a *STY* y *TOP* en el desarrollo de los tejidos apicales.

Otro gen que puede estar estrechamente relacionado con los genes *TOP* es *SPT*. *SPT* tiene un patrón de expresión que solapa con el de los genes *TOP* y *STY* y que es muy similar en las regiones apicales del gineceo (Heisler *et al.*, 2001). La pérdida de función de *SPT* provoca defectos en la determinación de los tejidos apicales del gineceo al igual que ocurre en los mutantes *top* (resultados de esta tesis) y *sty* (Kuusk *et al.*, 2002). Además, el análisis de los fenotipos *sty spt* ha revelado una fuerte sinergia lo que indica que al menos estos dos genes pueden estar actuando en los mismos procesos (Kuusk *et al.*, 2002) (Kuusk *et al.*, 2006).

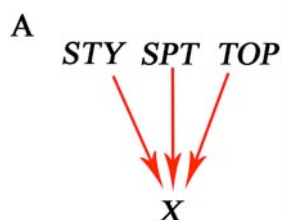


Fig. V-8: Esquema de la posible convergencia de las actividades *TOP*, *STY* y *SPT*.

Se ha analizado el fenotipo de los mutantes *top1 top2 spt* y se ha observado que éste es mucho más severo que el de los mutantes simples por separado. Así, en el gineceo de los triples mutantes existe una reducción muy severa del tejido marginal

(estilo, estigma y tracto de transmisión). Estos resultados sugieren que *TOP* y *SPT* están implicados en la formación de las regiones apicales del gineceo, probablemente junto a los genes *STY* (como se discutirá más adelante).

Es importante destacar que el alelo *spt-2*, que tiene una mutación en el posible sitio de unión a DNA y que ha sido descrito como un alelo fuerte, puede estar comportándose como un alelo antimorfo en el desarrollo del carpelo, aunque en otros contextos, como por ejemplo en su papel en la germinación, sí que se comportaría como un alelo de pérdida de función (Penfield *et al.*, 2005). Por lo tanto, quedaría por analizar que ocurriría en un alelo *spt* nulo para determinar el grado de sinergia.

De manera destacable, la severidad de las alteraciones que se observan en el triple mutante *top1 top2 spt* se ponen de manifiesto en el desarrollo de los haces vasculares que discurren por el gineceo. En los mutantes *top1 top2 spt* los haces vasculares que discurren por el replum se bifurcan hacia la zona de las valvas recordando a la disposición que adoptan los haces vasculares en los sépalos, lo que se podría interpretar como una pérdida de identidad del carpelo. Esta pérdida de la identidad del carpelo, aunque algo menos severa, también se ha observado en los mutantes *sty1-1 spt-2* (Kuusk *et al.*, 2002). También en los mutantes *crc-1 spt-2* se ha observado un fenotipo similar, aunque en este caso mucho más severo (Alvarez y Smyth, 2002). Basado en estos fenotipos y en otras interacciones genéticas, *SPT* y *CRC* han sido propuestos como genes de identidad del carpelo (Alvarez y Smyth, 1999). Los fenotipos sinérgicos observados en el mutante *top 1 top2 spt-2* podrían sugerir que quizá los genes *TOP* también podrían estar involucrados en funciones similares. Apoyando esta hipótesis, resultados realizados en paralelo a esta tesis indican que el fenotipo del doble mutante *top4 crc* también es fuertemente sinérgico (Navarrete y Ferrándiz, resultados no publicados).

Asimismo, es interesante destacar que tanto *CRC* como *SPT* han sido descritos como genes de identidad del carpelo en una vía independiente de *AG*, al igual que los genes *SHP* (Alvarez y Smyth, 1999). También, en un trabajo en el que se analizaban los efectos en el transcriptoma de la inducción de *AG* (en líneas *35S::AG::GR*), los genes *CRC*, *SPT* y *SHP* han sido identificados como posibles dianas de *AG*, al igual que *TOP1* y *TOP4* (Gomez-Mena *et al.*, 2005). Sería interesante analizar la relación funcional y la jerarquía reguladora de estos genes en la especificación de la identidad del carpelo, como parte de una o varias rutas convergentes.

Hemos realizado análisis genéticos para determinar que tipo de relación genética existe entre *SPT* y los genes *TOP* y se han analizado los patrones de expresión de ambos genes en distintos fondos mutantes. El análisis de las líneas reportadoras *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en *spt-2* y en *35S::SPT* no ha revelado diferencias en el patrón de expresión, por lo que no parece que *SPT* regule directamente la expresión de



*TOP*. Así, *TOP* podría regular la expresión de *SPT* o bien no existir una regulación directa entre ellos a nivel transcripcional.

El análisis de *SPT<sub>pro</sub>::GUS* en el mutante *top1* ha revelado que *TOP* tampoco regula a *SPT* en la mayoría de los órganos, incluyendo los tejidos apicales, aunque en algunos como los óvulos en desarrollo sí. Estos resultados por una parte indican que en los dominios en los que la expresión no cambia, *TOP* podría no regular a *SPT* o hacerlo de modo redundante con otros genes. Alternativamente, la expresión ectópica de *SPT* en los óvulos de los mutantes *top1* podría ser un efecto indirecto de la mutación *top1* en el desarrollo del óvulo, aún no suficientemente explorado. En cualquier caso y durante el desarrollo de las regiones apicales, *TOP1* y *SPT* podrían estar actuando en paralelo sobre las mismas o distintas dianas.

Esto queda también reflejado en los fenotipos sinérgicos obtenidos en las líneas que sobreexpresaban tanto *TOP1* como *SPT*, en las que las plantas no llegaban a desarrollarse y los cotiledones aparecían fusionados. Es importante destacar que la sobreexpresión de *TOP1* también provoca fenotipos de cotiledones fusionados, con baja frecuencia y sin que se impida el desarrollo de las plántulas. Sin embargo, la sobreexpresión de *SPT* sola no provoca fenotipos destacables, excepto hipocotilos más largos y alteraciones en el proceso de la germinación (Penfield *et al.*, 2005) (Gremski *et al.*, 2007). Este hecho podría indicar que *SPT* puede que “necesite” a *TOP* para realizar determinadas funciones.

Actualmente en el laboratorio se está intentando conseguir plantas en las que la sobreexpresión de ambos genes sea inducible, permitiendo que se pongan de manifiesto los fenotipos en estadios de desarrollo determinados en el contexto del gineceo.

Por otra parte, se observó que algunas de las plantas de sobreexpresión de *SPT* tenían fenotipo en el fruto, probablemente debido a problemas de cosupresión (Gremski *et al.*, 2007). En concreto se encontró una planta que mostraba en la inflorescencia principal frutos con fenotipo *spt* y en las inflorescencias laterales frutos con fenotipos *top1 top2* (datos no mostrados). Este hecho sugiere que la dosis de *SPT* provoca distintos fenotipos en el carpelo y que niveles medios de *SPT* pueden provocar fenotipos en el fruto parecidos a los de pérdida de función de *TOP*.

Este efecto de dosis también se ha observado con los niveles de *TOP*. Así, la sobreexpresión de *TOP1* provoca fenotipos distintos en plantas homocigóticas y heterocigóticas para el transgén que sobreexpresa *TOP1*.

*SPT* es un factor de transcripción tipo bHLH (Heisler *et al.*, 2001). Dentro de esta familia también se encuentra el gen *IND* (Rajani y Sundaresan, 2001) y los genes *HEC* (Gremski *et al.*, 2007), aunque todos éstos son miembros atípicos de la familia bHLH. Aunque en esta tesis no ha dado tiempo, sería interesante analizar la relación de los genes *TOP* con los genes *HEC*, ya que éstos también han sido implicados en la

determinación de los tejidos marginales (Gremski *et al.*, 2007). Por otra parte, *IND* está implicado en la determinación de la zona de dehiscencia, donde quizá los genes *TOP* también tengan una función, como se explicará más adelante.

Varios resultados sugieren que la sobreexpresión de *TOP1* podría ser deletérea. Por una parte, muy pocas plantas transgénicas que sobreexpresan *TOP1* llegan a mostrar fenotipo de sobreexpresión en el fruto, mientras que sí lo muestran en la roseta. Este hecho, probablemente podría indicar que a lo largo del desarrollo de la planta se producen fenómenos de silenciamiento del transgén. Por otra parte, la eficiencia de la transformación con distintas construcciones de sobreexpresión de *TOP1* ha sido generalmente muy baja, quizá debido a problemas de germinación provocados por niveles elevados de *TOP1*.

### •Resumiendo.

Todos los resultados anteriores parecen indicar una relación funcional estrecha entre los genes *TOP*, *STY* y *SPT*. Este hecho, junto a que coinciden en diversas zonas de expresión y además no parece que unos regulen a otros, por lo menos en las regiones apicales, podría indicar la actuación de dichos genes en vías convergentes. Apoyando esta hipótesis como ya se ha discutido, se han encontrado regiones en el promotor de *YUC* que pueden ser diana de la regulación de *TOP* y *STY*.

Otra posibilidad sería que *SPT*, *STY* y *TOP* actuaran formando complejos. Sin embargo, es interesante destacar que diversos resultados (BiFC y Y2H) indican que no parece que ni *SPT* ni *STY* interaccionen físicamente con las proteínas *TOP*, por lo que quizá o no se forman complejos o si se forman complejos puede que sean necesarios factores adicionales.

Suponiendo que *TOP*, *SPT* y *STY* pueden tener funciones en los mismos procesos actuando en conjunto, y además funciones específicas, bien por separado o en combinaciones por parejas, sería interesante determinar: primero, si el complejo existe realmente y si puede estar mediado por DNA (Lara *et al.*, 2003); segundo, qué posibles genes están regulados por uno, dos o varios de los posibles miembros del complejo; tercero, conocer si los distintos miembros en conjunto pueden realizar funciones diferentes a las que realizan por separado o si incluso al estar actuando en conjunto pueden impedir funciones que cada uno de los miembros puede hacer solo. Para intentar responder a estas preguntas se podría comparar los genes que cambian o no de expresión en plantas donde se realizan distintas combinaciones de las sobreexpresiones de *TOP*, *STY* y *SPT*. Así, se podría determinar si en función de los miembros que están actuando, los genes sobre los que actúan varían o incluso si lo hacen de forma diferente. Actualmente en el laboratorio se está realizando una aproximación para intentar responder a estas cuestiones.

---

• Los factores antagonistas de los genes que dirigen la formación de los tejidos apicales: *ETT*.

Como se ha discutido hasta el momento, podría ser que *STY* y *SPT* actuaran junto a los genes *TOP* en vías probablemente convergentes. Como ya se ha descrito, los mutantes de pérdida de función de dichos genes provocan alteraciones en el gineceo similares, es decir una disminución de los tejidos de las regiones apicales. Las mutaciones en *ETT* (Sessions *et al.*, 1997) también provocan alteraciones en el eje apical-basal del fruto, pero en este caso se produce un aumento de las regiones apicales (estigma y estilo) y basales (ginóforo) y una disminución del ovario.

Por lo tanto, este fenotipo se podría considerar hasta cierto punto contrario a lo que ocurre en los mutantes *top* en los que las regiones del estilo y del estigma están disminuidas. Este hecho podría indicar que quizá *ETT* estuviera reprimiendo a los genes *TOP* y que la expresión ectópica de los mismos provocara algunas de las alteraciones observadas en *ett*. Apoyando esta hipótesis se ha observado que los fenotipos provocados por la sobreexpresión de *TOP1* recuerdan a los mutantes *ett*. Se reduce el tamaño del ovario y aparecen ginóforos alargados. Además, en ambos aparecen células estriadas ectópicas típicas del estilo (esta tesis y (Sessions *et al.*, 1997)), que podría ser consecuencia de la expresión ectópica de *TOP* o de otros genes, como *STY*, cuya sobreexpresión también provoca aparición de células del estilo ectópicas (Kuusk *et al.*, 2002).

• La expresión ectópica de *SPT* no puede ser la responsable de todas las alteraciones de *ett*.

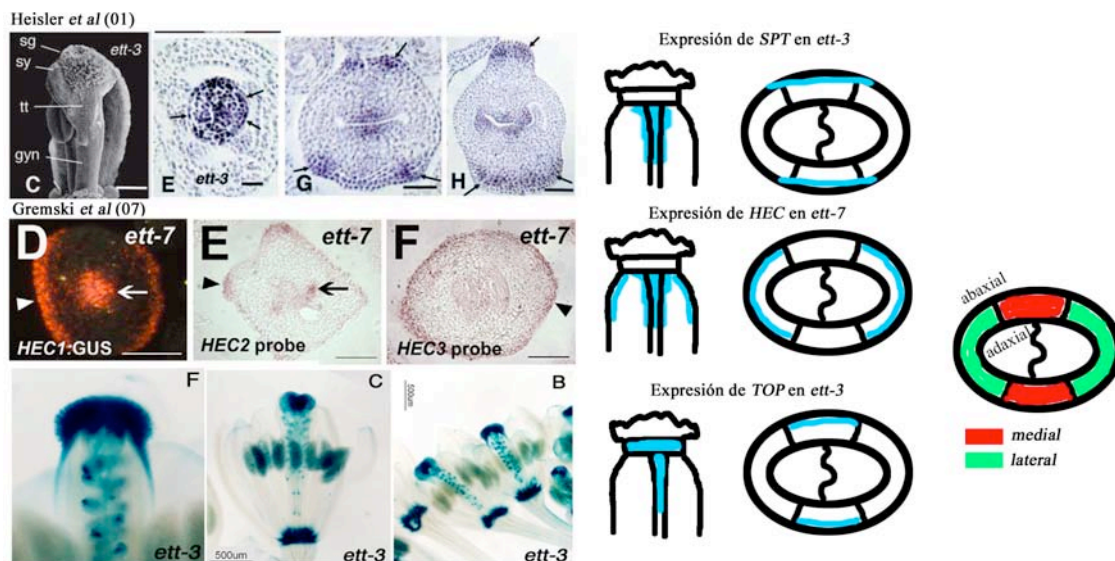
Un hecho conocido es que la expresión ectópica de *SPT* es la responsable en gran medida del fenotipo de *ett* (Heisler *et al.*, 2001). Así, el fenotipo *spt* es epistático sobre *ett* y en el doble mutante *ett spt* se rescata el tamaño del ovario de *ett*, la adaxialización observada en este mutante y el aumento de las regiones apicales (estilo y estigma). Sin embargo, en los dobles mutantes *spt ett* las regiones apicales se encuentran disminuidas como ocurre en *spt*, es decir, no se recupera el fenotipo silvestre, lo que indica que *SPT* es necesario para que los tejidos apicales se desarrollen correctamente. Es interesante destacar, como ya se ha mencionado, que la sobreexpresión de *SPT* no produce ningún fenotipo en el gineceo lo que podría indicar que necesita otros factores adicionales para realizar su función, es decir, que aunque la expresión ectópica de *SPT* parece ser necesaria, no es suficiente para que se produzca el fenotipo *ett*. Se ha propuesto que los genes *HEC* podrían ser unos de dichos factores (Gremski *et al.*, 2007), pero también pueden considerarse otros como podrían ser *TOP* y *STY*.

• Varios factores se expresan ectópicamente en los mutantes *ett*.

La expresión de *SPT* en el mutante *ett-3* ha sido analizada en (Heisler *et al.*, 2001). Así, en los mutantes *ett-3*, *SPT* se expresa ectópicamente en los tejidos laterales

(Fig. V-9 E) y abaxialmente en las proliferaciones de tejido que se producen en *ett-3* (Fig. V-9 G y H). También se ha analizado la expresión de *HEC2* y *HEC3* en el mutante *ett-7* (Gremski *et al.*, 2007) y se ha observado que ambos se expresan abaxialmente en dicho mutante, preferentemente en las regiones mediales, es decir, las valvas. Cabe destacar que no se ha analizado el fenotipo de los mutantes *ett hec*.

En esta tesis se analizó la expresión de *TOP1::GUS* en el gineceo de *ett-3* y se ha observado que: *TOP1* se expresa ectópicamente en las zonas mediales abaxiales, es decir, aparece en las regiones abaxiales del replum igual que ocurre con la expresión de *SPT* (Heisler *et al.*, 2001) y a diferencia de lo que ocurre con la expresión de *HEC* (Gremski *et al.*, 2007). La expresión de *STY* en *ett* no se ha analizado. Sin embargo, se ha observado que en los dobles mutantes *styl ett-1* se suprime parcialmente el fenotipo de *ett*, las papilas estigmáticas disminuyen en número, aunque no se recupera el tamaño del ovario, ni del ginóforo (Sohlberg *et al.*, 2006). Así, puede suponerse que la expresión ectópica de *STY* en el mutante *ett* podría ser responsable de la aparición ectópica de papilas estigmáticas. Por lo tanto, parece que *ETT* reprime o al menos restringe la expresión de *TOP*, *STY*, *SPT* y *HEC*.



**Fig. V-9: Distintos patrones de expresión en *ett*.** Patrón de expresión de *SPT* en *ett-3*. Tomado de Heisler *et al* (2001). Patrón de expresión de *HEC* en *ett-7*. Tomado de Gremski *et al* (2007). Patrón de expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* en *ett-3*. Se muestran a la derecha unos esquemas del patrón de expresión de los tres genes en el gineceo del mutante *ett* en un eje apical-basal y medio-lateral.

• *SPT*, *TOP*, *STY* podrían ser necesarios e interdependientes para el desarrollo de las regiones apicales.

En el triple mutante *top1 top2 ett-3* se rescatan las papilas estigmáticas ectópicas de *ett-3*, al igual que ocurre en *styl ett-1* (Sohlberg *et al.*, 2006) y *spt-2 ett-3* (Heisler *et al.*, 2001).

Por lo tanto, puede que tanto *TOP* como *SPT* y *STY* sean necesarios en conjunto para el desarrollo ectópico de papilas estigmáticas en el mutante *ett*. Así, al mutar cualquiera de ellos en el fondo mutante *ett* no se produce la aparición ectópica de papilas estigmáticas.



Fig. V-10: Esquema de la posible convergencia de las actividades TOP, STY y SPT en el desarrollo de las regiones apicales del gineceo de *Arabidopsis*

Más difíciles de explicar según este esquema son las interacciones observadas entre *ETT*, *SPT*, *TOP* y *STY* en el desarrollo del ovario. Mientras que el tamaño del ovario se recupera en el doble mutante *spt-2 ett-3* (Heisler *et al.*, 2001), en *sty-1 ett-1* (Sohlberg *et al.*, 2006) y en *top1 top2 ett-3* (esta tesis) es aún menor que en el mutante *ett*. La “recuperación” del tamaño del ovario también ocurre, aunque parcialmente, en el triple mutante *sty-1 spt-2 ett-1*, no obstante en este caso el ovario no se fusiona (Sohlberg *et al.*, 2006). Sería interesante analizar que es lo que ocurre en el triple mutante *top ett spt*.

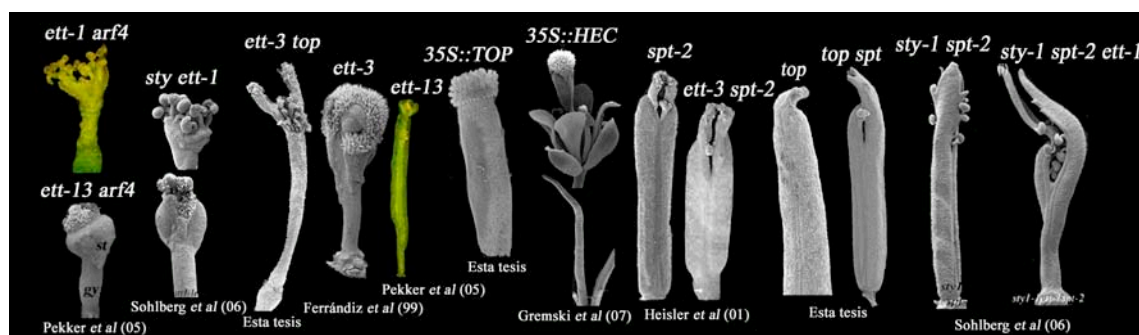


Fig. V-11: Alteraciones en el gineceo de distintos mutantes y combinaciones mutantes. Se muestra de que artículos se han obtenido las distintas fotos.

Como ya se ha mencionado, en el mutante *ett-3* (Heisler *et al.*, 2001) existe una expresión ectópica de *SPT* (Heisler *et al.*, 2001). Sin embargo, la expresión ectópica de *SPT* por si sola no provoca fenotipos *ett* reforzando la idea de que necesita otros factores adicionales para realizar su función. En cambio, la sobreexpresión de *TOP1* provoca fenotipos similares a la pérdida de función de *ETT* y ocurre algo parecido con la sobreexpresión de los genes *HEC* (Gremski *et al.*, 2007). Por otra parte, es interesante destacar que la sobreexpresión de *ETT* tampoco produce ningún fenotipo en el gineceo

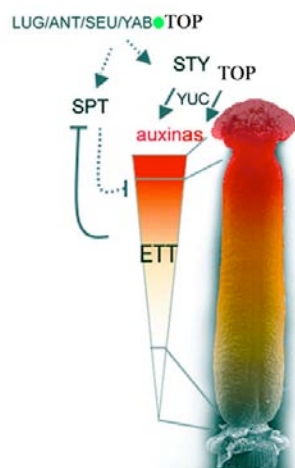
(Pekker *et al.*, 2005). Tanto *ett-1* como *ett-3*, utilizados tradicionalmente en los estudios funcionales de *ETT*, no son alelos nulos y se ha postulado recientemente que pueden estar comportándose como alelos antimorfos. Esto queda apoyado por la identificación de alelos nulos como *ett-13*, que no muestran un fenotipo tan severo como los anteriores. Además, la sobreexpresión del cDNA truncado de *ETT* produce fenotipos *ett-1* (Pekker *et al.*, 2005). Así, puede que las características de los alelos *ett-1* y *ett-3* estén dificultando el análisis de los fenotipos obtenidos por lo que sería interesante analizar los diferentes mutantes *top*, *sty* y *spt* en fondos *ett* nulos.

Asimismo, se ha descrito que *ETT* actúa de modo redundante con *ARF4* (Pekker *et al.*, 2005). De hecho, el fenotipo del doble mutante *ett-3 arf4* es muy similar al del triple mutante *top1 top2 ett-3* y al del doble mutante *sty-1 ett-1* (Sohlberg *et al.*, 2006), pudiendo indicar que *STY* o *TOP* podrían ser necesarios para la función de *ARF4*. De nuevo, sería necesario ampliar el análisis genético incluyendo mutantes *arf4* para poder aventurar hipótesis funcionales más fundadas.

Por lo tanto, con los resultados que se conocen hasta el momento, es difícil poder determinar cuál es la relación de las actividades TOP, ETT, SPT, STY, ARF4, HEC y cómo podrían todos estos genes interaccionar durante el desarrollo del gineceo. Todavía queda mucho trabajo por realizar para poder responder a esas preguntas.

Aún así, siguiendo el modelo propuesto por (Nemhauser *et al.*, 2000) en el que el desarrollo del gineceo, al menos en el eje apical-basal, podría explicarse por gradientes de auxinas, se podría intentar encajar en dicho modelo a los genes anteriores. Hay que tener en cuenta que el modelo de gradiente de auxinas no ha sido demostrado por lo tanto hay que tomar esta hipótesis con toda la cautela posible. Sin embargo, existen varios datos sugerentes que podrían de alguna forma apuntar hacia la hipótesis del gradiente de auxinas. Por ejemplo, la sobreexpresión de los genes *HEC* además de provocar fenotipos *ett* también provoca fenotipos *pin* (Gremski *et al.*, 2007) y los genes *PIN* son transportadores del flujo polar de auxinas (Benkova *et al.*, 2003). Tanto *ETT* como *ARF4* pertenecen a la familia *ARF*, factores de respuesta a auxinas (Ulmasov *et al.*, 1997). Por último, los fenotipos *spt* se suprimen mediante la inhibición química del transporte polar de auxinas que aumenta su concentración en las regiones apicales (Nemhauser *et al.*, 2000).

El gradiente podría comenzar en las regiones apicales en las que *TOP* y *STY* favorecerían la síntesis de auxinas a través de la activación de los genes *YUC*. En las regiones apicales *SPT* interpretaría ese gradiente para formar las regiones apicales y/o mediaría la transmisión del gradiente hacia regiones del ovario, probablemente junto con los *HEC* y en el ovario *ETT* y otros factores como quizá *ARF4* interpretaría la señal de las auxina para formar el ovario.



**Fig. V-12: Modelo del desarrollo del eje apical-basal del gineceo de *Arabidopsis* basado en la hipótesis del gradiente de auxinas de Nemhauser *et al* (2002).**

Modificado a partir de Balanzá *et al* (2006). Los niveles de auxinas (representadas en rojo) serían mayores en las regiones apicales, dirigiendo la formación del estilo y del estigma; los niveles intermedios promoverían el desarrollo del ovario; y los niveles bajos dirigirían la formación del ginóforo. La síntesis de auxinas en las posiciones “fuente” se encontraría bajo el control de los genes *STY/SHI* y *TOP*, mientras que la traducción de las instrucciones de las auxinas a diferenciación de tejidos podría estar mediada por la acción de *SPT* y *ETT* en sus respectivos dominios.

En el modelo de la formación de gradientes y de su interpretación para el correcto desarrollo del gineceo, hemos hablado de posibles factores adicionales a *ETT* para la interpretación de la señal de formación del ovario. Es sugerente que la sobreexpresión de *TOP* se parezca tanto a la pérdida de función de *ett* como a la pérdida de función de *ful* (Gu *et al.*, 1998). Además, la pérdida de función de *FUL* provoca fenotipos, de algún modo, similares a los de *ett* ya que provoca ginóforos más largos que el silvestre, ovarios de tamaño reducido y regiones apicales aumentadas de tamaño (Ferrándiz *et al.*, 2000). También, resultados todavía no publicados de nuestro laboratorio indican que la sobreexpresión de *FUL* rescata el tamaño del ovario en plantas *35S::FUL ett-3*, de modo similar a lo que ocurre en el doble mutante *ett spt* (Heisler *et al.*, 2001). Además, *FUL* tiene en su promotor secuencias AuxRE (Auxin Response Elementes), por lo que sería interesante analizar el papel de *FUL* en el modelo propuesto para la formación del ovario.

*ETT* es un ARF atípico ya que no tiene los dominios de interacción con los AUX/IAA para el balance de auxinas (Hagen y Guilfoyle, 2002). Este hecho puede implicar que el mecanismo de regulación de *ETT* sea distinto al de otros ARFs. Resultados paralelos a esta tesis indican que *TOP* y *ETT* interactúan físicamente (Navarrete y Ferrándiz, resultados no publicados). Sería interesante analizar cuál podría ser la implicación de esta interacción. Cabe recordar que los fenotipos de sobreexpresión de *TOP1* son similares a los fenotipos del mutante *ett*, ¿podría *TOP* interactuar con *ETT*, quizá modulando su función?, ¿la expresión ectópica de *TOP1* podría “secuestrar” a *ETT* y provocar los fenotipos *ett*?

#### 4. La implicación de los genes *TOP* en el eje medio- lateral.

No se encontraron fenotipos claros en los dobles mutantes *top* que indicaran que estos sufrían alteraciones en el eje medio-lateral aunque no se descartó que dichas



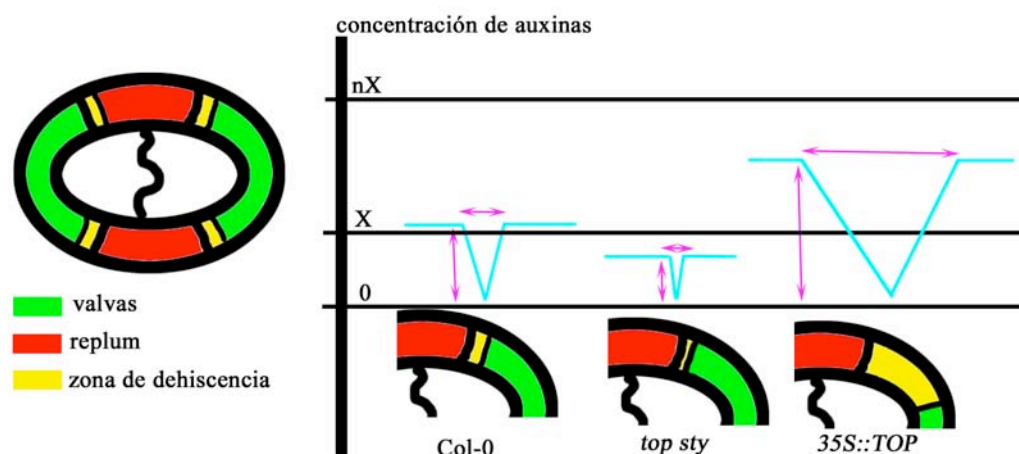
alteraciones pudieran estar enmascaradas por la redundancia funcional entre los genes *TOP*, y que por lo tanto sí pudieran observarse en mutantes cuádruples *top1 top2 top3 top4*. Por otra parte, la redundancia funcional podía ser con otras familias génicas, es decir, que los genes *TOP* junto a otros genes estuvieran involucrados en el desarrollo de dichas regiones y que sólo al mutar varios de estos genes se observaran los defectos. Apoyando esta última hipótesis, en el doble mutante *sty1 top1* se observó la aparición de un puente lignificado que unía la zona del replum a la del margen de valva de forma parecida a lo que ocurre en el mutante *alc* (Rajani y Sundaresan, 2001) y que provocaba cierta indehiscencia en los mutantes *sty1 top1*. Sería interesante analizar los patrones de lignificación en combinaciones mutantes de miembros de la familia *TOP* de mayor orden, y en combinación con miembros de la familia *STY* y comprobar si en algún caso los frutos son completamente indehiscentes.

Cabe destacar que *ALC* es un factor tipo bHLH muy similar a *SPT* (Rajani y Sundaresan, 2001) implicado en la determinación de la zona de dehiscencia. Ya que *SPT* y los genes *TOP* parecen tener una relación funcional muy estrecha sería interesante analizar la relación genética de los genes *TOP* con *ALC* en el contexto de la diferenciación de la zona de dehiscencia.

En Brassica se ha observado que poco antes de que se abran los frutos se produce una disminución de la concentración de auxinas en la zona de dehiscencia (Child *et al.*, 1998). Sorefan y Ostergaard (comunicación personal) trabajando con *Arabidopsis*, han propuesto que dicha disminución de auxinas puede estar dirigida por *IND*, puesto que el gen *iaaL* de *Pseudomonas syringae*, que codifica una enzima que inactiva el IAA conjugándolo con Lys (Romano *et al.*, 1991), bajo el control del promotor de *IND* es capaz de rescatar los fenotipos de indehiscencia en el mutante *ind*. Es probable que el fenotipo ligeramente indehiscente observado en los mutantes *top sty* esté provocado por posibles alteraciones hormonales, en concreto de las auxinas, más que porque ambos en conjunto especifiquen directamente el desarrollo de la zona de dehiscencia, aunque tampoco se puede descartar dicha hipótesis.

Parece un poco contradictorio que, si por una parte parece que es necesario que disminuyan las auxinas para que se produzca la dehiscencia (Child *et al.*, 1998), en mutantes en los que probablemente disminuyen las auxinas como *sty* (Sohlberg *et al.*, 2006) y *top* aparezcan fenotipos parcialmente indehiscentes similares a los del mutante *alc* (Rajani y Sundaresan, 2001). Quizá esta contradicción podría explicarse de dos maneras: En condiciones silvestres la concentración de auxinas en la zona de dehiscencia disminuye cuando se produce la dehiscencia formándose un posible gradiente de auxinas con el mínimo en dicha zona. En los mutantes *top sty* podría existir de partida una concentración menor de auxinas que hiciera que el gradiente fuera distinto y la zona de dehiscencia no se formara correctamente provocando el fenotipo

débil de indehiscencia observado en el doble mutante. Al contrario, la zona de dehiscencia más ancha observada en las plantas que sobreexpresan *TOP1* podría deberse a un gradiente más amplio al posiblemente existir una mayor concentración de auxinas de partida. En la figura V-13 se muestra un esquema de los posibles gradientes de auxinas que se forman en la zona de dehiscencia y un esquema de los fenotipos que se observan en la zona de dehiscencia de *Col-0*, *top1-3 sty1-1* y *35S::TOP* y como se podrían explicar dichos fenotipos en función del posible gradiente que se formaría.

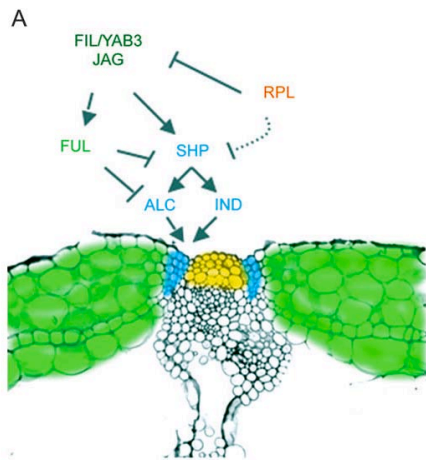


**Fig. V-13: Esquema de los posibles gradientes locales de auxinas que se podrían formar durante el proceso de dehiscencia.** En color amarillo se ha marcado la zona de dehiscencia, en verde las valvas y en rojo el replum. X: Una concentración determinada de auxinas, nX: Una concentración n veces mayor que X. Las gráficas azules indican los gradientes de auxinas en la zona de dehiscencia en el silvestre, *top1 sty1* y en *35S::TOP1*.

Otra posible explicación a la aparente contradicción que ocurre en los mutantes *top sty* sería la siguiente: la posible disminución de auxinas que ocurre cuando se produce la dehiscencia parece deberse a una relocalización de los transportadores de auxinas, en concreto *PINI* (Sorefan y Ostergaard, comunicación personal) que comienza a dirigir las auxinas hacia otras partes de la planta indicando que en la zona “sin auxinas” debe producirse la dehiscencia. Si en los mutantes *top sty* disminuye la síntesis de auxinas puede que los transportadores de auxinas no puedan responder apropiadamente, no cambien su localización polar, y no se produzca la dehiscencia correctamente. Sorefan y Ostergaard han propuesto (comunicación personal) que la relocalización de *PINI* está mediada por *IND*, que estaría reprimiendo a *PID*. Como se describe a continuación, *IND* podría estar directa o indirectamente regulado por los genes *TOP* o viceversa, y esta interacción podría explicar los fenotipos observados.

Como ya se ha descrito en el apartado de introducción el patrón en el eje medio-lateral en el fruto de *Arabidopsis* ha sido estudiado en profundidad y se conocen muchos de los genes implicados en su determinación. Sin embargo, los factores que actúan en un principio para desencadenar dicho desarrollo no se conocen todavía. En la figura V-14 se muestra un esquema de las interacciones genéticas que dirigen la

determinación de la zona de dehiscencia a partir de lo propuesto en (Dinneny *et al.*, 2005).



**Fig. V-14: (A) Modelo de las interacciones genéticas que dirigen la especificación de las valvas (verde), el margen de valva (azul) y el replum (naranja) según Dinneny *et al* (2005). Tomado de Balanzá *et al* (2006).**

A pesar de la falta de defectos en el eje medio-lateral que se observó en los mutantes de pérdida de función, en las plantas que sobreexpresan *TOP1* sí que se observaron alteraciones en el mismo, como una expansión de la zona de dehiscencia. Durante el desarrollo de esta tesis no se pudo realizar un análisis en profundidad de las interacciones de los genes *TOP* con otros implicados en el desarrollo de este eje como por ejemplo *FUL*, *SHP*, *IND* y *ALC*. Sin embargo, los resultados preliminares obtenidos podrían arrojar algo de luz acerca de dichas relaciones.

La sobreexpresión de *TOP1* recuerda a la pérdida de función de *FUL* con frutos con las valvas más pequeñas, el replum en zig-zag y la zona de dehiscencia más ancha, que en el caso de *ful* es debida principalmente a la expresión ectópica de *IND* (Liljegren *et al.*, 2004). El análisis del patrón de lignificación en las líneas de sobreexpresión de *TOP1* ha revelado una lignificación ectópica de las valvas muy parecida a lo que ocurre en el mutante *ful*. Como ya se ha explicado en el apartado de resultados existen varias posibilidades que podrían explicar este fenotipo y que se detallan en la siguiente figura.



**Fig. V-15: Esquema de las posibles interacciones genéticas de los genes *TOP* y los genes que intervienen en el establecimiento del eje medio-lateral del fruto. Posibilidad a - *TOP* podría reprimir a *FUL*. Posibilidad b - *TOP* podría activar ectópicamente a *IND* en la valva o ser necesario para la actividad de éste. Posibilidad c - *IND* podría activar a *TOP* y ser la activación ectópica de *TOP* la responsable del fenotipo de *ful*.**

En resultados preliminares se ha observado que la expresión de  $IND_{pro}::GUS$  no varía en el fondo mutante *top1-3* aunque no se puede descartar que alguno de los otros miembros de la familia *TOP* supla el papel de *TOP1* en la activación o represión de *IND*. Así, hubiera sido interesante analizar la expresión de *IND* en el cuádruple mutante *top1 top2 top3 top4*. Estos resultados parecían colocar en un principio a los genes *TOP* aguas abajo de *IND* (posibilidad c). Sin embargo, resultados recientes de nuestro laboratorio en los que se ha observado que la sobreexpresión de *TOP1* expande la expresión de  $IND_{pro}::GUS$ , colocarían a los genes *TOP* por encima de *IND* en la cascada de regulación que desarrolla el patrón en el eje medio-lateral del fruto y podría explicar la expansión de la zona de dehiscencia que se observa en plantas que sobreexpresan *TOP1*. Además de estos resultados obtenidos en nuestro laboratorio, resultados todavía sin publicar (Sorefan *et al*) muestran que la sobreexpresión de *IND* provoca fenotipos en el fruto muy parecidos a los que provoca la sobreexpresión de *TOP*.

Por lo tanto, estos resultados preliminares podrían sugerir que *TOP* podría activar a *IND* directa (posibilidad b) o indirectamente (posibilidad a). Quizá la última posibilidad sea la más probable ya que en nuestro laboratorio se ha observado recientemente que la sobreexpresión de *TOP1* reprime la expresión de *FUL* (posibilidad a en Fig. V-15). Si esta represión impide que *FUL* reprima a *IND*, éste podría expresarse ectópicamente en las líneas de sobreexpresión de *TOP* y provocar el aumento del tamaño del margen de valva en dichas líneas.

Así, la regulación de *IND* por parte de *TOP* podría explicarse por dos hipótesis que no serían excluyentes:

- La primera sería que los genes *TOP* podrían regular a *FUL* y/o a *IND* mediante gradientes de auxinas.

- La segunda sería la siguiente: los datos anteriores podrían indicar que probablemente los genes *TOP* se encuentren actuando directamente sobre *FUL*, quizá junto a otros factores y en los primeros pasos del desarrollo del patrón medio-lateral.

Apoyando la primera hipótesis, es importante recordar que *FUL* tiene en su secuencia promotora elementos de respuesta a auxinas (AuxRE), por lo que, además de la posible interacción con los genes *TOP*, podría responder directamente a niveles de auxinas dependientes de *TOP*.

Apoyando la segunda hipótesis, en el modelo ya propuesto en (Dinny *et al.*, 2005) y que se ha explicado en la introducción, se dice que niveles elevados de las actividades *FIL/YAB3/JAG* activan a *FUL*, mientras que niveles más bajos activan a los genes *SHP*. Los genes *TOP* podrían actuar reprimiendo a *FUL* o impidiendo su activación de alguna forma, quizá favoreciendo la activación de los *SHP* frente a la activación de *FUL*. La interacción física de *TOP1* y *TOP4* con *YAB3* pueden apoyar

esta hipótesis. Es importante destacar que no se sabe si realmente *FIL/YAB3/JAG* forman un complejo proteico ya que no se ha demostrado su interacción física.

Curiosamente se observó cierta sinergia de los fenotipos en los mutantes de pérdida de función de los genes *TOP* y los genes *SHP1/SHP2*. La zona del margen de valva, que ya en el doble mutante *shp1 shp2* no se desarrolla correctamente provocando la aparición de frutos indehiscentes (Liljegren *et al.*, 2000), se diferenciaba visualmente todavía menos en la región apical de los frutos de los triples mutantes *top1 shp1 shp2*. Este hecho, como ya se ha dicho, podría significar que los genes *TOP* tienen un papel en el desarrollo de la zona de dehiscencia del fruto de *Arabidopsis*.

De todas formas, hay que señalar que todos los resultados obtenidos que implican a los genes *TOP* junto a *FIL/YAB3/JAG* en el desarrollo del eje medio lateral, se han observado cuando se sobreexpresa *TOP1*, es decir, cuando *TOP1* está ectópico. En condiciones silvestres, *TOP1* no se expresa en la zona de dehiscencia ni en las valvas en el estadio en el que se va a producir la dehiscencia. Sin embargo, en estadios anteriores sí que se expresa en las valvas por lo que quizá podría dejar las “instrucciones” en dichos estadios. De todas formas, puede que las interacciones con *FIL/YAB3/JAG* sean un artefacto provocado por la expresión ectópica de *TOP1* y que en condiciones silvestres, *TOP1* lo que esté haciendo sea modular las actividades *FIL/YAB3/JAG* en la zona del estilo, impidiendo la aparición de tejido del ovario en dicha zona.

Curiosamente en los mutantes *top1 shp1 shp2* se observaron alteraciones en la filotaxis no descritas en los dobles mutantes *shp1 shp2*, que podrían ser debidas a alteraciones hormonales y que son parecidas a las observadas en el mutante *rpl* (Roeder *et al.*, 2003). Se ha propuesto que las actividades *FIL/YAB3/JAG* reprime a los genes *KNOX* (Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007). Dentro de estos genes se encuentra *BP* (también denominado *KNAT1*) que está implicado en la determinación correcta de la filotaxis formando un heterodímero con *RPL* (Kanrar *et al.*, 2006). Si *TOP* formara parte del posible complejo *FIL/YAB3/JAG*, esta relación podría explicar los problemas de filotaxia observados.

En el modelo de (Dinneny *et al.*, 2005) se propone que *RPL* reprime a *FIL/JAG/YAB3* impidiendo que activen a los genes del margen de valva, *SHP* e *IND*, que se expresan ectópicamente en el mutante *rpl*. También se ha descrito que esta represión por parte de *RPL* podría ser directa sobre los genes del margen de valva (Roeder *et al.*, 2003). Si los genes *TOP* formaran parte del posible complejo *FIL/YAB3/JAG* y modularan su actividad favoreciendo la activación de *SHP* frente a la

de *FUL* quizá el fenotipo del doble mutante *rpl top* sería distinto al de *rpl* ya que podía disminuir la expresión ectópica de los genes *SHP*. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en el tamaño del replum entre el mutante *rpl* y el doble mutante *top1 rpl*. Por lo tanto, podría ocurrir que los genes *TOP* no tengan un papel en el desarrollo del replum o que otros genes *TOP* puedan suplir la función de *TOP1* modulando la regulación de *SHP*. Sería necesario estudiar el fenotipo de combinaciones mutantes de varios genes *TOP* para ver si están afectados en el desarrollo del replum.

### **5. La implicación de los genes *TOP* en la polaridad abaxial-adaxial del gineceo.**

Aunque en esta tesis no ha dado tiempo a analizar las interacciones de los genes *TOP* con genes involucrados en la determinación de la polaridad abaxial-adaxial, varios resultados implican a los genes *TOP* en procesos de polaridad del gineceo de *Arabidopsis*. Uno de esos resultados es la interacción proteína-proteína de tanto *TOP1* como de *TOP4* con *YAB3* que está implicado en la determinación de los dominios abaxiales del gineceo (Siegfried *et al.*, 1999).

Por otra parte, los fenotipos observados en el triple mutante *top1 top2 ett* recordaban tanto a los fenotipos del doble mutante *ett arf4* como a los de los mutantes *kanadi* (Pekker *et al.*, 2005). Además, los genes *TOP*, también denominados *NGATHA*, han sido implicados en el aumento de los fenotipos *kanadi* (Alvarez *et al.*, 2006). Tanto *ETT* como *ARF4* y los genes *KAN* han sido implicados en la determinación de los dominios abaxiales del gineceo (Pekker *et al.*, 2005).

### **6. La implicación de los genes *TOP* en el desarrollo de los meristemos.**

Es importante destacar, como se ha explicado en la Introducción, que los tejidos marginales, entre ellos las regiones apicales, estilo y estigma, derivan de tejidos con actividad meristemática, las regiones mediales del primordio del gineceo. Muchos genes asociados al meristemo, como los genes de “frontera” *CUC* y los genes *KNOX*, se expresan en esas regiones, y parece que son requeridos para el desarrollo del tejido marginal (Ishida *et al.*, 2000). Además los genes *KNOX* están reprimidos por los genes *YABBY* en las regiones laterales. Teniendo en cuenta que tanto *TOP1* como *TOP4* interaccionan con *YAB3* físicamente, podría ser interesante analizar las interacciones de los genes *TOP* con los genes *CUC* y los genes *KNOX* para determinar si el fenotipo que se observa en los mutantes *top* podría ser también debido a una falta de desarrollo de las regiones meristemáticas y no sólo de los tejidos marginales en concreto. También es importante destacar la implicación de las auxinas en la represión de los genes *KNOX* en la posición de iniciación de los primordios de los órganos laterales (Reinhardt *et al.*, 2000), por lo que quizá la relación entre los genes *TOP* y los genes “meristemáticos” podría ser a través de las mismas.

### **7. Los genes *TOP* como integradores de señales en los distintos ejes a través de las auxinas.**

Aunque tradicionalmente diversos estudios sugerían un desarrollo bastante independiente por parte de la mayoría de los tejidos del gineceo (Bowman *et al.*, 1999) (Ferrándiz *et al.*, 1999), los resultados recientes parecen indicar de forma bastante clara que las conexiones funcionales son más estrechas de lo que se pensaba y que el desarrollo de los distintos tejidos en los diferentes ejes de desarrollo requiere muchos reguladores comunes que están fuertemente coordinados. Como se ha explicado en la introducción, a partir de lo que se conoce hasta el momento acerca del desarrollo del patrón de gineceo, se puede sacar una conclusión clara: las auxinas están relacionadas con las principales vías que dirigen la polaridad en todos los ejes del gineceo.

Como se ha descrito en esta tesis los genes *TOP* podrían estar estrechamente relacionados con las vías de señalización por auxinas y sus mutaciones parecen tener efecto sobre la polaridad en los tres ejes del gineceo. Estos datos podrían colocar a los genes *TOP* como posible nexo de unión entre los distintos ejes de desarrollo de *Arabidopsis* a través de las auxinas.

Por una parte, los patrones de expresión de los genes *TOP* coinciden en muchos casos con zonas descritas como zonas de concentraciones máximas de auxinas como el extremo distal de las hojas y los hidátodos, la zona más distal de las raíces principales y los primordios de las raíces laterales (Benkova *et al.*, 2003), aunque también coinciden con zonas donde se localizan los transportadores de auxinas (Michniewicz, 2007) (Swarup *et al.*, 2001). Este hecho podría implicar que los genes *TOP* tuvieran un papel bien en la síntesis de auxinas, por eso allí donde se encontraban existían niveles máximos de auxinas, o bien en el transporte de las mismas, y por lo tanto debían encontrarse allí donde se pudieran movilizar éstas, o bien podían ser factores de respuesta a auxinas, como en el caso de *ETT* (factor muy relacionado con los *TOP* como se ha ido discutiendo) (Sessions, 1997).

La expresión de *TOP1<sub>pro</sub>::GUS* no parece variar con la adición de 2-4D, una auxina sintética o en líneas *35S::YUC*, por lo que no parece que esté respondiendo a auxinas, aunque no se puede descartar que puedan responder a otras concentraciones de auxinas no probadas en nuestros experimentos. Asimismo, tampoco varía el patrón de expresión al inhibir el transporte polar de auxinas por lo que no parece estar respondiendo a cambios en los gradientes de auxinas. Sin embargo, como ya se ha mencionado, resultados recientes de nuestro laboratorio involucran a los genes *TOP* en la activación de los genes *YUC*, relacionados directamente en la síntesis de auxinas.

Tampoco se descarta, aunque no se han realizado experimentos para demostrarlo, que los genes *TOP* puedan estar involucrados en el transporte polar de las



auxinas afectando quizá de alguna forma a la relocalización de los *PIN* como ya se ha discutido en un apartado anterior.

Como ya se ha explicado en el apartado de los resultados, los efectos del NPA, un inhibidor del transporte polar de auxinas, en el gineceo de *Arabidopsis* mimetizan el fenotipo de los mutantes *ett*. Además, la aplicación de diferentes concentraciones de NPA aumenta el fenotipo de los alelos débiles de *ett* mientras que, de manera contraria, los defectos encontrados en el gineceo de *spt* se rescatan parcialmente por los tratamientos con NPA (Nemhauser *et al.*, 2000). Se ha propuesto que el patrón apical-basal del gineceo podría ser dependiente de un gradiente de auxinas (Nemhauser *et al.*, 2000). Las auxinas se sintetizarían en el extremo apical del gineceo y se transportarían hacia las zonas basales en un gradiente decreciente. De acuerdo con esta hipótesis, niveles elevados de auxinas inducirían la diferenciación del estilo y estigma, niveles intermedios el ovario, y niveles bajos el ginóforo (Nemhauser *et al.*, 2000). Los fenotipos de pérdida de función de los genes *TOP* podrían interpretarse como fenotipos provocados por un gradiente de auxinas más suave que podría explicarse por una menor síntesis apical de las mismas. Los fenotipos de ganancia de función podrían deberse a una concentración general mayor de auxinas.

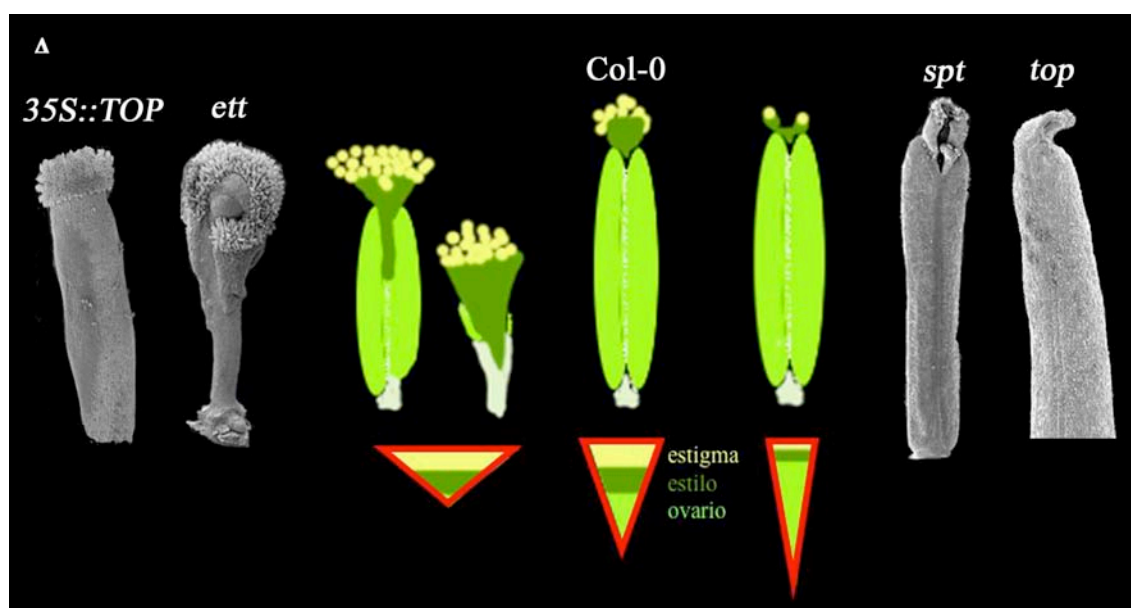


Fig. V-16: Interpretación de los fenotipos *top*, *ett*, *spt* y *35S::TOP* según el posible modelo propuesto por Nemhauser *et al* (2000) de gradientes de auxinas.

Dentro del modelo del gradiente de auxinas que se ha propuesto (Nemhauser *et al.*, 2000) y que podría dar lugar al patrón apical-basal se podría colocar a los genes *TOP* como ya se ha discutido. Así, la síntesis de auxinas dependiente de *YUCCA* se podría colocar directamente bajo el control de los genes *TOP/STY/SHI* en el extremo apical del gineceo. *SPT*, que mediaría las respuestas a elevados niveles de auxinas para

dirigir la diferenciación del estilo, estigma y tracto de transmisión y /o participar en la formación de un gradiente de auxinas regulando su transporte polar, podría hacerlo quizá junto a los genes *TOP*, los genes *HEC* y *NTT* (Crawford *et al.*, 2007). *ETT* además de la regulación espacial de tanto *SPT* como *TOP* respondería a niveles intermedios de auxinas para establecer el tamaño de la región medial en el gineceo, donde se desarrollaría el ovario.

Por otra parte, se ha observado una expresión destacada de los genes *TOP* en la zona de abscisión de los órganos florales. Se ha propuesto que las auxinas juegan un papel en la represión de la abscisión mientras que el etileno la promueve (Jinn *et al.*, 2000), por lo que sería interesante analizar si los genes *TOP* tienen algún papel en estos procesos. Nuestros resultados preliminares indican que este puede ser el caso, ya que se ha observado que en las líneas de sobreexpresión de *TOP1* la abscisión de los órganos florales se produce más tarde que en el silvestre.

### **8. Otras posibles funciones de los genes *TOP* fuera del contexto del desarrollo del gineceo.**

Como se ha ido mostrando a lo largo del capítulo de resultados, los genes *TOP* podrían tener un papel en el desarrollo de otras partes de la planta y no sólo del gineceo.

Por ejemplo, aunque ni en los mutantes simples ni en los dobles mutantes se observaron defectos en la morfología de las hojas, en el cuádruple mutante *top1 top2 top3 top4* sí que se han observado defectos en las mismas, presentando éstas una morfología aserrada (Navarrete y Ferrándiz, resultados no publicados). De acuerdo con este fenotipo, se observa la expresión de *TOP1* en el meristemo intercalar de la hoja, zona relacionada con el crecimiento y proliferación celular para que se desarrolle la lámina de la hoja (Donnelly *et al.*, 1999). Una de las funciones principales de las auxinas es la expansión y proliferación celular. Una disminución de la concentración de auxinas en los mutantes *top* podría quizá concordar con las alteraciones en las hojas.

Por otra parte, a pesar de que los genes *TOP* se expresan en la raíz, no se han encontrado fenotipos claros en las raíces de los mutantes *top* excepto alteraciones en el número y longitud de las mismas. Estos fenotipos no se han estudiado con mucho detalle ya que no era el objetivo de este trabajo. La ausencia de alteraciones claras en los tipos celulares de la raíz podría deberse bien a que los genes *TOP* no tengan funciones en identidad de los mismos o a que la redundancia funcional entre los genes *TOP* enmascare posibles alteraciones. También es posible que los posibles fenotipos sólo se pongan de manifiesto en condiciones particulares (estrés, etc.).

Al realizar el rastreo de la genoteca de doble híbrido, una de las proteínas que han interactuado tanto con *TOP1* como con *TOP4* es BRX-L4 (Mouchel *et al.*, 2004).

Como ya se ha mencionado en el apartado de resultados, *BRX-L4* pertenece a una familia compuesta por cinco miembros que comparten elevados niveles de similitud, que tienen varios dominios conservados y que han sido relacionados con funciones en el desarrollo de los haces vasculares de la raíz (Mouchel *et al.*, 2006). Las proteínas BRX muestran redundancia funcional limitada (Briggs *et al.*, 2006). Sólo *brx* tiene fenotipo en la raíz, siendo esta más corta que el silvestre. El resto de los mutantes no tienen fenotipo y además, en el cuádruple mutante *brx brx-11 brx-12 brx-13* no se aumenta el fenotipo de *brx*. Es importante mencionar que en el trabajo de (Briggs *et al.*, 2006) no se incluían alelos mutantes del gen *BRX-L4*, por lo que no se sabe si en este caso y como en la mayoría de los miembros de la familia *BRX*, tampoco se encontrarían fenotipos. Se ha propuesto que *BRX* media la retroalimentación entre los niveles de brasinoesteroides y la señal de auxinas que debe ser necesaria para el correcto crecimiento de la raíz (Mouchel *et al.*, 2006). El promotor de *BRX* contiene los sitios predichos de unión de factores de transcripción de respuesta a auxinas y brasinoesteroides (Mouchel *et al.*, 2006) y se ha observado que la expresión de *BRX* se induce por auxinas y se reprime parcialmente por brasinólido, lo que ha llevado a proponer que *BRX* actúa como nexo entre la síntesis de brasinoesteroides y la señal de auxinas manteniendo niveles umbral de brasinoesteroides para permitir la acción adecuada de las auxinas (Mouchel *et al.*, 2006).

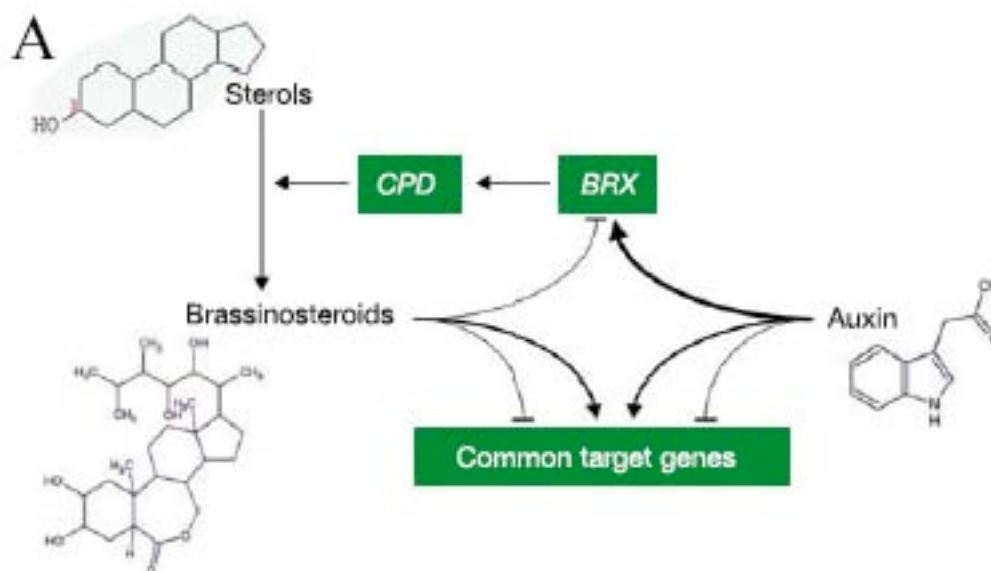


Fig. V-17: Esquema propuesto en Mouchel *et al* (2006) para la retroalimentación entre la biosíntesis de brasinoesteroides y la señal de auxinas a través de *BRX* en el crecimiento de la raíz.

Aunque no se sabe si *BRX-L4* puede realizar la misma función que *BRX*, si las proteínas TOP y *BRX-L4* pueden interactuar físicamente, es probable que esta

interacción pueda extrapolarse al resto de miembros de la familia *BRX* y quizá actuar junto a *BRX* regulando el balance entre auxinas y brasinoesteroides.

Cabe destacar que se desconoce el posible mecanismo de acción molecular de las proteínas *BRX*, ya que no tienen dominios de localización nuclear ni de unión a DNA, lo que ha sugerido que puedan funcionar como cofactores transcripcionales (Briggs *et al.*, 2006). La interacción con *TOP* podría aportar luz sobre este aspecto.

Sería interesante conocer si dicha interacción podría ocurrir en la raíz y también en otras zonas de la planta, como en el fruto, ya que los genes de la familia *BRX* se expresan en otras partes de la planta y no sólo en la raíz, aunque no se ha observado fenotipo alguno en la partes aéreas de los mutantes de pérdida de función, ni siquiera en los múltiples (Briggs *et al.*, 2006).

Por otra parte, en la secuencia de promotores de genes de respuesta a brasinoesteroides se ha encontrado el sitio de unión del dominio B3 (CACCTG) (Vert *et al.*, 2005) característico de la familia *RAV* (Hu *et al.*, 2004), a la que pertenecen los genes *TOP*, curiosamente se ha especulado que *RAVI* funciona como un regulador negativo del crecimiento y de la floración y que los brasinoesteroides promueven el crecimiento y el desarrollo regulando negativamente a *RAVI* (Hu *et al.*, 2004). Estos datos abren una puerta acerca de la posible implicación de los genes *TOP* no sólo en las vías de respuesta a auxinas, si no en las de otras hormonas como los brasinoesteroides.

Los genes *TOP* podrían actuar mediando en el balance hormonal o en las respuestas a distintas hormonas dependiendo de junto a qué otros factores estuvieran actuando. Varios trabajos han relacionado a los distintos “compañeros” de los genes *TOP* con las giberelinas (GA), por ejemplo *SHI* (miembro de la familia *STY/SHI*) ha sido propuesto como represor de las respuestas a GA (Fridborg *et al.*, 2001). También se ha propuesto que *SPT* puede actuar como represor de la expresión de la *GA3ox*, que codifica un enzima clave en la ruta de biosíntesis de las GA (Penfield *et al.*, 2005). Al contrario que para las auxinas, todavía no ha sido propuesto un papel para las giberelinas en el desarrollo del patrón del gineceo, aunque es tentador trasladar la relación antagonista entre las auxinas y las GA en el SAM al dominio medial “meristemático” del gineceo y sería interesante explorar cómo los genes *TOP*, *SPT* y *STY/SHI* podrían trabajar conjuntamente en promover las respuestas a auxinas mientras que reducen la señal de GA, y si este balance tiene un papel en la dirección del desarrollo del tejido marginal del gineceo.

## **VI. CONCLUSIONES**

---



## VI. CONCLUSIONES

**PRIMERA.** Los genes *TOP1* y *TOP2* forman junto a *TOP3* y *TOP4* una subfamilia de factores de transcripción con dominio B3 dentro de la superfamilia de factores transcripcionales B3. Las relaciones de los genes *TOP* con respecto a sus ortólogos en otras especies vegetales indican un alto grado de conservación entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, lo que muy probablemente es un reflejo de la importancia de su función.

**SEGUNDA.** La caracterización fenotípica de líneas de ganancia y de pérdida de función de los genes *TOP* ha revelado que éstos actúan de forma parcialmente redundante en el desarrollo de las regiones apicales del gineceo de *Arabidopsis*, promoviendo la diferenciación de las células del estilo y el estigma. Concordantemente el patrón de expresión espacio-temporal de *TOP1* y *TOP2* coincide con las regiones afectadas en los mutantes de pérdida de función, es decir, el estilo y el estigma. Asimismo, se ha detectado expresión de *TOP1* y *TOP2* en otras regiones del gineceo.

**TERCERA.** El análisis del patrón de expresión de los genes *TOP1* y *TOP2* sugiere que los genes *TOP* pueden tener otras funciones fuera del contexto del desarrollo del gineceo. Así, se ha detectado expresión de *TOP1* y *TOP2* en otros órganos florales, en las hojas y en las raíces, en general coincidiendo con zonas de elongación y/o aparición de nuevos órganos, y con regiones que se han relacionado con elevadas concentraciones de auxinas. Concordantemente, se han observado alteraciones en el desarrollo de dichos órganos.

**CUARTA.** Mediante análisis genético se ha observado que los genes *TOP* junto a los genes *STY* y *SPT* son necesarios e interdependientes para el desarrollo de las regiones apicales del gineceo, donde no se ha detectado una regulación directa entre ellos. *ETT* parece ejercer una función antagonista en el ovario reprimiendo la expresión de *TOP1* en el mismo, tal y como ha sido descrito en otros trabajos que sucede con la expresión de *SPT* y *STY*. Asimismo, se ha observado que los genes *TOP* actúan de forma sinérgica con *LUG* en el desarrollo de los tejidos marginales, como el estilo, el estigma y el septum.

**QUINTA.** Resultados preliminares mediante análisis genético indican que los genes *TOP1* y *TOP2* están implicados en el desarrollo del eje medio-lateral del gineceo activando directa o indirectamente al gen *IND*.

**SEXTA.** Mediante el escrutinio de una librería de doble híbrido se ha determinado que *TOP1* y *TOP4* interaccionan físicamente con *YAB3* y *BRX-L4*, dos reguladores transcripcionales implicados en el establecimiento de la polaridad abaxial-adaxial de los órganos laterales y el crecimiento de la raíz respectivamente.



### VI. CONCLUSIONS

**FIRST.** *TOP1* and *TOP2* together with *TOP3* and *TOP4* form a small subfamily within the B3 domain transcription factor superfamily. The relationship among the TOP genes and their orthologues in different plant species indicates a high conservation degree that probably reflects the importance of their function.

**SECOND.** The phenotypical characterization of *TOP* loss and gain-of-function lines has shown that they are redundantly involved in the development of *Arabidopsis* apical gynoecium tissues promoting style and stigma differentiation. Accordingly, their spatial and temporal pattern of expression overlaps with those regions defective in loss-of-function mutants, style and stigma. *TOP1* and *TOP2* expression has been also detected in other gynoecium tissues.

**THIRD.** *TOP1* and *TOP2* patterns of expression suggest that *TOP* genes could have roles outside the gynoecium developmental context. Expression has been detected in all floral organs, in leaves and roots, generally associated with positions of primordia emergence or cell proliferation and with regions which have been reported as auxin maxima. Accordingly, developmental defects in other plant tissues have been observed.

**FOURTH.** Genetic analysis has shown that *TOP* genes are with *STY* and *SPT*, necessary and interdependent for apical tissue gynoecium development likely acting at the same level, since no direct regulation has been observed among them, at least in the apical gynoecium context. *ETT* plays an antagonistic role in the ovary restricting *TOP1* expression, like it has been reported for *SPT* and *STY* expression. In addition, *TOP* genes have been shown to act synergistically with *LUG* in marginal tissue development: style, stigma and septum.

**FIFTH.** Preliminary genetic analyses indicate that *TOP1* and *TOP2* genes are involved in medial-lateral gynoecium patterning development through direct or indirect *IND* positive regulation.

**SIXTH.** In a yeast two-hybrid assay it has been determined that *TOP* genes physically interact with *YAB3* and *BRX-L4*, two transcriptional regulators with proposed roles in abaxial-adaxial polarity specification and root growth respectively.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1-1. Material vegetal.

En la tabla VII-1 se muestran las distintas líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo.

**Tabla VII-1. Genotipos, ecotipos y procedencia de las plantas de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo.**

Línea	Código	Ecotipo	Mutágeno	Referencia
<b>Líneas silvestres</b>				
Col-0	N1092	-	-	Redei, 1962
Ler	NW20	-	-	Redei, 1962
<b>Líneas mutantes</b>				
<i>ett-3</i>	Donado por P.Zambryski	Ler <i>La0</i>	EMS	Sessions y Zambryski, 1995
<i>ful-2</i>	Donado por M. Yanofsky	Col-0	EMS	Ferrándiz <i>et al.</i> , 2000 <sup>a</sup>
<i>lug-1</i>	NASC	Ler	EMS	Liu y Meyerowitz, 1995
<i>rpl-1</i>	Donado por M. Yanofsky	Ler	EMS	Roeder <i>et al.</i> , 2003
<i>seu-1</i>	NASC	Ler	EMS	Franks <i>et al.</i> , 2002
<i>shp1-1</i>	Donado por M. Yanofsky	Ler	T-DNA	Liljegren <i>et al.</i> , 2000
<i>shp2-1</i>	Donado por M. Yanofsky	Ler	T-DNA	Kempin <i>et al.</i> , 1997
<i>spt-2</i>	Donado por D. Smyth	Ler	EMS	Alvarez y Smith, 1999
<i>styl-1</i>	Donado por E. Sundberg	Col-0	Transposón <i>Ds</i>	Kuusk <i>et al.</i> , 2002
<i>sty2-1</i>	Donado por E. Sundberg	Col-0	Transposón <i>Ds</i>	Kuusk <i>et al.</i> , 2002
<i>top1-2</i>	Este trabajo	Col-0	Transposón <i>Spm</i>	AMAZE Collection Wisman <i>et al.</i> , 1998
<i>top1-3</i>	Este trabajo	Col-0	Transposón <i>Spm</i>	AMAZE Collection Wisman <i>et al.</i> , 1998
<i>top1-4</i>	Este trabajo	Col-0	T-DNA	Este trabajo
<i>top2-1</i>	Este trabajo	Col-0	Transposón <i>Spm</i>	AMAZE Collection Wisman <i>et al.</i> , 1998
<i>top2-2</i>	Este trabajo	Col-0	Transposón <i>Spm</i>	AMAZE Collection Wisman <i>et al.</i> , 1998
<b>Líneas transgénicas</b>				
<i>35S::IND</i>	Donado por M. Yanofsky	Ler	T-DNA	Liljegren <i>et al.</i> , 2004
<i>35S::SPT</i>	Donado por D. Smyth	Ler	T-DNA	Groszmann <i>et al.</i> , 2008
<i>35S::TOP1 (top1-1D)</i>	Este trabajo	Col-0	Activation tagging	Weigel <i>et al.</i> , 2000
<i>35S::TOP1 (pMT17)</i>	Este trabajo	Col-0	T-DNA	Este trabajo
<i>35S::YUCCA1</i>	Donado por Y. Zhao	Col-0	T-DNA	Cheng <i>et al.</i> , 2006
<i>IND::GUS (GT140)</i>	Donado por R. Martienssen	Ler	Transposón <i>Ds</i>	Sundaresan <i>et al.</i> , 1995
<i>SPT::GUS</i>	Donado por D. Smyth	Ler	-	6,3 Kb de promotor y 91 codones fusionados transcripcionalmente al gen GUS en el plásmido pB101

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

<i>STY1::GUS</i>	Donado por E. Sundberg	Col-0	T-DNA	Kuusik <i>et al.</i> , 2002
<i>TOP1::GUS</i> (pMT5)	Este trabajo	Col-0		Este trabajo
<i>YUCCA4::GUS</i>	Donado por Y. Zhao	Col-0	T-DNA	Cheng <i>et al.</i> , 2006
<i>SHP2::GUS</i>	Donado por M. Yanofsky	No-0	T-DNA	Savidge <i>et al.</i> , 1995

---

Las muestras de los tejidos vegetales utilizadas para la extracción de ácidos nucleicos se recogieron directamente de la planta, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización. Las muestras destinadas a estudios de microscopía se fijaron para ser procesadas posteriormente, según se indica en el apartado 4.

### 1-1-1. Condiciones de cultivo de plantas.

#### 1-1-1-1. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en macetas.

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en cámaras bajo condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura. La temperatura se mantuvo en un rango de 21 a  $23^{\circ}\text{C}$  y la iluminación procedía de tubos fluorescentes que proporcionaban luz blanca fría, con una intensidad de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$  (Sylvania standard F58W/133-T8). Habitualmente, las plantas se cultivaron bajo condiciones de fotoperiodo inductivo, que fueron de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo, DL).

Las semillas de los distintos genotipos se sembraron en macetas de plástico de 11 ó 13 cm de diámetro o en bandejas de alveolos en una mezcla de turba:perlita:vermiculita (1:1:1), previamente esterilizada a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Las macetas se colocaron en bandejas dentro de las cámaras de cultivo y se regaron por inmersión con agua destilada; una vez a la semana se regaba con solución Hoagland n°1, suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966). Tras la siembra, las bandejas se cubrieron con plástico para mantener una humedad alta durante la germinación y para evitar contaminaciones

de semillas procedentes de otras plantas próximas, y se mantuvieron en oscuridad, a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante tres días, a fin de sincronizar la germinación, antes de pasarlas a las cabinas. Cuando aparecía el primer par de hojas se agujereó el plástico en distintos puntos de la bandeja, y el número y tamaño de los agujeros se fue aumentando progresivamente hasta que, al cabo de dos o tres días se eliminó por completo el plástico.

#### 1-1-1-2. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en placas de Petri.

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* en placas de Petri, se realizó en cabinas con temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C}$ , bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h de

luz y 8 h de oscuridad). En este caso la luz fue suministrada por tubos fluorescentes de tipo GroLux 36W (Sylvania) con una intensidad de  $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ .

Las semillas se esterilizaron por inmersión, durante 5 minutos en una solución de lejía comercial al 40% (v/v) y 0.02% Tritón X-100 (v/v) con agitación, 5 minutos en etanol 70% (v/v) y, posteriormente se lavaron 5 veces con agua Mili-Q estéril, en la campana de flujo laminar, antes de la siembra.

Para la selección de transformantes primarios las semillas esterilizadas se sembraron en placas de Petri de 15 cm de diámetro (30 mg de semillas, que equivale a unas 1500, en cada placa) que contenían medio de selección con el antibiótico de resistencia [kanamicina (50mg/l) o Basta ( 15  $\mu\text{g/ml}$  )] (Pronadisa) [2.2 g/l sales MS (Duchefa), 20 g/l sacarosa, 0.1 g/l MES pH 5.9, 0.6% agar] usando agarosa al 0.1 % para extender las semillas. Las placas con las semillas se almacenaron durante tres días a 4°C en oscuridad, tras lo cual se trasladaron a una cabina de cultivo *in vitro*. Después de 7-10 días desde la siembra, los transformantes, que eran claramente identificables por su color verde y raíz elongada, se transplantaron, con ayuda de unas pinzas, desde las placas de medio de selección, a alveolos de plástico de 6.5 x 6.5 x 5 cm con turba:perlita:vermiculita, donde se cultivaron en cabinas con temperatura constante y fotoperiodo de día largo bajo las condiciones descritas en el apartado 1-1-1-1.

## **1-2. Microorganismos.**

### **1-2-1. Cepas bacterianas.**

En este trabajo se han utilizado las cepas bacterianas que se detallan en la tabla VII-2.

**Tabla VII-2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.**

<b>Cepa</b>	<b>Referencia/origen</b>	<b>Uso</b>
DH5 $\alpha$ ( <i>E. coli</i> )	Hanahan (1983)	Transformación de bacterias
HB101 ( <i>E. coli</i> ) (apartado 7-2)	Takara	Transformación de bacterias
ElectroMAX DH10B <sup>TM</sup> ( <i>E. coli</i> )	Life technologies	Transformación de bacterias
C58 pMP90 ( <i>A. tumefaciens</i> )	Koncz y Schell (1986)	Transformación de plantas

### **1-2-2. Cepas de levadura.**

En este trabajo se han utilizado las cepas de levadura cuyos genotipos se detallan en la tabla VII-11 en el apartado 7-1.

### **1-2-3. Condiciones de cultivo de microorganismos.**

Los cultivos líquidos de bacterias, *E. coli* y *A. tumefaciens* se incubaron toda la noche a 37°C y 28°C respectivamente, con agitación de 200 rpm. Los cultivos de *E. coli* y *A. tumefaciens* en placas con medio sólido se incubaron toda la noche en estufa a 37°C y de dos a tres días a 28°C, respectivamente.

Los cultivos líquidos de las distintas cepas de levadura se detallan en el apartado 7-1-5.

### 1-2-4. Medios de cultivo.

- Los medios utilizados para el crecimiento de los cultivos bacterianos fueron:

- **Medio LB (Luria-Bertani-Medium):** 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0; cuando se utilizó el medio sólido éste se solidificaba mediante la adición de 1.5% agar (Pronadisa).

- **Medio M9:** se detalla en el apartado 7-2-1

- Los medios utilizados para el crecimiento de los cultivos de levadura se detallan en el apartado 7-1-6

En la tabla VII-3 se detallan los antibióticos, los herbicidas y las concentraciones utilizadas de los mismos en este trabajo.

**Tabla VII-3. Antibióticos, herbicidas y sus concentraciones utilizadas.**

Antibiótico	Concentración
Ampicilina	60-100 µg/µl para <i>E. coli</i>
Kanamicina	25 µg/µl para <i>E. coli</i>
	50 µg/µl para <i>A. tumefaciens</i>
Rifampicina	100 µg/µl para para <i>A. tumefaciens</i>
Basta	15 µg/ml para para <i>A. thaliana</i> en placa
	0.05% para para <i>A. thaliana</i> en spray

## 2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

### 2-1 Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.

#### 2-1-1 Aislamiento DNA plasmídico.

NOTA: el aislamiento de DNA plásmidico de levadura se detalla en el apartado 7-1-7.

#### 2-1-1-1 Aislamiento de DNA plasmídico de *Escherichia coli*.

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizaron distintos métodos partiendo de un cultivo de 3 ml crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con el correspondiente antibiótico. El método de la lisis alcalina, tal como lo describen Sambrook *et al.*, (1989), el procedimiento de purificación y aislamiento de DNA plasmídico del sistema Núcleo Spin Plasmid Kit de Macherey-Nagel o el sistema Fast Plasmid Mini Kit de Eppendorf. En los dos últimos casos se siguieron las recomendaciones suministradas por las casas comerciales.

Las preparaciones de DNA plasmídico a media escala se realizaron a partir de cultivos crecidos durante una noche en 100 ml de medio líquido LB suplementado con antibiótico, según el procedimiento de extracción y purificación de DNA plasmídico del



sistema de Qiagen Plasmid Midi Kit (columnas Qiagen tip-100), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 2-1-1-2. Aislamiento de DNA plasmídico de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico de *A. tumefaciens* se utilizaron los mismos métodos que para *E. coli* (apartado 2-1-1-1).

La pureza y el rendimiento de la preparación de DNA obtenida por este procedimiento no era suficientemente alta para realizar análisis de restricción del plásmido. Para solventar este problema, una alícuota de 1 µl de esta preparación de DNA se utilizaba para transformar *E. coli*; de uno de los clones transformantes de *E. coli* obtenidos de ese modo, se hacía una nueva preparación de DNA plasmídico que se utilizaba para los análisis pertinentes.

#### **2-1-2. Aislamiento DNA genómico.**

Se han utilizado dos protocolos distintos de extracción de DNA genómico durante el desarrollo de esta tesis, el segundo produjo mejores resultados al realizar las posteriores reacciones de PCR.

2-1-2-1. Quick DNA Prep for PCR: descrito en Arabidopsis: a Laboratory Manual (Weigel D. y Glazebrook J.) pag:168-169.

Se partió de hojas de roseta (aproximadamente 1/2-3/4 del tamaño de una tapa de eppendorf) y se utilizó un protocolo de extracción consistente en homogeneizar las hojas en una solución de extracción [ 200mM Tris.Hcl, (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25mM EDTA (pH8), 0.5% SDS y agua estéril]. Posteriormente se mezcló con el vortex, tras centrifugar se pasó el sobrenadante a otro eppendorf, se precipitó el DNA con isopropanol y se hizo un lavado con etanol 70% y se resuspendió el DNA en un volumen de 100µl de agua estéril.

2-1-2-1. Método de extracción de ácidos nucleicos para genotipado por PCR de Berendzen *et al*, 2005 descrito en [Berendzen, 2005 #2139] (Plant Methods). Se partió de aproximadamente de 10 mg de material (una hoja joven pequeña o un disco del tamaño de una tapa de eppendorf) y se congeló la muestra en nitrógeno líquido. Con la ayuda de una varilla de plástico autoclavada se molió el tejido con 100 µl de la disolución de sacarosa ( se debe preparar en el momento y usar en una semana como mucho): 50mM Tris-HCl; pH7.5, 300mM NaCl, 300mM Sacarosa y agua hasta 20ml. Posteriormente se añadieron 100 µl más de esta disolución y se incubó inmediatamente a 95-100°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 8000 rpm durante 5-10 segundos. Opcionalmente, si no se iba a continuar la extracción con una PCR, se transferían 50-100 µl del sobrenadante a un tubo nuevo y se guardaban a -20°C. Si se continuaba con una PCR, se utilizaban 2 µl del sobrenadante para la reacción de PCR.

**2-2. Extracción, purificación de RNA total y síntesis de cDNA.**

Para la extracción de RNA total de plantas Col-0, *top1-3*, *top1-4*, *top2-1* y *top2-2* que posteriormente se utilizó para los experimentos de RT-PCR, se utilizó el sistema RNeasy Plant Minikit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la unión selectiva del RNA a membranas acopladas a columnas de centrifugación. Posteriormente se utilizaron 4 µg de RNA total para sintetizar el cDNA utilizando el Kit First Strand cDNA synthesis (Amersham Biosciences).

**2-3. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).**

Se utilizaron distintos tipos de PCR en función del propósito de las mismas.

**2-3-1. PCR para introducir sitios de restricción.**

Para la amplificación de secuencias específicas de DNA introduciendo sitios concretos de restricción se realizaron reacciones de PCR en las siguientes condiciones: 1-1.25 µM de cada cebador; 1.25 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; MgCl<sub>2</sub> 1.25 mM; 1 U Taq DNA polimerasa EcoTaq(Ecogen); Tampón de PCR 1X (Ecogen) y DNA molde en concentración variable. La reacción se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) , con un paso inicial de 10 minutos a 94°C seguido de 30 o 35 ciclos de 10 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura óptima de hibridación de los cebadores (52-58°C normalmente) y 2 minutos a 72°C. Como paso final se programó una elongación de 15 minutos a 72°C. En cada reacción, la temperatura de anillamiento se estimó en función de la temperatura de fusión estimada (T<sub>m</sub>) de los cebadores empleados. El tiempo de extensión empleado dependió de la longitud del fragmento a amplificar, en general se utilizó 1 minuto por Kb.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores fueron sintetizados por la empresa INVITROGEN (<http://www.invitrogen.com>) con grado de purificación máximo. En el Anexo I se recogen todos los cebadores empleados en esta Tesis.

**2-3-2. PCR para realizar genotipados.**

**2-3-2-1. Mutantes *top*.**

La tabla VII-4 recoge las condiciones de PCR utilizadas para genotipar los mutantes *top*, así como los tamaños de las bandas esperadas en gel.

**Tabla VII-4. Condiciones de PCR utilizadas para genotipar los mutantes *top*, así como los tamaños de las bandas esperadas en gel.**

Mutante	Programa de PCR	Cebadores (Anexo II-1)	Bandas en WT	Bandas en el mutante
<i>top1-2</i>	Programa TOP1 94°C 10 min 94°C 30 seg 62.5°C 45 seg 72°C 2 min 72°C 5 min 10°C infinito	SS044 En8130	SS044/En8130 No banda	SS044/En8130 1.7 Kb

<i>top1-3</i>	Programa TOP1 94°C 10 min 94°C 30 seg 62.5°C 45 seg 72°C 2 min 72°C 5 min 10°C infinito	SS044 SS043 En8130	SS044/SS043 1.5Kb SS044/En8130 No banda	SS044/SS043 2 kB SS044/En8130 1.2 Kb
<i>top1-4</i>	Programa TOP1 94°C 10 min 94°C 30 seg 62.5°C 45 seg 72°C 2 min 72°C 5 min 10°C infinito	SS044 SS043 LB3 QRB3	SS044/SS043 1.5Kb SS044/LB3 NO banda SS043/LB3 NO banda	SS044/SS043 NO banda SS044/LB3 1.2 Kb SS043/LB3 0.6 Kb
<i>top2-2</i>	Programa TOP2 94°C 10 min 94°C 30 seg 60°C 45 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 10°C infinito	SS065 SS066 En8130	SS065/SS066 1Kb SS065/En8130 No banda	SS065/SS066 No banda SS065/En8130 0.4 Kb
<i>top2-1</i>	Programa TOP2 94°C 10 min 94°C 30 seg 60°C 45 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 10°C infinito	SS066 En205	SS066/En205 No banda	SS066/En205 1.1 Kb

La reacción de PCR utilizada en el genotipado de los mutantes *top* contenía, en un volumen final de 25 µl: 1.25 µM de cada cebador; 1.25 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; MgCl<sub>2</sub> 1.25 mM; 1 U Taq DNA polimerasa EcoTaq(Ecogen); Tampón de PCR 1X (Ecogen) y DNA molde 2 µl .

Reacción tipo: Tp 10X 2.5 µl, ClMg<sub>2</sub> 2 µl, dNTPs 2 µl, DNA 2 µl, Cebador A 1 µl, Cebador B 1 µl, Taq 0.75 µl, H<sub>2</sub>O 13.75 µl.

### 2-3-2-2. Otros mutantes.

#### 2-3-2-2-1.Utilizando dCAPS.

La tabla VII-5 recoge las condiciones de PCR utilizadas para genotipar otros mutantes por dCAPS [Neff, 1998 #1218], así como los cebadores y enzimas utilizadas. Para cada uno de los distintos mutantes se diseñaron los cebadores adecuados y se optimizaron las condiciones de PCR.

**Tabla VII-5. Condiciones de PCR utilizadas para genotipar otros mutantes por dCAPS**

Mutante	Programa de PCR	Cebadores (Anexo II-1)	Enzima usado	Bandas en WT	Bandas en el mutante
<i>lug-1</i>	94°C 10 min 94°C 10 seg 50°C 15 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 10°C infinito	OMT17 OMT18 Banda de 302pb	BseLI	Corta 3 bandas 177 pb + 100 pb + 25 pb	No corta 2 bandas (porque existe otro sitio BseLI más) 277 pb + 25 pb

## MATERIALES Y MÉTODOS

<i>spt-2</i>	94°C 10 min 94°C 10 seg 50°C 15 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 10°C infinito	OMT15 OMT16 Banda de 207 pb	BseLI	Corta 2 bandas 182 pb + 25 pb	No corta 207 pb
<i>ett-3</i>	94°C 10 min 94°C 10 seg 56°C 15 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 10°C infinito	OMT13 OMT14 Banda de 181 pb	BseLI	Corta 2 bandas 157 + 24 pb	No corta 181 pb
<i>ful-2</i>	94°C 10 min 94°C 10 seg 56°C 15 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 10°C infinito	ful-2F ful-2 R banda de 291 pb	ApaI	No corta 291 pb	Corta 263 pb 28 pb

### 2-3-2-2-2. Métodos ya publicados.

La tabla VII-6 recoge las referencias utilizadas para genotipar los distintos mutantes de la tabla. En el anexo I se recogen los cebadores utilizados para genotipar los mutantes de la tabla VII-6.

**Tabla VII-6. Otras referencias utilizadas para genotipar mutantes.**

Mutante	Referencia	Mutante	Referencia
<i>styl-1</i>	[Kuusk, 2002 #1935]	<i>rpl-1</i>	[Roeder, 2003 #1776]
<i>styl-2</i>	[Kuusk, 2002 #1935]	<i>ind1-2</i>	[Liljegren, 2004 #1843]

### 2-3-3.RT-PCR.

La tabla VII-7 recoge el programa de PCR (H3), los cebadores y las bandas esperadas en gel utilizados en el experimento de RT-PCR. Ver figura de resultados donde se detalla la localización de los cebadores utilizados para RT-PCR.

NOTA: la reacción de amplificación de la tubulina se detuvo a 25 ciclos, se utilizaron los cebadores N-1136 y N-1137 que amplifican una banda de 1.3 Kb. Para *top2-1* y *top2-2* el programa fue el mismo (H3) pero la temperatura de anillamiento fue de 50°C.

**Tabla VII-7. Programa de PCR utilizado en la RT-PCR**

Mutante	Programa de PCR	Cebadores	Bandas en WT	Bandas en el mutante
<i>top1-3</i>	Programa H3 94°C 10 min 94°C 10 seg 60°C 20 seg 72°C 1 min30s 72°C 5 min 10°C infinito	OMT1 OMT2 SS079 SS080	OMT1/OMT2 1Kb SS079/SS080 534pb SS079/OMT2 1.3Kb	OMT1/OMT2 1.5 Kb SS079/SS080 534pb SS079/OMT2 1.8Kb
<i>top1-4</i>	Programa H3 94°C 10 min 94°C 10 seg 60°C 20 seg 72°C 1 min30s 72°C 5 min 10°C infinito	OMT1 OMT2 SS079 SS080	OMT1/OMT2 1Kb SS079/SS080 534pb SS079/OMT2 1.3Kb	OMT1/OMT2 No banda SS079/SS080 534pb SS079/OMT2 No banda
<i>top2-2</i>	Programa H3 94°C 10 min 94°C 10 seg 50°C 20 seg 72°C 1 min30s 72°C 5 min 10°C infinito	OMT3 OMT4	OMT3 OMT4 981pb	OMT3 OMT4 No banda
<i>top2-1</i>	Programa H3 94°C 10 min 94°C 10 seg 50°C 20 seg 72°C 1 min30seg 72°C 5 min 10°C infinito	OMT3 OMT4	OMT3 OMT4 981pb	OMT3 OMT4 981pb

## **2-4. Técnicas de clonación.**

### **2-4-1. Vectores plasmídicos utilizados.**

NOTA: todas las construcciones generadas en esta tesis se adjuntan en el anexo II.

Las clonaciones se hicieron en diferentes plásmidos en función de la procedencia de los fragmentos de DNA y de los fines requeridos (Tabla VII-8).

Los productos de PCR se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy (Promega), o en el plásmido PCR II (Dual promoter TA Cloning kit Invitrogen) que contienen un sitio de clonación específico para productos de PCR con una adenina libre en los extremos 3'. Estos vectores también, se utilizaron como paso intermedio de clonación puesto que tienen un sitio de clonaje múltiple que se utilizó para la adición de sitios de restricción. También se utilizaron para secuenciar fragmentos de PCR ya que poseen los sitios de unión de los cebadores T7 y SP6.

El sistema binario pGREEN (Hellens, 2000 ) se utilizó para la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (apartado 5). El sistema binario denominado pGREEN está formado por los plásmidos pSoup (también denominado pJIC) y pGreenII. El plásmido pSoup contiene todas las funciones *trans* necesarias para la integración del T-DNA que porta el plásmido pGreenII. Para mas información sobre el sistema pGREEN se puede consultar la página web [www.pgreen.ac.uk](http://www.pgreen.ac.uk).

Se utilizó el plásmido pGREENII para llevar a cabo la expresión constitutiva de *TOP1* (apartado 5-1) en plantas de *Arabidopsis thaliana*, también para la expresión inducible de *TOP1* y *TOP2* utilizando un plásmido pGREEN modificado (apartado 5-2) y para la expresión del gen reportador GUS bajo la dirección de la región promotora de *TOP1*( ver apartado 5-3).

**Tabla VII-8. Plásmidos utilizados en esta tesis.**

Plásmido	Características	Origen/referencia
pGEM-T Easy	Amp <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> , promotores T7 y SP6	Promega
pCRII	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> , promotores T7, M13R yM13 F	Invitrogen
pGREENII0029	Kan <sup>r</sup>	JIC
pGREEN0029 (35S:: <i>GR</i> )	Kan <sup>r</sup>	JIC modificado
pGREEN0229 (35S:: <i>GR</i> )	Basta <sup>r</sup>	JIC modificado
pGBT9	(ver apartado 7-2)	(ver apartado 7-2)
pGADT7-Rec	(ver apartado 7-2)	(ver apartado 7-2)

Amp<sup>r</sup>: Resistencia a ampicilina.

Kan<sup>r</sup>: Resistencia a kanamicina.

*lacZ*: región N-terminal del gen de la β-galactosidasa.

Se indican aquellos vectores que contienen promotores de las RNA polimerasas de los fagos T7, SP6.

Los plásmidos utilizados en el experimento de doble híbrido se detallan en el apartado 7-2.

#### **2-4-2. Digestiones del DNA con enzimas de restricción.**

Para cada enzima de restricción se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por las distintas casas comerciales. Las digestiones se llevaron a cabo en tubos de 1.5 ml con 5-10 u/μg DNA durante al menos 2 horas a la temperatura óptima para cada enzima.

### **2-4-3. Extracción de DNA en gel.**

Tras separar las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE, las bandas de interés se cortaron del gel con una cuchilla y el DNA contenido en las mismas se purificó mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La extracción y purificación de los fragmentos de DNA por este método se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva de los ácidos nucleicos en una membrana de gel de sílice, en presencia de una elevada concentración de sal. La elución del DNA se llevó a cabo en 10mM Tris-HCl pH 8.

### **2-4-4. Reacciones de ligación de DNA.**

Las reacciones de ligación se realizaron manteniendo una proporción molar entre inserto y vector de aproximadamente 3:1. La reacción de ligación contenía las cantidades de inserto y vector necesarias para obtener las proporciones molares mencionadas, el tampón de ligación (Roche) y 1 unidad de DNA ligasa del fago T4 (Roche), en un volumen total de 10  $\mu$ l. las reacciones de ligación se realizaron a 16°C o a 4°C durante 16 horas. En los casos de los plásmidos p-GEMT-easy (Promega) y PCRII (Invitrogen) se utilizaron los kits que proporciona la casa comercial y se siguieron sus recomendaciones.

### **2-5. Transformación de bacterias.**

Las cepas de *Escherichia coli* que se emplearon en las transformaciones fueron DH5 $\alpha$ , DH10B y HB101. Para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* C58 (GV3101::pMP90), y para la transformación de plantas de *Arabidopsis* con construcciones en el plásmido binario pGREEN se utilizó la cepa C58 que ya poseía el plásmido auxiliar pSOUP.

#### **2-5-1. Preparación de células competentes y transformación por electroporación.**

La preparación de células competentes para su transformación mediante electroporación se llevó a cabo según los protocolos descritos en el catálogo Pulse controller, Accessory for bacterial and fungal electro-transformation (BioRad), en el caso de *E. coli*, y según Wen-jun y Forde (1989) en el caso de *A. tumefaciens*. Tras descongelar en hielo una alícuota de 40  $\mu$ l de células competentes, se añadió de 1 a 200 ng del vector transformante. 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 eléctrico con un aparato Gene Pulser<sup>TM</sup> (BioRad). Las condiciones de electroporación fueron 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 1.8 kV, para *E. coli*, y 400  $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 1.8 kV, para *A. tumefaciens*. Después del pulso eléctrico se añadió 1 ml de LB y se incubó 1 h a 37°C y 200 rpm para *E. coli* y 3 h a 28°C y 200 rpm para *A. tumefaciens*.



### 2-6. Secuenciación de DNA.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia - CSIC), donde se utilizó un termociclador Mastercycler (Eppendorf) siguiendo las instrucciones propuestas en el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction (Abi Prism), utilizando como molde 300-500 ng de productos de PCR de menos de 700 pb y 1  $\mu$ M de cebador. Las electroforesis de los productos se realizaron en un secuenciador automático Abi Prism 377.

### 3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU*.

Se siguió el protocolo descrito por Cristina Ferrándiz y Allen Sessions en [Weigel, 2002 #1998] pag. 195- 203. Este protocolo se utilizó para analizar la expresión de *TOP1* y de *TOP2* en dos experimentos de hibridación *in situ* distintos.

#### **3.1. Generación de ribosondas marcadas con digoxigenina.**

Por una parte se amplificó mediante PCR (ver apartado 2-3-1) el cDNA del gen *TOP1* utilizando los cebadores OMT1 y OMT2 (ver Anexo I), y el producto resultante se clonó en el plásmido pGEM-T (Promega) obteniendo el plásmido *pMT1*. Por otra parte se utilizó el plásmido CFM110 que contiene 300 pb de la región 3' codificante de *TOP2* amplificada a partir del BAC F1104 con los cebadores F1104-ISHd y F1104-ISHu y clonada en el plásmido pCR II.

El plásmido pGEM-T y el pCR II poseen los promotores para las polimerasas de RNA de los bacteriófagos SP6 y T7 a cada lado del sitio de clonación múltiple, por lo que se linearizaron los plásmidos *pMT1* y *CFM110* con las enzimas apropiadas (XbaI en el caso de *pMT1* y Bam HI en el caso de *CFM110*) y se utilizó como molde de transcripción *in vitro* para generar las ribosondas antisentido (como control negativo se utilizaron las mismas sondas sobre los mutantes *top1-3* y *top2-2* respectivamente). Se usaron 2  $\mu$ g de los plásmidos cortados como molde para una reacción de 20  $\mu$ l ( de cada uno) en presencia de digoxigenina-11-dUTP de la mezcla *DIG-RNA labeling mix* (Roche Diagnostics), 40 U de inhibidor de RNasas, 20 U de la polimerasa de RNA (T7 o SP6, Roche Diagnostics) ( SP6 en el caso de *pMT1* y T7 en el caso de *CFM110*) y 2  $\mu$ l del tampón 10X correspondiente (Roche Diagnostics). La reacción tuvo lugar a 37°C durante 90 minutos.

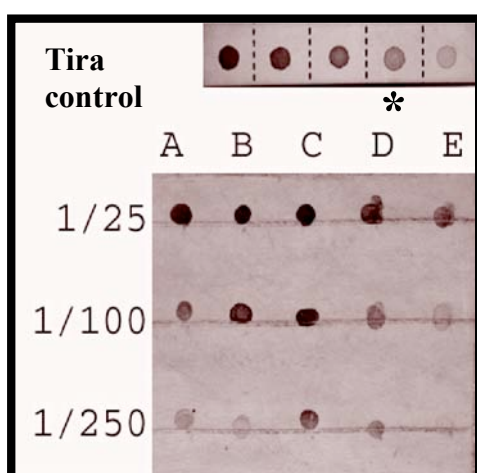
Tras la incubación se añadieron 10 U de DNasaI libre de RNasas (Roche Diagnostics) a la mezcla de reacción y se mantuvo 15 minutos a 37°C. Se precipitaron las sondas con tRNA de levadura (1  $\mu$ g/ $\mu$ l, Roche Diagnostics), acetato amónico 0,6 M y 220  $\mu$ l de etanol absoluto, y se almacenó a -20°C hasta el momento de cuantificar el

rendimiento del marcaje de las sondas. La verificación de la integridad de las sondas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa .

### **3-2. Cuantificación de las sondas.**

Se centrifugaron las sondas a 4°C y 13.000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol 70%, se dejó secar al aire y se resuspendieron en 10 µl de agua tratada con DEPC. Con 1 µl de esta disolución ( de cada una de las sondas) se prepararon las diluciones empleadas en la cuantificación (1/20, 1/250, 1/1.000 y 1/2.500). Se aplicó 1 µl de cada una de las diluciones anteriores a una membrana de nailon (*dot blot*) que, tras secarse, se irradió con luz UV. El revelado de esta membrana se realizó junto con una tira control con distintas concentraciones de RNA marcado con digoxigenina (*RNA Scripts Test*, Roche Diagnostics; Fig. VII-1). Se mojaron las tiras en TBS 1X (stock preparado a concentración 10X: Tris-HCl 1 M; NaCl 4 M; pH 7,5) durante 2 minutos, y a continuación se incubaron 10 minutos en TBS 1X con agente bloqueante 0.5% (m/v, Roche Diagnostics). Se incubaron durante 15 minutos en TBS 1X con el anticuerpo anti-DIG-ab (1/3.000, Roche Diagnostics), y se lavaron 1 minuto en tampón de detección 1X sin sustratos (stock preparado 10X: Tris-HCl 1 M; NaCl 1 M; MgCl<sub>2</sub> 0.5 M; pH 9.5). Por último, se reveló incubando con tampón de detección 1X 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 el tiempo suficiente para que se viera el último punto de la tira control.

La concentración de sonda a utilizar en cada caso fue la que más se aproximó al penúltimo punto de la tira.



**Fig. VII-1: Cuantificación simultánea de varias ribosondas (A-E). En la parte superior aparece una tira control que contiene cantidades estandarizadas de RNA marcado con digoxigenina. La concentración de sonda cuya mancha se aproxime al penúltimo punto de la tira (asterisco) es, en principio, la más adecuada.**

### **3-3. Prehibridación e hibridación.**

Se obtuvieron cortes histológicos de las muestras vegetales, Col-0, *top1-3* y *top2-2* previamente incluidas en parafina (ver apartados 4-3-1 y 4-3-3). A continuación se procedió como se describe en Ferrándiz y Sessions (2002). El tejido se desparafinó en los portas con histoclear, y a continuación se rehidrató en series de etanol a concentraciones decrecientes de 2 minutos cada una. Se llevó a cabo la hidrólisis de las proteínas mediante un tratamiento de 20 minutos en HCl 0.2 M, y posteriormente se sometió el tejido a una incubación con proteinasa K (1 µg/µl) durante 30 minutos a 37°C. Los portas se lavaron durante 2 minutos con PBS 1X (stock preparado a concentración 20X: NaCl 2.75 M; KCl 50 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35 mM; pH 7.4) y se bloqueó la acción de la proteinasa K incubando 2 minutos en 1X PBS con glicina (0.2% m/v). Tras dos lavados con PBS 1X de 2 minutos cada uno, se refijó el tejido con una solución de PBS 1X y formaldehído (3.7% v/v) a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido de dos pasos de 5 minutos con PBS 1X. Se prosiguió con la deshidratación del tejido en series crecientes de etanol de 2 minutos cada paso hasta llegar al etanol absoluto. Tras secar un poco los portas, se sometieron a vacío durante 20 minutos a una presión de 100 mb.

Para la hibridación, se precalentaron los portas con el tejido en una placa calefactora (Barnstead, BI) a 45°C durante unos minutos. Las sondas se diluyeron en tampón de hibridación [SSC 6X (stock preparado 20X: NaCl 3 M; citrato sódico 0.3 M; pH 7.0); SDS 1.5% (m/v); formamida 50% (v/v); tRNA de levadura (100 µg/ml)] hasta la concentración deseada, y se desnaturalizaron a 80°C durante unos minutos. Se aplicaron 300 µl de la solución de hibridación a cada porta con su muestra correspondiente (*pMT1* en Col-0 y *top1-3* y *CFM110* en Col-0 y *top2-2*), disponiéndose éstos enfrentados dos a dos. Gracias al sistema *Probe-On-Plus*, al enfrentar los portaobjetos en forma de sándwich con los tejidos hacia el interior, se genera un espacio donde la solución de hibridación contacta con el tejido. Los portas apareados se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche a 52°C.

### **3-4. Inmunodetección colorimétrica de la señal.**

Tras realizar dos lavados de 90 minutos en una solución de SSC 2X con formamida (50% v/v), los portas se incubaron en TBS 1X durante 5 minutos, luego 1 hora con solución bloqueante [TBS 1X y agente bloqueante 0.5% (m/v; Roche Diagnostics)], y 30 minutos en TBS 1X, Tritón X-100 (0.3% v/v) y BSA (1% m/v). A continuación, se incubaron 90 minutos en esta última solución con el anticuerpo anti-DIG-ab (dilución 1:3.000). Se realizaron tres lavados de 20 minutos cada uno con la misma solución sin anticuerpo con el fin de eliminar su exceso. Para alcalinizar el medio incubamos con el tampón de detección 1X sin sustratos (stock preparado 10X: Tris-HCl 1 M; NaCl 1 M; MgCl<sub>2</sub> 0,5 M; pH 9.5) durante 5-10 minutos. Esta solución se

reemplazó por el tampón de detección con los sustratos. Por cada 100 ml de solución de detección se añadieron 150 µl de NBT (100 mg/ml) y otros 150 µl de BCIP (50 mg/ml). Se incubó en oscuridad durante un periodo que osciló entre una noche y varios días. La reacción se detuvo reemplazando la solución de detección por agua.

En el montaje de los portas se deshidrató el tejido en series de etanol crecientes de forma rápida (2 minutos cada una), tras lo cual se añadió una gota de Eukitt (O. Kindler GmbH & Co) al portaobjetos y se dispuso el cubreobjetos. Las muestras se visualizaron como se describe en el apartado 4-2-1.

#### **4. BIOLOGÍA CELULAR/ ANÁLISIS FENOTÍPICO. TÉCNICAS DE HISTOLOGÍA VEGETAL.**

##### **4-1. Observación y fotografía a bajo aumento.**

Para obtener imágenes a bajo aumento de los distintos rasgos fenotípicos se utilizó una cámara digital CoolPix 5000 (Nikon).

Para la obtención de imágenes a mayor aumento, nos servimos de las lupas binoculares Leica modelo SMZ800 y (ver la del lab de ahora) provistas de una unidad de iluminación externa de luz blanca fría (Volpi Intralux 4000-1) y conectadas a una cámara digital CoolPix 5000 (Nikon) y también se utilizó el sistema de Nikon Digital Sight (DS-Fi1) en el que las fotos se capturan directamente en una pantalla digital acoplada a la cámara.

##### **4-2. Técnicas de microscopía.**

###### **4-2-1. Microscopía óptica.**

Los cortes histológicos y las muestras montadas en portaobjetos fueron observados y fotografiados mediante un microscopio Nikon Eclipse E-600 con iluminación de campo claro y utilizando la técnica Normasky que permite detectar cierto volumen en las muestras, acoplado a una cámara fotográfica digital Colorview-III (Nikon) y un ordenador con el software de análisis de imagen AnalySIS 3.2 (Soft Imaging System)

En el caso de la muestras aclaradas mediante hidrato de cloral, se utilizó la iluminación de campo oscuro.

###### **4-2-2. Microscopía electrónica de barrido.**

###### **4-2-2-1. Criomicroscopio.**

El uso del criomicroscopio evita la necesidad de fijar las muestras para su estudio, se utilizó en los casos en los que no era necesario diseccionar las muestras.

Se utilizó el servicio de microscopía de la Universidad Politécnica de Valencia. Microscopio JEOL, modelo JSM 5410, Instrumental de CRIOSEM CT 15000-C (Oxford Instruments).

### 4-2-2-2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) punto crítico.

Se utilizó el sistema de punto crítico en el caso de las muestras que necesitaron manipulación (eliminar sépalos, pétalos, estambres) y en los casos en los que se necesitó eliminar las ceras de la superficie celular ya que éstas no se eliminan en el criomicroscopio. Para el punto crítico las muestras necesitaron tratamiento previo.

#### 4-2-2-2-1. Preparación de muestras vegetales; fijación.

Las muestras vegetales se fijaron introduciéndolas en FAA (Etanol 50%; ácido acético glacial 5%; formaldehído 3.7%), inmediatamente después de su recolección. Posteriormente, fueron sometidas a dos o tres pulsos de vacío, de 3 min cada uno, se les cambió la solución fijadora por una fresca y se mantuvieron en ella durante 4-16 h a 4°C. Tras el proceso de fijación los tejidos se deshidrataron hasta 70% etanol mediante una serie de lavados sucesivos, de 30 min, a 4°C, en soluciones crecientes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%); en este punto las muestras pueden ser almacenadas indefinidamente a 4°C hasta el momento en que vayan a ser analizadas por microscopía electrónica de barrido.

#### 4-2-2-2-2. Punto crítico y análisis de las muestras.

Las muestras previamente fijadas y almacenadas en etanol del 70%, tal y como se explica en el apartado anterior, se incubaron en etanol del 85% durante 30 min y luego en etanol absoluto durante al menos una hora. Posteriormente, las muestras se desecaron en CO<sub>2</sub> líquido, en un aparato secador de punto crítico Polaron E300, y se montaron en portaobjetos con cinta adhesiva de carbono activado sobre los que fueron orientadas y diseccionadas convenientemente. Después del montaje, las muestras fueron recubiertas con un sombreado de partículas de oro-paladio de 200 nm, en atmósfera de argón ionizado en un Sputter Coater SCD005 (BALTEC).

Las imágenes se obtuvieron mediante el programa Autobeam de la plataforma ISIS (Oxford Instruments), con una velocidad de barrido de 200 s por imagen, en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5410 operando bajo las condiciones de microanálisis de 10 kV y distancia de trabajo de 25 mm.

### **4-3. Histología.**

#### **4-3-1. Inclusión de muestras en parafina.**

NOTA: excepto en los experimento de tinción GUS, las concentraciones del FAA utilizado como fijador son las descritas en este apartado.

Las muestras se fijaron en FAA al vacío (400 mm Hg) durante 20 minutos. Posteriormente, se cambió el fijador por otro fresco y se mantuvo a temperatura ambiente una hora. A continuación se deshidrataron en series de etanol en concentraciones crecientes (70%, y 95%) de 30 minutos cada una tiñendo finalmente el tejido en Eosina-Y al 0.2% en etanol (95%) a 4°C durante la noche. Posteriormente se incubaron las muestras en etanol 100% durante 2 horas (se repitió el proceso dos veces).

A continuación se realizaron series de 2 horas en concentraciones crecientes de HistoClear (25%, 50%, 75% y dos al 100%; National Diagnostics), compuesto básicamente de limoneno, en etanol. Se añadió entonces un volumen igual de parafina Paraplast-Plus (Sherwood Medical) fundida a 58°C y se incubó durante más de 8 horas a esa temperatura. A continuación se sustituyó la mezcla por parafina 100%, realizando cambios con parafina nueva cada 3 horas hasta la total eliminación del HistoClear. NOTA: debe evitarse que el proceso de imbibición dure más de 3 o 4 días. Por último las muestras se dispusieron en la orientación deseada en moldes de aluminio (Selecta) con parafina líquida, montando encima un soporte de plástico, y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

#### **4-3-2. Inclusión de muestras en resina.**

Para la inclusión en resina Technovit 7100 (parcialmente hidrofílica), se siguió el protocolo descrito por María D. Gómez *et al* 04. El tejido vegetal se fijó en p-formaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.2. para facilitar la penetración del fijador, se sometieron las muestras a golpes cortos de vacío (5 minutos). Posteriormente se cambió el fijador por fijador fresco, en este último se mantuvieron las muestras 16 horas a 4°C. Al día siguiente se lavaron las muestras con 0.1M de Na PO<sub>4</sub> pH 7.2 a 4°C dos tandas de 5 minutos cada una. Posteriormente se deshidrataron las muestras en series crecientes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 85% 95%) durante 30 minutos cada una a 4°C, seguidas de dos cambios de etanol 100% de 30 minutos también a 4°C. A continuación se realizó la infiltración con resina, mediante cambios de 1 a 2 horas en Resina :Etanol en distintas proporciones; 1:2, 1:1, 2:1, a continuación las muestras se dejaron en resina pura 24 horas, se realizaron varios cambios de resina pura durante este periodo. Por último se montaron las muestras en cápsulas y se polimerizó la resina a temperatura ambiente, mediante la solución de polimerización proporcionada por la casa comercial (15ml de resina + 1ml de “Hardener II”).

#### **4-3-3. Obtención de cortes histológicos.**

Se utilizó un microtomo Microm HM330 para la obtención de cortes histológicos. En el caso de muestras incluidas en resina, se realizaron cortes de 4 µm de grosor usando cuchillas especiales de Tungsteno.

Para las muestras incluidas en parafina, los cortes se realizaron a 8 µm (12 µm en el caso de los guses y 10 µm en el caso de las que se tiñeron con floroglucinol) con cuchillas Accu-Edge (Bakura) y se extendieron en un baño con agua destilada a 42°C antes de colocarlos en el portaobjetos. Las secciones se desparafinaron con HistoClear (National Diagnostics) y se visualizaron al microscopio óptico (apartado 4-2-1).

### **4-3-4. Tinciones.**

#### 4-3-4-1. Tinción con floroglucinol.

Se siguió el protocolo descrito por Sarah Liljegren en [Weigel, 2002 #1998] pág.96-97. El floroglucinol tiñe las ligninas de color rojo. Tras realizar cortes en parafina de órganos vegetales (ver apartado 4-3-3) de 12µm, los portas se sumergieron durante 30 minutos en floroglucinol (Sigma P 3502) al 2% en etanol 95%.

A continuación se aclararon en HCl al 50% y se examinaron al microscopio óptico (ver apartado 4-2-1).

#### 4-3-4-2 Tinción con azul de toluidina.

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 4-3-2 para incluir las muestras en resina y posteriormente se tiñeron con una disolución al 0.02% de azul de Toluidina disuelto en agua durante 5 minutos y después se aclararon con agua antes de ser examinadas al microscopio óptico (ver apartado 4-2-1) [Feder, 1968 #2141]. El azul de Toluidina pone de manifiesto las células que están lignificadas en color verde o azul celeste.

#### 4-3-4-3. Aclarado con Hidrato de cloral para la observación de los haces vasculares.

Se utilizó el protocolo de Sioux Christensen propuesto en [Weigel, 2002 #1998] pág.104-105. Mediante este protocolo, se aclaran los tejidos vegetales, permitiendo que se puedan observar los haces vasculares utilizando microscopía de campo oscuro.

NOTA: es importante realizar todo el proceso en una campana de extracción de gases ya que el hidrato de cloral es tóxico.

Se fijaron las muestras en una mezcla de etanol: ácido acético glacial (6:1) a temperatura ambiente de 1 a 4 horas para embriones y de 8-24 horas para plántulas y tejidos más viejos. Se reemplazó la mezcla de etanol: acético por 100% de etanol y se incubaron las muestras 30 minutos a temperatura ambiente. Este proceso se repitió dos veces. Se quitó el etanol y se reemplazó con una disolución de hidrato de cloral: Hidrato de cloral/ glicerol/ agua ( 8g/1ml/2ml), se mantuvo en esta disolución al menos una noche (mejor dos o tres). Posteriormente se montaron las muestras sobre portaobjetos. Las muestras se colocaron sobre el portaobjetos al que previamente se había añadido (normalmente un mínimo de 200 µl) disolución de hidrato de cloral. Para evitar que las muestras se aplastaran con el cubreobjetos se colocó en los extremos del portaobjetos unas pegatinas pequeñas (preferiblemente transparentes para que no destiñan con el hidrato de cloral) de forma que quedara espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos. NOTA: Antes de analizar en el microscopio las muestras, es muy importante sellar (con laca de uñas transparente, por ejemplo) los portaobjetos ya que la disolución de hidrato de cloral puede dañar las lentes del microscopio.

Microscopía de campo oscuro: para analizar las muestras en hidrato de cloral se utilizó el campo oscuro del microscopio Eclipse E600 (Nikon).



#### 4-3-4-4. Tinción GUS.

Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado distintos protocolos de Tinción GUS dependiendo del experimento que se estuviera realizando.

Para realizar detecciones GUS poco precisas en generaciones F1 y descartar en cruces las plantas que no fueran portadoras del gen delator se utilizó un protocolo GUS rápido: Se incubaron flores (normalmente) o inflorescencias posiblemente portadoras de construcciones con el gen testigo de la  $\beta$ -glucuronidasa durante la noche a 37°C en placas de 96 o 12 pocillos (Iwaki microplate) en oscuridad en una disolución 13.42mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 11.58mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2mM X-Gluc, 2mM Ferrocianuro potásico, 2mM de ferricianuro potásico y 0.02% de Tritón X-100. Posteriormente las muestras se observaron a la lupa (apartado 4-1), en algunos casos en los que la señal no se detectara con claridad, las muestras se lavaron en etanol 70%.

Para realizar detecciones GUS más precisas se siguió el protocolo descrito por Kirsten Bomblies en el Manual de Arabidopsis (Weigel D. y Glazebrook J.) pág. 243-245 con algunas modificaciones.

Los frutos e inflorescencias de plantas portadoras de construcciones con el gen testigo de la  $\beta$ -glucuronidasa se incubaron en acetona 90% durante 20 minutos en hielo. Posteriormente se incubaron otros 20 minutos en la misma acetona a temperatura ambiente. A continuación se enjuagaron con solución de revelado sin X-Gluc (tampón fosfato sódico 25 mM pH 7; ferricianuro potásico 2 mM; ferrocianuro potásico 2 mM; Tritón-X100 0,25 mM) y por último se incubaron en solución de revelado con sustrato (X-Gluc 2 mM) durante una noche a 37°C y en oscuridad.

Las concentraciones elevadas de ferrocianuro y ferricianuro (ej. 10mM) restringen el nivel de señal GUS, mientras que concentraciones más bajas permiten detectar señal GUS más débil [Sessions, 1999 #1245]. Por lo tanto, se optimizaron las concentraciones de ferrocianuro y ferricianuro en función del experimento.

En la tabla VII-9 se describe la preparación de la disolución GUS utilizada en los distintos protocolos.

NOTA: para los guses de *SPTpro::GUS* la concentración final de ferrocianuro potásico y ferricianuro potásico fue de 10 mM, para el resto de guses fue de 2mM de cada uno (condiciones menos restrictivas).

Posteriormente se realizaron series de etanol 20%, 35% y 50% 30 minutos cada una y por último se incubaron 30 minutos en FAA (50% etanol, 10% ácido acético glacial, 5% formaldehído, distinto al utilizado en la Hibridación *in situ*) y se pasaron a 70% etanol.

**Tabla VII-9. Disolución GUS**

**Disolución GUS** (Staining buffer para 10 ml, no preparar con mucha antelación)  
tampón fosfato sódico: 1.342 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , de una disolución stock 0.1M y 1.158 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  
isolución stock 0.1M.

- 200  $\mu\text{l}$  de una disolución stock 10% Tritón X-100
- 200  $\mu\text{l}$  de una disolución stock 100mM Ferrocianuro potásico (2mM concentración final)
- 200  $\mu\text{l}$  de una disolución stock 100mM de Ferricianuro potásico (2mM concentración final)
- 200  $\mu\text{l}$  de una disolución stock 100mM de X-Gluc
- añadir agua destilada hasta 10 ml.

Las muestras se observaron y fotografiaron mediante una lupa binocular equipada con una cámara digital (ver apartado 4-1) o mediante un microscopio óptico (ver apartado 4-2-1), previo aclarado del tejido con hidrato de cloral. Para el aclarado del tejido con hidrato de cloral, tras mantener las muestras al menos media hora en etanol al 70%, se pasaron a una disolución de hidrato de cloral (8g en 1 ml de glicerol y 2 ml de agua, esta disolución debe mantenerse en oscuridad para evitar amarilleamiento) donde permanecieron al menos una noche (mejor si se dejan dos o tres noches, pueden aguantar más de un mes en hidrato de cloral aunque el tejido comienza a debilitarse y al ser tan transparente es difícil su localización, sobre todo en el caso de raíces). Posteriormente se visualizaron como se describe en el apartado 4-3-4-3 pero sin utilizar el campo oscuro, en este caso las muestras se visualizaron mediante óptica Normasky.

Por otra parte, algunas muestras (inflorescencias de pMT5) se incluyeron en parafina para la obtención de cortes histológicos (12 $\mu\text{m}$ ). Se siguió el protocolo descrito para el protocolo de *in situ* (ver apartado 4-3-1) con modificaciones para evitar la pérdida del GUS:

La muestras en etanol 70% se dejaron sólo 30 minutos, posteriormente se deshidrataron en series de etanol : etanol 95% una hora y etanol 100% una hora ( este paso último se repitió dos veces). NOTA: no se añadió eosina.

Posteriormente se realizó la imbibición de las muestras:

50%Etanol/50% HistoClear durante 10 minutos tres veces.

100% HistoClear 15 minutos 3 veces.

100% HistoClear 30 minutos.

50% HistoClear/50% parafina 3 horas

100% parafina toda la noche.

El día siguiente se hicieron tres cambios de parafina, el segundo día se hicieron dos cambios de parafina por la mañana y por la tarde se montaron los bloques.

Para desparafinar: 3 minutos en HistoClear dos veces.

Se montaron con ENTELLAN.

Otras muestras de pMT5 (ejemplo: las raíces) se incluyeron en resina para la obtención de cortes histológicos, se siguió el protocolo descrito en el apartado 4-3-2.

## **5. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS Y GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.**

### **5-1. Diseño de la construcción pMT17 para la expresión constitutiva de TOP1 en *Arabidopsis thaliana*.**

Para ensayar los efectos de la expresión constitutiva de *TOP1* en plantas transgénicas, el cDNA de este gen se clonó como una fusión transcripcional al promotor 35S CaMV (Benfey *et al.*, 1990) en los sitio *Bam*HI/*Eco*RI del vector binario de expresión en plantas pGREEN0229 (Tabla VII-8). Para ello, el cDNA completo (incluyendo el STOP) de *TOP1*, amplificado a partir del plásmido pSS065 con los cebadores oMT1(*Bam*HI) y oMT21(*Eco*RI) se subclonó en el sitio *Eco*RI del plásmido pGEM-T easy (Tabla 7), que contiene un sitio de clonaje múltiple simétrico, en el cual la diana de restricción *Eco*RI está flanqueado por dos dianas *Bam*HI, obteniendo el plásmido pMT16 (ver anexo II) . Posteriormente, el cDNA fue liberado del plásmido pMT16 como un inserto *Bam*HI/*Eco*RI, para su posterior clonación en el plásmido pGREEN0229 (que liberó la secuencia GR) obteniendo el plásmido pMT17 (ver anexo II).

La construcción pMT17 fue utilizada para transformar plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 para estudiar la expresión constitutiva de *TOP1* y para transformar el doble mutante *top1-3 top2-2* y rescatar el fenotipo.

### **5-2. Diseño de las construcciones pMT2 y pMT4 para la expresión inducible de TOP1 y TOP2 en *Arabidopsis thaliana*.**

A partir del plasmado pSS065 que contiene el CDS de *TOP1* se amplificó esta región, sin incluir el codón de STOP, mediante PCR con los cebadores OMT1(*Bam*HI) y OMT2 (*Sac*I)(ver Anexo I). Posteriormente se clonó este fragmento en el plásmido pGEM-T, obteniendo la construcción pMT1 (ver anexo II). A continuación el cDNA fue liberado del plásmido pMT1 como un inserto *Bam*HI/*Sac*I, para su posterior clonación en el plásmido pGREEN0229 (que contiene la secuencia GR) obteniendo el plásmido pMT2 (ver anexo II-2).

A partir del plasmado pSS066 que contiene el CDS de *TOP2* se amplificó esta región, sin incluir el codón de STOP, mediante PCR con los cebadores OMT3(*Bam*HI) y OMT4(*Sac*I)(ver tabla). Posteriormente se clonó este fragmento en el plásmido pGEM-T, obteniendo la construcción pMT3 (ver anexo II). A continuación el cDNA fue liberado del plásmido pMT3 como un inserto *Bam*HI/*Sac*I, para su posterior clonación en el plásmido pGREEN0229 (que contiene la secuencia GR) obteniendo el plásmido pMT4 (ver anexo II) .

### **5-3. Diseño de la construcción *pMT5* para la expresión de *TOP1* en *Arabidopsis thaliana*.**

A partir del plásmido CFM 112 que contenía una fusión 5'TOP1::GUS se liberó dicho fragmento (incluye nos-t) mediante restricción HindII/EcoRI y se clonó en el plásmido pGREENII0029 (resistente a Kanamicina) obteniendo el plásmido pMT5 (ver anexo II). La región 5'TOP1 consistía en 2,7Kb de la región reguladora 5' del gen *TOP1*, que incluía el primer exón no traducido y el intrón hasta el ATG del segundo exón.

### **5-4. Transformación de *Arabidopsis thaliana*.**

Para la construcción de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se han utilizado plantas silvestres de los ecotipos *Columbia* (Col) y *Landsberg erecta* (*Ler*) y plantas mutantes *top1-3 top2-2* (ecotipo Col). La transformación se realizó siguiendo una versión modificada del método descrito por Bechtold *et al.*, (1993) que se basa en la utilización del detergente Silwet L.77 (LEHLE SEEDS; Clough y Bent, 1998).

Aproximadamente unas 60 semillas de *Arabidopsis* se cultivaron en macetas de 11 cm de diámetro, tal y como se describe en el apartado 1-1-1-1. Transcurridas unas 2 semanas desde la siembra, se eliminaron algunas plantas con el fin de facilitar el crecimiento homogéneo y adecuado de la población. Una vez las plantas habían producido el tallo, cuando la última hoja caulinar se había separado unos 2-3 cm del ápice de la inflorescencia principal (altura de las plantas de 9-11 cm), éste se decapitó para eliminar la dominancia apical e inducir así la proliferación de las inflorescencias laterales. El tiempo aproximado que transcurría desde que la siembra hasta que se decapitaban las plantas era de aproximadamente un mes para el ecotipo *Ler* y 5-6 días más para Col. Una vez decapitadas, las plantas se cultivaron unos 4 días más antes de la infiltración.

Tres días antes de la infiltración (día -3) un tubo de 50 ml con 10 ml de medio LB, con 100 µg/ml rifampicina y 50 µg/ml kanamicina, se inoculó con la cepa de *A. tumefaciens*, portadora de la construcción de interés (apartado 6-1), y se incubó durante toda la noche en oscuridad a 28°C, con agitación de 200 rpm. Al cabo de este tiempo (día -2), un matraz de 1 l con 600 ml de medio LB con kanamicina (50 µg/ml), se inoculó con los 10 ml del precultivo anterior y se incubó en las mismas condiciones durante 48 h. El día de la infiltración (día 0) el cultivo se recogió por centrifugación y el sedimento con las bacterias se resuspendió en 200 ml de medio de infiltración (2.2 g/l sales MS (Duchefa), 5% sacarosa, 1 mg/l BAP, 100 mg/l MES, pH 5.9) al que se le había adicionado detergente Silwet L.77 hasta una concentración final de 0.05%. Antes de la infiltración, a las plantas se les quitaron todas las silicuas fertilizadas así como las flores abiertas. Para la infiltración a vacío, las macetas se invertían y se introducían en una fiambrrera que contenía los 200 ml de la suspensión de *Agrobacterium* en medio de infiltración, de manera que no sólo los ápices florales sino también las hojas de roseta

quedaban sumergidos en el líquido. El montaje se colocaba en una campana de vacío conectada a una bomba de vacío (Bomba EDWARDS RV3, 110-120/220-240V, 50-60 Hz, monofásica A652-01-903) y se sometía a vacío durante 1 min en posición de alto vacío y caudal bajo “posición I” (presión total final:  $3 \times 10^{-2}$  mbar, 3 Pa). El tiempo se empezaba a contar cuando la suspensión de *Agrobacterium* empezaba a burbujear. Pasado el minuto se sacaban las plantas de la campana y se secaban ligeramente, escurriéndolas sobre un trozo de papel absorbente. Las plantas así tratadas se cubrían con bolsas de plástico y se devolvían a las cabinas de cultivo donde se les permitía que continuaran creciendo bajo las condiciones descritas en el apartado 1-1-1-1. Durante los 2-3 días siguientes a la infiltración se iban haciendo agujeros en las bolsas, con el fin de aclimatar las plantas a las condiciones de humedad habituales, hasta que éstas se eliminaban definitivamente. Las plantas se cultivaron hasta obtener semillas maduras.

Cuando las silicuas de las plantas transformadas estuvieron maduras se recogieron las semillas, se guardaron en bolsas de celofán y se incubaron en una estufa a 37°C durante al menos una semana. Para la selección de los transformantes primarios (T<sub>1</sub>), las semillas procedentes de plantas individuales T<sub>1</sub> se esterilizaron, se sembraron en placas de Petri de 15 cm de diámetro con medio de selección con kanamicina y se cultivaron en cabinas de cultivo *in vitro* (ver apartado 1-1-1-2). Después de 7-10 días desde la siembra los transformantes eran claramente identificables por su color verde y sus raíces desarrolladas; en ese momento se transplantaron a alveolos (6.5 X 6.5 x 5 cm) con una mezcla turba:vermiculita:perlita (1:1:1) y se trasladaron a un fitotrón para su cultivo bajo las condiciones descritas en el apartado 1-1-1-1.

#### **5-5. Realización de cruzamientos.**

Para la realización de cruzamientos entre diferentes líneas de *Arabidopsis*, se emascularon las flores receptoras con unas pinzas finas retirando todos los órganos florales excepto el pistilo, sobre el cual se depositó polen procedente de las plantas donantes.

### **6. TRATAMIENTOS DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS.**

#### **6-1. Tratamiento con dexametasona de las plantas PMT2 y PMT4.**

Para la selección de transformantes primarios se sembraron semillas de las plantas pMT2 y pMT4, previamente esterilizadas, en placas de MS con Kanamicina (ver apartado 1-1-1-2). Se obtuvieron 16 líneas transgénicas pMT2 y 30 líneas transgénicas pMT4.

Para comprobar si las construcciones 35S:TOP1:GR (pMT2) y 35S:TOP2:GR (pMT4) eran funcionales y para comprobar la concentración de dexametasona que era más eficaz en la inducción de las construcciones se sembraron semillas de las distintas líneas transgénicas pMT2 y pMT4 en placas MS con Kan, (apartado 1-1-1-2), para

mantener la resistencia, así como con distintas concentraciones de dexametasona: 0 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 25 $\mu$ M, y se dejaron crecer durante 21 días ( ver condiciones e el apartado 1-1-1-2). Posteriormente se compararon los fenotipos en roseta de las distintas plantas resistentes.

Para determinar el momento de aplicación de dexametasona más adecuado para inducir las construcciones se realizó el siguiente experimento. Se sembraron semillas de las distintas líneas transgénicas *pMT2* (se realizó de igual forma en el caso de *PMT4*) en placas de MS con Kan (apartado 1-1-1-2) para mantener la resistencia y se dejaron crecer. De cada una de las distintas líneas las plantas resistentes se dividieron en dos grupos:

- A: se transplantaron a tierra sin ser tratadas con dexametasona.
- B: se sumergieron en una disolución de dexametasona a 5  $\mu$ M antes de transplantarlas a tierra.

Posteriormente, dentro de la misma línea, se compararon los frutos de las plantas tratadas (grupo B) y sin tratar con dexametasona (grupo A). Por último se eligieron varias plantas del grupo A y se sumergió una de sus inflorescencias en una disolución de dexametasona 5  $\mu$ M, posteriormente se comparó el fenotipo de los frutos tratados (grupo C) con el de otros frutos de la misma planta pero de otra inflorescencia sin tratar (grupo D).

Disolución de dexametasona: Stock: 5mM (0.019 g en 10 ml de Etanol 100%)

En la tabla VII-10 se detallan las concentraciones de dexametasona utilizadas en este experimento.

**Tabla VII-10. Concentraciones de dexametasona**

Dexametasona	Concentración óptima
En placa	5 $\mu$ M
En disolución	5 $\mu$ M con 0.015% Silwet 77

### **6-2. Tratamiento con NPA y 2-4D de la línea *PMT5*.**

La línea *pMT5* (*pTOP1::GUS*) fue tratada con NPA (inhibidor del transporte polar de auxinas) y con 2,4-D (auxina sintética) en el siguiente experimento para detectar posibles cambios en el patrón de expresión del gen reportador.

Se crecieron plantas de la línea reportadora *pMT5*, se eligieron varias plantas (5) y a tres inflorescencias de la misma planta se les aplicó por una parte, a una de ellas, una disolución de 2,4-D 5 $\mu$ M con 0.01% de Silwet77, a otra de las inflorescencias una disolución de NPA 50 $\mu$ M con 0.01% de Silwet77 y a la última se le aplicó una disolución “placebo” simplemente con 0.01% de Silwet77. Posteriormente se realizó la tinción GUS (apartado 4-3-4-4 ) a dichas inflorescencias para comparar las posibles diferencias en el patrón de expresión del gen reportador.

## 7. SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO.

Se ha seguido el protocolo descrito en el manual BD Matchmaker Library Constructs and screening Kits de Clontech. Este experimento se realizó en el laboratorio de Brendan Davies (Universidad de Leeds, Reino Unido)

### 7-1. Cepas de levadura.

En este trabajo se han utilizado las cepas de levadura cuyos genotipos se detallan en la tabla VII-11.

**Tabla VII-11. Cepas de levadura utilizadas en este trabajo.**

Cepa	Genotipo <sup>a</sup>	Delator(es) <sup>b</sup>	Referencias
AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3</i> , <i>GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> , <i>MEL1</i>	<i>HIS3</i> , <i>ADE2</i> , <i>lacZ</i> (o <i>MEL1</i> )	James <i>et al.</i> , (1996); A. Holtz, no publicado
Y187	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>met-</i> , <i>MEL1</i> , <i>URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	<i>lacZ</i> , <i>MEL1</i>	Harper <i>et al.</i> , (1993);

<sup>a</sup> Las mutaciones *trp1*, *his3*, *gal4* y *gal80* son causadas por delección; *leu2-3*, *112* es una mutación doble.

<sup>b</sup> Genes marcadores que están integrados en el genoma de la levadura: *lacZ* codifica para la β-galactosidasa; *HIS3* confiere prototrofia para la Histidina (His); *MEL1* codifica para la α-galactosidasa; *ADE2* confiere prototrofia para la Adenina (Ade).

*trp1-901*: requiere triptófano (Trp) en el medio para crecer (es un Trp auxotrofo).

*leu2-3*, *112*: requiere leucina (Leu) en el medio para crecer (es un Leu auxotrofo).

*ura3-52*: requiere uracilo (Ura) en el medio para crecer (es un Ura auxotrofo).

*his3-200*: requiere histidina (His) en el medio para crecer (es un His auxotrofo).

*ade2-101*: requiere adenina (Ade) en el medio para crecer (es un Ade auxotrofo).

*gal4-542* o *gal4Δ*: deficiente en la regulación de los genes que metabolizan la galactosa (Flick y Johnston, 1990; Johnston *et al.*, 1994).

*gal80-538*: deficiente en la regulación de los genes que metabolizan la galactosa (genes GAL se expresan constitutivamente).

La cepa Y187 (*MATα*) se puede aparear con la cepa AH109 (*MATa*).

La cepa AH109 era la portadora del cDNA de la librería que ya había sido transformada en el laboratorio de Brendan Davies (Universidad de Leeds)

### 7-1-1 Fenotipos.

Para verificar los requerimientos nutricionales de las diferentes cepas empleadas se sembraba una triple estría de cada una de ellas en medio rico YPD (YPDA) y se cultivaban durante 3-5 días a 30°C. A continuación, las distintas cepas se sembraban, a partir de colonias aisladas, en placas de Petri con distintos tipos de medio mínimo de



selección (SD) a cada uno de los cuales le faltaba un determinado nutriente (Tabla VII-12).

**Tabla VII-12. Crecimiento de las distintas cepas de levadura en medios sintéticos de diferente composición.**

Cepa	SD/-Ade	SD/-Met	SD/-Ura	SD/-Trp	SD/-Leu	SD/-His	YPD(A)
AH109	-	+	+	-	-	-	+
Y187	-	-	+	-	-	-	+

### 7-1-2. Verificación del fenotipo *ade2*.

La cepa Y187 porta la mutación *ade2-101*. En un medio con baja cantidad de adenina, las colonias se vuelven rosas a los pocos días y se van oscureciendo con la edad. Estas colonias crecen hasta alcanzar un tamaño de >2 mm de diámetro. El pigmento rojo es un oxidado, derivado polimerizado del 5-aminoimidazol ribótido que se acumula en las vacuolas [Smirnov, 1967 #1999][Weisman, 1987 #2000]. Las colonias blancas y pequeñas de <1mm se forman debido a mutaciones espontáneas y se debe de evitar cogerlas. En ausencia de GAL4, AH109 también exhibe el fenotipo *ade2-101*; sin embargo, en la presencia de interacciones proteicas que activan a los genes delatores, el marcador *ADE2* complementa en cis el fenotipo *ade2-101* de AH109.

### 7-1-3. Genes delatores.

AH109 contiene cuatro genes delatores: *ADE2*, *HIS3*, *MEL1* y *lacZ* bajo es control de tres secuencias activadoras distintas (UASs) y cajas TATA. El gen delator *ADE2* por sí sólo proporciona una selección nutricional fuerte. Para mayor astringencia y para reducir la incidencia de falsos positivos, se debe seleccionar para *ADE2* y *HIS3* [James, 1996 #2001]. por otra parte se puede realizar el ensayo con *MEL1* que codifica la  $\alpha$ -galactosidasa. *MEL1* es endógeno tanto de Y187 como de AH109. Ya que la  $\alpha$ -galactosidasa es una enzima que se segrega, su actividad se puede detectar añadiendo X- $\alpha$ -Gal al medio de selección: si *MEL1* es activo y en el medio de selección existe X- $\alpha$ -Gal las colonias se volverán azules. *lacZ* en Y187 exhibe un elevado nivel de actividad  $\beta$ -galactosidasa en ensayos positivos de doble híbrido ya que está bajo el control del UAS *GALI* intacto.

### 7-1-4. Ensayo de la expresión del gen *HIS3*.

El gen delator *HIS3* presenta un nivel basal de expresión no inducible por GAL4 que varía en las distintas cepas de levadura utilizadas en este trabajo y que da lugar a un fondo de crecimiento en un medio sin histidina. Para eliminar la actividad enzimática resultante de esta expresión basal se suplementaba el medio de cultivo con diferentes

concentraciones de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), un compuesto que es un inhibidor competitivo de la actividad de la proteína de levadura HIS3 (His3p) [Durfee, 1993 #187] [Bartel, 1993 #2002].

Se escogió la concentración más baja que sólo permitía el crecimiento de colonias de un tamaño inferior a 1 mm.

#### **7-1-5. Condiciones de cultivo de levaduras.**

Los cultivos líquidos de las distintas cepas de levadura se incubaron toda la noche a 30°C y con agitación de 250 rpm. Los cultivos en placas con medio sólido se incubaron de tres a cinco días en estufa a 30°C.

#### **7-1-6. Medios de cultivo.**

Los medios utilizados para el crecimiento de los cultivos de levadura fueron:

- **YPD**, medio de crecimiento general sin selección: 2% Difco peptona, 1% extracto de levadura. Cuando se utilizó el medio sólido éste se solidificaba mediante la adición de 2% agar (Pronadisa). Se ajustaba el volumen a 950 ml y el pH a 5.8 y se autoclavaba; cuando el medio estaba a aproximadamente 55°C se añadía glucosa al 2% (50 ml de una solución stock 40%). Para el medio YPD suplementado con adenina, YPDA, se prepara el medio YPD como se indica arriba y cuando el medio estaba a 55°C se le añadía 15 ml de una solución stock de adenina al 0.2% (concentración final del 0.003%).

- **Medio SD (Synthetic dropout)**, medio mínimo usado en las transformaciones de levadura para seleccionar y testar fenotipos específicos. Incluye una base nitrogenada, una fuente de carbono, y un stock de solución “dropout” que contiene una mezcla específica de nutrientes esenciales (aminoácidos y nucleótidos). Uno o más nutrientes esenciales se omitían para seleccionar los transformantes portando el gen nutricional correspondiente. Se añadían 6.7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y 2% agar (Pronadisa, para placas). Se ajustaba el volumen a 850 ml y se autoclavaba; cuando el medio estaba a 55°C se añadía glucosa al 2% (50 ml de una solución stock al 40%), 100 ml de la solución estéril 10x dropout y 1 M de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) a una concentración que depende de la cepa de levadura.

Disolución 10x Dropout : en las disoluciones 10x dropout se omitían uno o más de los siguientes componentes nutricionales (Tabla VII-13). Los componentes específicos omitidos dependen del medio de selección deseado. Para preparar SD/-Trp/Leu, por ejemplo, se usa un suplemento de 10x Dropout sin Trp y Leu.

**Tabla VII-13. Disolución 10X Dropout**

	<u>Concentración (10x)</u>
L-Isoleucina	300 mg/l
L-Valina	1500 mg/l
L-Adenina	200 mg/l
L-Arginina HCl	200 mg/l
L-Histidina	200 mg/l
L-Leucina	1000 mg/l
L-Lisina (HCl)	300 mg/l
L-Metionina	200 mg/l
L-Fenilalanina	500 mg/l
L-Treonina	2000 mg/l
L-Triptófano	200 mg/l
L-Tirosina	300 mg/l
L-Uracilo	200 mg/l

#### **7-1-7. Aislamiento de DNA plasmídico de levadura.**

El procedimiento rápido de aislamiento de DNA plasmídico de levadura está basado en el método descrito en [Hoffman, 1987 #2003] y en [Kaiser, 1993 #2004].

Se ha usado este método para el aislamiento de los plásmidos que contienen el dominio de activación a partir de las colonias que resultaron positivas en el rastreo de la genoteca de cDNA de expresión en levaduras en ensayo de doble híbrido. Se inoculó una colonia individual portadora del plásmido “presa” en 5 ml de YPDA y se dejó crecer durante una noche a 30°C. Posteriormente 1.5 ml de este cultivo se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos y al pellet se le añadió 0.2 ml de disolución de lisis de levadura (2% tritón-X100, 1% SDS, 100mM-NaCl, 10mM Tris pH 8, 1 mM EDTA), 0.2 ml de cloroformo y 0.3 g de bolas de vidrio ácidas, se les aplicó el vórtex durante 2 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos. A continuación, se transfirieron 200 µl del sobrenadante a un tubo nuevo y se precipitaron con etanol. El DNA se resuspendió en 20 µl de Agua y se utilizó 1 µl para transformar *E. coli* por electroporación. Para realizar la precipitación se añadió: acetato sódico (1/10 V), 100% etanol (2V) se mantuvo a -20°C al menos 30 minutos, posteriormente se centrifugó durante 10 minutos y se quitó el sobrenadante, luego se añadió 70% etanol (2V) y se centrifugó durante 10 minutos, se quitó el sobrenadante y se dejó secar al aire para posteriormente resuspender el precipitado en 20 µl de agua.

A menudo, el DNA plasmídico aislado de la levadura por este procedimiento está contaminado por DNA genómico y por ello no es adecuado para análisis por restricción o para secuenciación aunque sí puede ser usado en análisis por PCR. El

DNA aislado de cada colonia positiva de levadura es una mezcla del plásmido DNA-BD/cebo y al menos un tipo de plásmido AD/genoteca, para seleccionar los transformantes con el plásmido de la genoteca fusionada al dominio de activación se utilizó 1  $\mu$ l del DNA aislado de la levadura para transformar células de *E.coli*. Posteriormente se realizaba una preparación del plásmido que sí era adecuada para análisis por restricción o para secuenciación. Como pGBT9 tenía resistencia a Ampicilina al igual que el plásmido que contenía la librería, la cepa de *E coli* que se eligió fue HB101 (ver apartado 7-3) y la selección se llevó a cabo en placas de medio M9 sin leucina.

#### **7-1-8. Métodos de transformación de levaduras.**

Para la transformación de levaduras se ha utilizado el método del acetato de litio (AcLi) [Ito, 1983 #2005] con las modificaciones de [Hill, 1991 #2006], [Gietz, 1992 #2007] y [Schiestl, 1989 #2008]. Para las transformaciones de levaduras con los plásmidos cebo se ha utilizado un protocolo rápido de transformación. Para el rastreo de la genoteca de cDNA se ha utilizado un protocolo de “mating”, basado en el intercambio horizontal de DNA existente entre levaduras.

##### 7-1-8-1. Protocolo rápido: Simple Yeast Transformation.

El protocolo rápido de transformación se ha utilizado para testar las concentraciones de 3-AT necesarias para el ensayo de doble híbrido, verificar que las proteínas de fusión DNA-BD/proteína X no activan de manera autónoma los genes delatores (transformación de la cepa AH109 con las construcciones cebo) y como paso previo del rastreo de la genoteca de cDNA (transformación de la cepa Y187 con las construcciones cebo).

Se resuspendieron las células en 1 ml de agua destilada, se centrifugaron durante 15 segundos, posteriormente se resuspendieron en 1 ml de 0.1M LiAc y se separaron en alícuotas que representaban 25  $\mu$ l de células (para cada transformación), a continuación se incubaron a 30°C con agitación durante 5 minutos, posteriormente se centrifugaron 15 segundos y al precipitado se le añadió en orden: 240  $\mu$ l de 50% PEG, 36  $\mu$ l de 1M LiAc, 50  $\mu$ l ssDNA (2mg/ml) (debe hervirse a 100°C durante 5 minutos cuando se vaya a utilizar, sirve para 3 o 4 veces sin necesidad de hervirlo de nuevo), 5  $\mu$ l de plásmido y 20  $\mu$ l de agua destilada. Se aplicó el vórtex durante 1 minuto y se incubó a 42°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 1 minuto y se resuspendió el precipitado en 100  $\mu$ l de agua. Los 100  $\mu$ l se plaquearon en las placas apropiadas y se incubó a 30°C de 3 a 5 días, hasta que las colonias se vieran.

##### 7-1-8-2. Transformación de levaduras mediante “Mating”.

- El protocolo de transformación mediante “mating” se ha utilizado para:
- Rastreo de la librería de cDNA mediante ensayo de doble híbrido.

Básicamente el protocolo de “mating” de levadura se realiza de la siguiente manera: se inoculan 50 ml de medio SD/-Trp/Kan con una colonia individual de la levadura (Y187) transformada con la construcción cebo. Se deja crecer el cultivo en un matraz de 250 ml (para que exista suficiente aireación) durante toda la noche a 30°C con agitación. Se comprueba si existe toxicidad provocada por la construcción sobre la levadura, para ello se mide la DO<sub>600</sub> tras 16-24 horas de crecimiento, si ésta es menor de 0.8 existe toxicidad y por lo tanto no se podría realizar el ensayo, si es mayor de 0.8 se continua el protocolo. Se centrifuga la suspensión celular a 600g durante 5 min, se descarta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 5 ml de SD/-Trp. Mientras tanto se coloca una alícuota (1ml) de la cepa de AH109 portadora de la librería en un baño a temperatura ambiente, posteriormente se combinan los 5 ml de las levaduras que contienen el plásmido cebo con el ml de las levaduras que contienen la genoteca, en un matraz estéril de 2 litros de capacidad y se añade 45 ml de YPDA 2X/Kan (NOTA recoger todas las células que contienen la genoteca con dos lavados de 2X YPDA). Posteriormente se incuban a 30°C durante 20-24 horas con movimiento suave (30-50 rpm) para que no precipiten las células. Tras 20 horas del “mating” se transfiere el cultivo a un bote de centrífuga de 100 ml y se centrifuga durante 10 minutos a 1000g. Mientras tanto se lava el matraz del “mating” 2 veces con 50 ml de 0.5 X YPDA/Kan para resuspender las células que queden todavía en el matraz y se combinan las dos resuspensiones para resuspender de nuevo el precipitado celular anterior. Se centrifuga durante 10 minutos a 1000 g y se resuspende el precipitado en 10 ml de 0.5 X YPDA/Kan.

#### 7-1-9. Selección de recombinantes de levadura y eficiencia del “Mating”.

Para la selección de los transformantes de levadura resultantes de la transformación mediante “mating” se sembraron 100 µl de distintas diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) de la suspensión de células transformadas en el apartado anterior (7-1-8-2), en placas de 9 cm de diámetro de medio sólido SD/-Trp (para calcular viabilidad de la cepa AH109 portadora de la librería), SD/-Leu (para calcular viabilidad de la cepa Y187 portadora de las proteínas cebo) y SD/-Trp-Leu ( para calcular viabilidad de ambas) y se incubaron en una estufa a 30°C. El resto de la suspensión celular se sembró en alícuotas de 200 µl en placas de 12 x 12 cm de diámetro de medio sólido de selección con la concentración correspondiente de 3-AT y se incubaron en una estufa a 30°C hasta que aparecieron colonias (se dejó un máximo de 8 días).

La eficiencia del “ mating” o porcentaje de diploides se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{eficiencia del "mating"} = \frac{\text{cfu viables /ml diploides}}{\text{cfu viables /ml cepa limitante}} \times 100$$

para calcular las cfu viables de cada tipo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{cfu} \times v1}{v2 \times \text{factor de dilución}} = \text{cfu viables / ml}$$

donde:

**cfu:** colonias (colony forming units) crecidas en la placa de dilución que tiene entre 30-300 cfu.

**v1:** volumen total de la suspensión celular (ml) (ver apartado 5-1-2.).

**v2:** volumen de la suspensión celular sembrado en la caja (ml) (ver apartado 5-1-2.)

La cepa limitante sería la que contiene la librería, en este caso AH109.

El número de clones rastreados se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{cfu/ml diploides} \times v2 = n^\circ \text{ de clones rastreados}$$

Las colonias que aparecieron en las placas grandes se pasaron de nuevo a medio sólido más restrictivo para confirmar las interacciones fuertes.

El rescate de los plásmidos de la librería, desde las colonias positivas, se llevó a cabo aislando el DNA plasmídico de la correspondiente levadura (apartado 7-1-7) y usando esa preparación de DNA para transformar la cepa HB101 de *E. coli*. por electroporación (apartado 2-5-1).

## **7-2 Plásmidos.**

En la tabla VII-14 se detallan los plásmidos utilizados en este trabajo.

**Tabla VII-14. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

<b>Plásmido</b>	<b>Características</b>	<b>Origen/referencia</b>
pGBT9	Amp <sup>r</sup> , GAL 4 <sub>(1-147)</sub> DNA-BD, <i>TRP1</i>	Bartel <i>et al.</i> , (1993a); Sistema: GAL4 2H; (# U07646) CLONTECH
pGADT7-Rec	Amp <sup>r</sup> , <i>LEU2</i> , GAL 4 <sub>(768-881 y 1561-1889)</sub> DNA-AD, HA epitopo tag, SVA40 NLS, promotor T7	Chien <i>et al.</i> , (1991) Sistema: GAL4 2H-3; (# K1612-1) CLONTECH

Amp<sup>r</sup>: Resistencia a ampicilina.

Se indican aquellos vectores que contienen promotores de las RNA polimerasas de los fagos T7, SP6.

GAL4 2H-2 y GAL4 2H-3: MATCHMAKER Two-hybrid system 2 y 3, respectivamente (CLONTECH). *TRP1* y *LEU*: marcador nutricional para selección en levadura.

GAL4 DNA-BD: dominio de unión a DNA del activador transcripcional de levadura GAL4.

GAL4 DNA-AD: dominio de activación del activador transcripcional de levadura GAL4.

P<sub>T7</sub>: promotor para transcripción y traducción *in vitro* de la fusión proteica; también para secuenciar

HA: epitopo tag de la hemaglutinina, para la inmunoprecipitación de las fusiones proteicas.

NLS SV40 T-antigen: señal de localización nuclear del antígeno T del virus SV40.

Para los experimentos de doble híbrido se utilizaron los siguientes plásmidos: El plásmido pGBT9 se utilizó para generar fusiones de una proteína al dominio de unión a DNA del activador transcripcional GAL4 (DNA-BD); esta construcción híbrida se utilizó como cebo en el rastreo de una genoteca de cDNA (de ápices florales de *Arabidopsis thaliana*) clonada en el vector pGADT7-Rec (DNA-AD) para la identificación de proteínas que interaccionan con la proteína cebo .

### **7-3. Cepas bacterianas.**

En este experimento se ha utilizado la cepa bacteriana que se detallan en la tabla VII-15.

**Tabla VII-15. Cepa bacteriana utilizada en el experimento de doble híbrido.**

<b>Cepa</b>	<b>Referencia/origen</b>	<b>Uso</b>	<b>Genotipo</b>
HB101 ( <i>E. coli</i> )	Takara	Transformación de bacterias	<i>supE44, hsdS20(rB- mB-), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi-1</i>

NOTA: las células HB101 tienen un defecto en *leuB6* que pueden complementarse por *LEU2* de levadura. Se utilizó esta cepa ya que los plásmidos de cebo y los de la librería tenían la misma resistencia.

#### **7-3-1. Medios de cultivo.**

Los medios utilizados para el crecimiento de los cultivos bacterianos de la cepa HB101 de *E. coli* fue el M9 sin leucina para seleccionar sólo el plásmido de la librería.

- **Medio M9:** para preparar 400ml de disolución al 1.5% de agar, se pesaron 6 g de agar y se añadieron 260 ml de agua. Posteriormente, se autoclavó la disolución y cuando se enfrió antes de solidificar se le añadieron: 80 ml de la disolución stock 5X M9 Salts (quedaba al 1X), 20 ml glucosa al 40% (quedaba al 2%), 40 ml de la disolución 10X-L (quedaba al 1X), 400 µl de Ampicilina (50 mg/ml) (quedaba a 0.05 mg/ml), 1.6 ml Prolina (10 mg/ml) (quedaba a 0.04 mg/ml), 0.4 ml tiamina (1M) (quedaba a 1µM), 0.8 ml Mg SO<sub>4</sub> (1M) (quedando a 2 µM), 0.04 ml Ca Cl<sub>2</sub> (1M) (quedaba a 0.1µM).

- **5X M9 salts:** para preparar 400 ml: se pesó: 25.6 g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g Na Cl, 2g NH<sub>4</sub> Cl, 13.56 Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, se añadió agua hasta 400 ml y posteriormente se autoclavó.

NOTA: la transformación de la cepa HB101 se realizó mediante electroporación ( ver apartado 2-5-1)



#### **7-4. Diseño de las construcciones cebo para el sistema del doble híbrido.**

##### **7-4-1. Construcción de los plásmidos cebo.**

Como cebo para el rastreo de la genoteca se emplearon dos construcciones distintas pMT22 (BD-*TOP1*) y pMT23 (BD-*TOP4*) que se utilizaron en dos rastreos distintos de la misma librería de cDNA (genoteca) de *Arabidopsis*. Estas construcciones se detallan en el anexo II.

La construcción pMT22 (BD-*TOP1*) se obtuvo a partir de la escisión EcoRI/SalI del plásmido pMN1 que contenía cDNA de *TOP1* y se subclonó en el vector PGBT9.

La construcción pMT23 (BD-*TOP4*) se obtuvo a partir de la escisión EcoRI/SalI del plásmido pMN3 que contenía cDNA de *TOP4* y se subclonó en el vector PGBT9.

Antes de proceder al rastreo de la genoteca con estas construcciones se transformaron con ellas las distintas cepas de levadura (apartado 7-1-8-1) que se iban a emplear (AH109 y Y187). La cepa Y187 se utilizó en el rastreo de la librería de doble híbrido y la cepa AH109 se utilizó para comprobar que las construcciones BD-*TOP1* y BD-*TOP4* no eran capaces de activar, por sí solas, la transcripción de los genes delatores de estas levaduras.

#### **7-5 Ensayo de la actividad de las proteínas codificadas por los genes delatores.**

##### **7-5-1. Ensayo de la expresión del gen *HIS3*.**

Para establecer la concentración óptima de 3-AT en cada caso, se transformó la cepa de levadura AH109 (posee los genes delatores) con las construcciones híbridas BD-cebo, pMT22 y pMT23 (BD-*TOP1* y BD-*TOP4* respectivamente) y se determinó la concentración del inhibidor 3-AT necesaria para controlar el fondo de crecimiento en un medio sin histidina. Para ello, las células transformadas con la construcción BD-cebo se sembraron en placas de medio SD/-His/-Trp, conteniendo 0, 2.5, 5 o 10 mM de 3-AT, y se evaluó el efecto de las construcciones en el crecimiento de la cepa. Se escogió la concentración más baja que sólo permitía el crecimiento de colonias de un tamaño inferior a 1 mm. Para ambas construcciones se determinó que la concentración de 3-AT óptima era 5 mM.

##### **7-5-2. Ensayo de activación transcripcional de las proteínas cebo.**

Para verificar que las construcciones híbridas no activaban por sí solas los distintos genes delatores se transformaron las cepas Y187 y AH109 con las construcciones pMT22 y pMT23 mediante el protocolo rápido descrito en el apartado 7-1-8-1. Posteriormente se sembraron los transformantes en: SD- Trp/ X- $\alpha$ -gal, SD/-His/-Trp/ X- $\alpha$ -Gal, SD/-Ade/-Trp/ X- $\alpha$ -Gal.

La proteína cebo es inactiva si las colonias transformantes son blancas y no crecen en SD/-His/-Trp/, SD/-Ade/-Trp. La proteína cebo es activa si las colonias transformantes son azules y crecen en SD/-His/-Trp/, SD/-Ade/-Trp.

Si la cepa cebo exhibe crecimiento en un medio sin histidina, éste se puede eliminar o reducir añadiendo 3-AT ( ver apartado 7-5-1)

### **7-5-3. Ensayo de la toxicidad de las proteínas cebo.**

(ver apartado 7-1-8-2)

### **7-6. Rastreo de la genoteca de expresión en levaduras de cDNA de *Arabidopsis* mediante el sistema del doble híbrido.**

La cepa de levadura Y187 se transformó con las construcciones BD-cebo (BD-*TOP1* y BD-*TOP4*) en dos ensayos distintos respectivamente utilizando el método de transformación rápido (ver apartado 7-1-8-1. ) y posteriormente se realizó el “mating” con la cepa de levadura AH109 portadora del cDNA de la genoteca (ver apartado 7-1-8-2). En este trabajo el rastreo de la genoteca se ha realizado tanto en condiciones de alta como de media astringencia, para evitar la pérdida de interacciones débiles. Para ello, el ensayo de expresión del gen *HIS3* se realizó mediante la siembra de la transformación (BD-*TOP1* y BD-*TOP4* en dos ensayos distintos) en placas con medio selectivo SD/-His/-Trp/-Leu conteniendo la cantidad mínima del inhibidor 3-AT necesaria para controlar, en cada cepa, el fondo de crecimiento en un medio sin histidina (apartado 7-5-1). Se utilizaron 80 placas (12 x 12 cm) por cada rastreo, en cada una de las cuales se sembraron 200 µl de la suspensión de células transformadas; las placas se incubaron en una estufa a 30°C.

Al cabo de seis a ocho días, las colonias capaces de crecer bajo esas condiciones fueron rescatadas y resembradas en placas de medio selectivo SD/-His/-Trp/-Leu, para confirmar el crecimiento (se siguió rescatando colonias hasta pasados diez días desde que se sembró la transformación). La réplica se hizo también en un medio SD/-His/-Trp/-Leu/-Ade para testar la expresión del gen delator *ADE2* (que posee la cepa AH109) y en un medio SD/-His/-Trp/-Leu/ X- $\alpha$ -Gal para testar la expresión del gen *lacZ* en las colonias que habían crecido. El crecimiento de las colonias en medio selectivo y el color azul de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se considera como una indicación de la interacción entre las proteínas híbridas codificadas por el BD-cebo y el clon procedente de la genoteca.

La eficiencia del “ mating” y el número de clones rastreados se calculó mediante la fórmula descrita en el apartado 7-1-9.

El rescate de los plásmidos de la genoteca, desde las colonias positivas, se llevó a cabo aislando el DNA plasmídico de la correspondiente levadura ( ver apartado 7-1-7) y usando esa preparación de DNA para transformar de *E. coli* por electroporación (ver apartado 2-5-1).

Posteriormente se realizaron preparaciones de DNA plasmídico de *E. coli*. (ver apartado 2-1-1-1), 3 de cada interacción positiva, que se analizaron mediante digestión con EcoRI y BamHI y se mandaron a secuenciar para comprobar posteriormente mediante BLAST el inserto que tenía el plásmido.

#### **7-7. Comprobación de la interacción entre *TOP1* y *YAB3*, *TOP1* y *BRX-L4*, *TOP4* y *YAB3* y *TOP4* y *BRX-L4*.**

Se comprobaron las interacciones positivas transformando por el protocolo rápido (ver apartado 7-1-8-1) la cepa AH109 portadora de la construcción cebo BD-*TOP1* y la cepa AH109 portadora de la construcción BD-*TOP4* que se había utilizado en el ensayo de la actividad de las proteínas codificadas por los genes delatores (apartado 7-5). Estas cepas (cada una de ellas) se transformaron con los plásmidos aislados de *E. coli* que resultaron positivos en el ensayo de doble híbrido, en concreto con AD-*YAB3* y AD-*BRX-L4* y se crecieron en medio sólido SD/-His/-Trp/ X- $\alpha$ -Gal. El crecimiento de colonias azules en este medio indica interacción de las proteínas.



## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

---



- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M.** (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**, 841-857.
- Alabadí, D. B., M.A.; Crabonell, J.; Ferrándiz, C.; Pérez-Amador, M.A.** (2008). Instructive Roles of Hormones in Plant Development.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. and Ullrich, C. I.** (2006). Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta* **223**, 315-28.
- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M. and Ullrich, C. I.** (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. *Planta* **216**, 841-53.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R. et al.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* **301**, 653-7.
- Alonso-Blanco, C. K., M.** (2000). Naturally occurring variation in Arabidopsis: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci.* **5**, 1360-1385.
- Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, J. J., Ochando, I., Vera, A., Ferrandiz, C. and Martinez-Laborda, A.** (2007). Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES1 gene. *Development* **134**, 2663-71.
- Alvarez, J. and Smyth, D.** (1999). CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development* **126**, 2377-2386.
- Alvarez, J. and Smyth, D. R.** (2002). Crabs claw and spatula genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Sciences* **163**, 15.
- Alvarez, J. P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z. and Eshed, Y.** (2006). Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* **18**, 1134-51.
- Aoyama, T. and Chua, N.-H.** (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* **11**, 605-612.
- Avsian-Kretchmer, O., Cheng, J. C., Chen, L., Moctezuma, E. and Sung, Z. R.** (2002). Indole acetic acid distribution coincides with vascular differentiation pattern during Arabidopsis leaf ontogeny. *Plant Physiol* **130**, 199-209.
- Balanzá, V., Navarrete, M., Trigueros, M. and Ferrandiz, C.** (2006). Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones. *J. Exp. Bot.* **57**, 3457-3469.
- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. and Fields, S.** (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**, 920-4.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L. et al.** (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**, D138-41.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G. and Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.



- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B. and Feldmann, K. A.** (1996). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**, 948-50.
- Bennett, S. R. M., Alvarez, J., Bossinger, G. and Smyth, D. R.** (1995). Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **8**, 505-520.
- Berendzen, K., Searle, I., Ravenscroft, D., Koncz, C., Batschauer, A., Coupland, G., Somssich, I. E. and Ulker, B.** (2005). A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods* **1**, 4.
- Berleth, T., Mattsson, J. and Hardtke, C. S.** (2000). Vascular continuity and auxin signals. *Trends Plant Sci* **5**, 387-393.
- Bevan, M.** (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**, 8711-8721.
- Bhatt, A. M., EtcHELLS, J. P., Canales, C., Lagodienko, A. and Dickinson, H.** (2004). VAAMANA--a BEL1-like homeodomain protein, interacts with KNOX proteins BP and STM and regulates inflorescence stem growth in *Arabidopsis*. *Gene* **328**, 103-111.
- Bishopp, A., Mahonen, A. P. and Helariutta, Y.** (2006). Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* **133**, 1857-69.
- Boerjan, W., Cervera, M. T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Van Onckelen, H., Van Montagu, M. and Inze, D.** (1995). Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* **7**, 1405-19.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. and Benning, C.** (1998). *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J.* **17**, 170-80.
- Bowman, J., Baum, S., Eshed, Y., Putterill, J. and Alvarez, J.** (1999). Molecular Genetics of Gynoecium Development in *Arabidopsis*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **45**, 155-205.
- Bowman, J. and Smyth, D.** (1999). CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* **126**, 2387-2396.
- Bowman, J. L.** (1994). *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*, (ed., pp. 450. New York: Springer.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. and Meyerowitz, E. M.** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**, 1-20.
- Briggs, G. C., Mouchel, C. F. and Hardtke, C. S.** (2006). Characterization of the plant-specific BREVIS RADIX gene family reveals limited genetic redundancy despite high sequence conservation. *Plant Physiol* **140**, 1306-16.
- Busse, J. S., Evert, R.F.** (1999). Vascular differentiation and transition in the seedling of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Int. J.Plant Sci.* **160**, 241-251.
- Byrne, M., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J., Dunham, M., Hudson, A. and Martienssen, R.** (2000a). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-971.

- Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A. and Martienssen, R. A.** (2000b). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* **408**, 967-71.
- Byrne, M. E., Groover, A. T., Fontana, J. R. and Martienssen, R. A.** (2003). Phyllotactic pattern and stem cell fate are determined by the Arabidopsis homeobox gene BELLRINGER. *Development* **130**, 3941-3950.
- Candela, H., Martinez-Laborda, A. and Micol, J. L.** (1999). Venation pattern formation in Arabidopsis thaliana vegetative leaves. *Dev Biol* **205**, 205-16.
- Cardon, G. H., Frey, M., Saedler, H. and Gierl, A.** (1993). Definition and characterization of an artificial En/Spm-based transposon tagging system in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* **23**, 157-78.
- Carland, F. M., Berg, B. L., FitzGerald, J. N., Jinamornphongs, S., Nelson, T. and Keith, B.** (1999). Genetic Regulation of Vascular Tissue Patterning in Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 2123-2138.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P. J. et al.** (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell* **13**, 843-52.
- Chen, C., Wang, S. and Huang, H.** (2000). LEUNIG has multiple functions in gynoecium development in Arabidopsis. *Genesis* **26**, 42-54.
- Chen, Q., Atkinson, A., Otsuga, D., Christensen, T., Reynolds, L. and Drews, G. N.** (1999). The Arabidopsis FILAMENTOUS FLOWER gene is required for flower formation. *Development* **126**, 2715-26.
- Cheng, Y., Dai, X. and Zhao, Y.** (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**, 1790-9.
- Cheng, Y., Dai, X. and Zhao, Y.** (2007a). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 2430-9.
- Cheng, Y., Qin, G., Dai, X. and Zhao, Y.** (2007b). NPY1, a BTB-NPH3-like protein, plays a critical role in auxin-regulated organogenesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18825-9.
- Child, R., Chauvaux, N., John, K., Ulvskov, P. and Onckelen, H. V.** (1998). Ethylene biosynthesis in oilseed rape pods in relation to pod shatter. *J Exp Bot* **49**, 829-838.
- Chuck, G. and Hake, S.** (2005). Regulation of developmental transitions. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 67-70.
- Clouse, S. D.** (2002). Brassinosteroids. *The Arabidopsis Book*.
- Cnops, G., Jover-Gil, S., Peters, J. L., Neyt, P., De Block, S., Robles, P., Ponce, M. R., Gerats, T., Micol, J. L. and Van Lijsebettens, M.** (2004). The rotunda2 mutants identify a role for the LEUNIG gene in vegetative leaf morphogenesis. *J Exp Bot* **55**, 1529-39.
- Conner, J. and Liu, Z.** (2000). LEUNIG, a putative transcriptional corepressor that regulates AGAMOUS expression during flower development. *PNAS* **97**, 12902-12907.

- Crawford, B. C., Ditta, G. and Yanofsky, M. F.** (2007). The NTT gene is required for transmitting-tract development in carpels of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **17**, 1101-8.
- Davies, P. J.** (2004). Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action! *Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands*.
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frey, N. F., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D. et al.** (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* **134**, 681-90.
- Deyholos, M., Corder, G., Beebe, D. and Sieburth, L.** (2000). The SCARFACE gene is required for cotyledon and leaf vein patterning. *Development* **127**, 3205-3213.
- Dinneny, J. R., Weigel, D. and Yanofsky, M. F.** (2005). A genetic framework for fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4687-96.
- Dinneny, J. R., Weigel, D. and Yanofsky, M. F.** (2006). NUBBIN and JAGGED define stamen and carpel shape in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 1645-55.
- Dinneny, J. R., Yadegari, R., Fischer, R. L., Yanofsky, M. F. and Weigel, D.** (2004). The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development* **131**, 1101-1110.
- Dinneny, J. R. and Yanofsky, M. F.** (2005). Drawing lines and borders: how the dehiscent fruit of *Arabidopsis* is patterned. *Bioessays* **27**, 42-9.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S. and Yanofsky, M. F.** (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol* **14**, 1935-40.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. and Scheres, B.** (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**, 71-84.
- Donnelly, P. M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R. E. and Dengler, N. G.** (1999). Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev Biol* **215**, 407-19.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W.-H. and Elledge, S. J.** (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**, 555-569.
- Ellis, C. M., Nagpal, P., Young, J. C., Hagen, G., Guilfoyle, T. J. and Reed, J. W.** (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4563-74.
- Eshed, Y., Baum, S. and Bowman, J.** (1999). Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* **99**, 199-209.
- Eshed, Y., Baum, S. F., Perea, J. V. and Bowman, J. L.** (2001). Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Curr Biol* **11**, 1251-60.
- Eshed, Y., Izhaki, A., Baum, S. F., Floyd, S. K. and Bowman, J. L.** (2004). Asymmetric leaf development and blade expansion in *Arabidopsis* are mediated by KANADI and YABBY activities. *Development* **131**, 2997-3006.
- Feder, T. O. B. N.** (1968). Plant microtechnique: some principles and new methods. *Amer. J. Bot.*

- Ferrándiz, C.** (2002). Regulation of fruit dehiscence in Arabidopsis. *J Exp Bot* **in press**.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. and Yanofsky, M.** (2000a). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**, 725-734.
- Ferrándiz, C., Liljegren, S. and Yanofsky, M.** (2000b). FRUITFULL negatively regulates the SHATTERPROOF genes during Arabidopsis fruit development. *Science* **289**, 436-438.
- Ferrándiz, C., Pelaz, S. and Yanofsky, M. F.** (1999). Control of Carpel and Fruit Development in Arabidopsis. *Ann. Rev. Biochem.* **68**, 321-354.
- Fletcher, J. C.** (2002). Coordination of cell proliferation and cell fate decisions in the angiosperm shoot apical meristem. *Bioessays* **24**, 27-37.
- Fletcher, J. C. M., E. M.** (2000). Cell signaling within the shoot meristem. *Curr. Opin. Plant Biol* **3** 23-30.
- Fores, O., Arro, M., Pahissa, A., Ferrero, S., Germann, M., Stuke, J., McDonough, V., Nickels, J. T., Jr., Campos, N. and Ferrer, A.** (2006). Arabidopsis thaliana expresses two functional isoforms of Arvp, a protein involved in the regulation of cellular lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 725-35.
- Franco-Zorrilla, J. M., Cubas, P., Jariillo, J. A., Fernandez-Calvin, B., Salinas, J. and Martinez-Zapater, J. M.** (2002). AtREM1, a Member of a New Family of B3 Domain-Containing Genes, Is Preferentially Expressed in Reproductive Meristems. *Plant Physiol* **128**, 418-27.
- Franks, R. G., Liu, Z. and Fischer, R. L.** (2006). SEUSS and LEUNIG regulate cell proliferation, vascular development and organ polarity in Arabidopsis petals. *Planta*.
- Franks, R. G., Wang, C., Levin, J. Z. and Liu, Z.** (2002). SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. *Development* **129**, 253-263.
- Fridborg, I., Kuusk, S., Moritz, T. and Sundberg, E.** (1999). The Arabidopsis dwarf mutant shi exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *Plant Cell* **11**, 1019-32.
- Fridborg, I., Kuusk, S., Robertson, M. and Sundberg, E.** (2001). The Arabidopsis protein SHI represses gibberellin responses in Arabidopsis and barley. *Plant Physiol* **127**, 937-48.
- Friml, J.** (2003). Auxin transport -- shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 7-12.
- Gaj, M. D., Zhang, S., Harada, J. J. and Lemaux, P. G.** (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of Arabidopsis. *Planta* **222**, 977-88.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K.** (1998). Regulation of Polar Auxin Transport by AtPIN1 in Arabidopsis Vascular Tissue. *Science* **282**, 2226-2230.
- García-Martínez, J., Carbonell, J.** (1980). Fruit-set of unpollinated ovaries of Pisum sativum L. influence of plant growth regulators. *Planta* **147**, 6.

- Gatz, C.** (1997). Chemical Control of Gene Expression. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 89-108.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. and Schiestl, R. H.** (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425.
- Gillaspy, G., Ben-David, H. and Gruissem, W.** (1993). Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* **5**, 1439-1451.
- Giraudat, J., Hauge, B. M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. and Goodman, H. M.** (1992). Isolation of the Arabidopsis *ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**, 1251-1261.
- Goetz, M., Vivian-Smith, A., Johnson, S. D. and Koltunow, A. M.** (2006). AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 1873-86.
- Gomez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M. M., Angenent, G. C. and Sablowski, R.** (2005). Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis. *Development* **132**, 429-38.
- Goto, N., Katoh, N. and Kranz, A. R.** (1991). Morphogenesis of floral organs in *Arabidopsis*: predominant carpel formation of the pin-formed mutant. *Japan. J. Genet.* **66**, 551-567.
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M.** (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**, 271-6.
- Gremski, K., Ditta, G. and Yanofsky, M. F.** (2007). The HECATE genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **134**, 3593-601.
- Gu, Q., Ferrandiz, C., Yanofsky, M. F. and Martienssen, R.** (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **125**, 1509-17.
- Guilfoyle, T., Ulmasov, T. and Hagen, G.** (1998). The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, 619-627.
- Guilfoyle, T. J. and Hagen, G.** (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 453-60.
- Hagen, G. and Guilfoyle, T.** (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* **49**, 373-85.
- Hardtke, C. S.** (2007). Transcriptional auxin-brassinosteroid crosstalk: who's talking? *Bioessays* **29**, 1115-23.
- Hardtke, C. S. and Berleth, T.** (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *Embo J* **17**, 1405-11.
- Hardtke, C. S., Dorcey, E., Osmont, K. S. and Sibout, R.** (2007). Phytohormone collaboration: zooming in on auxin-brassinosteroid interactions. *Trends Cell Biol* **17**, 485-92.
- Harper, R. M., Stowe-Evans, E. L., Luesse, D. R., Muto, H., Tatematsu, K., Watahiki, M. K., Yamamoto, K. and Liscum, E.** (2000). The NPH4 locus encodes

the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial Arabidopsis tissue. *Plant Cell* **12**, 757-70.

**Heisler, M., Atkinson, A., Bylstra, Y., Walsh, R. and Smyth, D.** (2001). SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development* **128**, 1089-1098.

**Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J. A. and Meyerowitz, E. M.** (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol* **15**, 1899-911.

**Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. and Mullineaux, P. M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-32.

**Hill, J., Donald, K. A. and Griffiths, D. E.** (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res* **19**, 5791.

**Hill, J. P. and Lord, E. M.** (1989). Floral development in *Arabidopsis thaliana*: comparison of the wildtype and the homeotic *pistillata* mutant. *Can. J. Bot.* **67**, 2922-2936.

**Hoffman, C. S. and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene* **57**, 267-72.

**Honma, T. and Goto, K.** (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**, 525-9.

**Hu, Y. X., Wang, Y. X., Liu, X. F. and Li, J. Y.** (2004). Arabidopsis RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Res* **14**, 8-15.

**Hunter, C., Willmann, M. R., Wu, G., Yoshikawa, M., de la Luz Gutierrez-Nava, M. and Poethig, S. R.** (2006). Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis. *Development* **133**, 2973-81.

**Ishida, T., Aida, M., Takada, S. and Tasaka, M.** (2000). Involvement of CUP-SHAPED COTYLEDON genes in gynoecium and ovule development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **41**, 60-7.

**Ishizaki, K., Shimizu-Ueda, Y., Okada, S., Yamamoto, M., Fujisawa, M., Yamato, K. T., Fukuzawa, H. and Ohyama, K.** (2002). Multicopy genes uniquely amplified in the Y chromosome-specific repeats of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Nucleic Acids Res* **30**, 4675-81.

**Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-8.

**Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C. et al.** (2002). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol* **43**, 467-78.

**James, P., Halladay, J. and Craig, E. A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-36.

- Jenkins, E., Paul, W., Craze, M., Whitelaw, C., Weigand, A. and Roberts, J.** (1999). Dehiscence-related expression of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a polygalacturonase in transgenic plants of *Brassica napus*. *Plant Cell and Environment* **22**, 159-167.
- Jinn, T., Stone, J. and Walker, J.** (2000). HAESA, an Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes and Development* **14**, 108-117.
- Kagaya, Y., Ohmiya, K. and Hattori, T.** (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, bind to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Research* **27**, 470-478.
- Kaiser, P. and Auer, B.** (1993). Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfer to *E. coli*. *Biotechniques* **14**, 552.
- Kang, H. G., Fang, Y. and Singh, K. B.** (1999). A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in Arabidopsis and induces defense-related genes. *Plant J* **20**, 127-33.
- Kanrar, S., Onguka, O. and Smith, H. M.** (2006). Arabidopsis inflorescence architecture requires the activities of KNOX-BELL homeodomain heterodimers. *Planta* **224**, 1163-73.
- Kerstetter, R., Bollman, K., Taylor, A., Bomblied, K. and Poethig, S.** (2001). KANADI regulates organ polarity in Arabidopsis. *Nature* **411**, 706-709.
- Kieber, J. J.** (2002). Cytokinin. *Arabidopsis Book*.
- Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T. and Davies, B.** (2006). Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in Antirrhinum reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell* **18**, 560-73.
- Kim, J. I., Sharkhuu, A., Jin, J. B., Li, P., Jeong, J. C., Baek, D., Lee, S. Y., Blakeslee, J. J., Murphy, A. S., Bohnert, H. J. et al.** (2007). yucca6, a Dominant Mutation in Arabidopsis, Affects Auxin Accumulation and Auxin-Related Phenotypes. *Plant Physiol* **145**, 722-35.
- Koizumi, K., Sugiyama, M. and Fukuda, H.** (2000). A series of novel mutants of Arabidopsis thaliana that are defective in the formation of continuous vascular network: calling the auxin signal flow canalization hypothesis into question. *Development* **127**, 3197-3204.
- Krizek, B. A., Prost, V. and Macias, A.** (2000). AINTEGUMENTA promotes petal identity and acts as a negative regulator of AGAMOUS. *Plant Cell* **12**, 1357-66.
- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Long, J. A., Fridborg, I. and Sundberg, E.** (2002). STY1 and STY2 promote the formation of apical tissues during Arabidopsis gynoecium development. *Development* **129**, 4707-17.
- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Magnus Eklund, D. and Sundberg, E.** (2006). Functionally redundant SHI family genes regulate Arabidopsis gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant J*.
- Lara, P., Onate-Sanchez, L., Abraham, Z., Ferrandiz, C., Diaz, I., Carbonero, P. and Vicente-Carbajosa, J.** (2003). Synergistic activation of seed storage protein gene expression in Arabidopsis by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *J Biol Chem* **278**, 21003-11.

- Levy, Y. Y., Mesnage, S., Mylne, J. S., Gendall, A. R. and Dean, C.** (2002). Multiple roles of Arabidopsis VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science* **297**, 243-6.
- Leyser, O. D., S.** (2003). Mechanisms in plant development. *Blackwell Publishing*.
- Li, H., Johnson, P., Stepanova, A., Alonso, J. M. and Ecker, J. R.** (2004). Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in Arabidopsis. *Dev Cell* **7**, 193-204.
- Liljegren, S., Ditta, G., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. and Yanofsky, M.** (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* **404**, 766-769.
- Liljegren, S. J., Roeder, A. H., Kempin, S. A., Gremski, K., Ostergaard, L., Guimil, S., Reyes, D. K. and Yanofsky, M. F.** (2004). Control of fruit patterning in Arabidopsis by INDEHISCENT. *Cell* **116**, 843-53.
- Liscum, E. and Reed, J. W.** (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* **49**, 387-400.
- Liu, Y. G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and Whittier, R. F.** (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* **8**, 457-463.
- Liu, Z., Franks, R. G. and Klink, V. P.** (2000). Regulation of gynoecium marginal tissue formation by LEUNIG and AINTEGUMENTA. *Plant Cell* **12**, 1879-92.
- Liu, Z. and Meyerowitz, E. M.** (1995). *LEUNIG* regulates *AGAMOUS* expression in *Arabidopsis* flowers. *Development* **121**, 975-991.
- Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. and Sandberg, G.** (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **17**, 1090-104.
- Lohmann, J. U. and Weigel, D.** (2004). From tough nuts to touch-me-nots. *Cell* **116**, 763-4.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I. and Barton, M. K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69.
- Luerßen, H., Kirik, V., Herrmann, P. and Miséra, S.** (1998). *FUSCA3* encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **15**, 755-764.
- Luschnig, C., Gaxiola, R. A., Grisafi, P. and Fink, G. R.** (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **12**, 2175-87.
- Lyndon, R. F.** (1990). Plant Development. *Unwin Hyman*.
- Marsch-Martinez, N., Greco, R., Van Arkel, G., Herrera-Estrella, L. and Pereira, A.** (2002). Activation tagging using the En-I maize transposon system in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 1544-56.
- Mattsson, J., Sung, Z. and Berleth, T.** (1999). Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development* **126**, 2979-2991.



- McCarty, D. R., Carson, C. B., Stinard, P. S. and Robertson, D. S.** (1989). Molecular Analysis of viviparous-1: An Abscisic Acid-Insensitive Mutant of Maize. *Plant Cell* **1**, 523-532.
- McConnell, J. R. and Barton, M. K.** (1998). Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. *Development* **125**, 2935-42.
- McNellis, T. W., Mudgett, M. B., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N. H. and Staskawicz, B. J.** (1998). Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic Arabidopsis induces hypersensitive cell death. *Plant J* **14**, 247-57.
- Meissner, R. C., Jin, H., Cominelli, E., Denekamp, M., Fuertes, A., Greco, R., Kranz, H. D., Penfield, S., Petroni, K., Urzainqui, A. et al.** (1999). Function search in a large transcription factor gene family in Arabidopsis: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell* **11**, 1827-40.
- Michniewicz, M. B., PB.;Friml, J.** (2007). Polar Auxin Transport and Asymmetric Auxin Distribution. *The Arabidopsis Book*.
- Mitchell, P. J. and Tjian, R.** (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-8.
- Mok, D. W. and Mok, M. C.** (2001). Cytokinin Metabolism and Action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 89-118.
- Moore, R. C., Grant, S. R. and Purugganan, M. D.** (2005). Molecular population genetics of redundant floral-regulatory genes in Arabidopsis thaliana. *Mol Biol Evol* **22**, 91-103.
- Mouchel, C. F., Briggs, G. C. and Hardtke, C. S.** (2004). Natural genetic variation in Arabidopsis identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes Dev* **18**, 700-14.
- Mouchel, C. F., Osmont, K. S. and Hardtke, C. S.** (2006). BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature* **443**, 458-61.
- Muller, A., Guan, C., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. and Palme, K.** (1998). AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *Embo J* **17**, 6903-11.
- Nag, A., Yang, Y. and Jack, T.** (2007). DORNROSCHE-LIKE, an AP2 gene, is necessary for stamen emergence in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **65**, 219-32.
- Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Alonso, J. M., Cohen, J. D., Farmer, E. E. et al.** (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**, 4107-18.
- Nasrallah, J. B., Stein, J. C., Kandasamy, M. K. and Nasrallah, M. E.** (1994). Signaling the Arrest of Pollen Tube Development in Self-Incompatible Plants. *Science* **266**, 1505-1508.
- Navarro, C., Efremova, N., Golz, J. F., Rubiera, R., Kuckenberger, M., Castillo, R., Tietz, O., Saedler, H. and Schwarz-Sommer, Z.** (2004). Molecular and genetic interactions between STYLOSA and GRAMINIFOLIA in the control of Antirrhinum vegetative and reproductive development. *Development* **131**, 3649-59.

- Neff, M., Neff, J., Chory, J. and Pepper, A.** (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J* **14**, 387-392.
- Nemhauser, J., Feldman, L. and Zambryski, P.** (2000). Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development* **127**, 3877-3888.
- Nishimura, T., Wada, T., Yamamoto, K. T. and Okada, K.** (2005). The *Arabidopsis* STV1 protein, responsible for translation reinitiation, is required for auxin-mediated gynoecium patterning. *Plant Cell* **17**, 2940-53.
- Nole-Wilson, S. and Krizek, B. A.** (2006). AINTEGUMENTA contributes to organ polarity and regulates growth of lateral organs in combination with YABBY genes. *Plant Physiol.*
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R. and Kim, P. S.** (1989). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243**, 538-42.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S.** (2003). Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**, 1591-604.
- Ohno, C. K., Reddy, G. V., Heisler, M. G. and Meyerowitz, E. M.** (2004). The *Arabidopsis* JAGGED gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development. *Development* **131**, 1111-22.
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M.** (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959-68.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J. and Shimura, Y.** (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* **3**, 677-684.
- Okada, S., Sone, T., Fujisawa, M., Nakayama, S., Takenaka, M., Ishizaki, K., Kono, K., Shimizu-Ueda, Y., Hanajiri, T., Yamato, K. T. et al.** (2001). The Y chromosome in the liverwort *Marchantia polymorpha* has accumulated unique repeat sequences harboring a male-specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9454-9.
- Okamoto, J. K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M. and Jofuku, K. D.** (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7076-7081.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L. and Hake, S.** (2000). Mechanisms that control knox gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* **127**, 5523-32.
- Parcy, F., Valon, C., Kohara, A., Misera, S. and Giraudat, J.** (1997). The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3* and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *Plant Cell* **9**, 1265-1277.
- Pautot, V., Dockx, J., Hamant, O., Kronenberger, J., Grandjean, O., Jublot, D. and Traas, J.** (2001). KNAT2: evidence for a link between knotted-like genes and carpel development. *Plant Cell* **13**, 1719-34.
- Pekker, I., Alvarez, J. P. and Eshed, Y.** (2005). Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* **17**, 2899-910.

- Pelaz, S., Ditta, G. S., Bauman, E., Wisman, E. and Yanofsky, M. F.** (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* **405**, 200-203.
- Pelaz, S., Tapia-Lopez, R., Alvarez-Buylla, E. R. and Yanofsky, M. F.** (2001). Conversion of leaves into petals in Arabidopsis. *Curr Biol* **11**, 182-4.
- Penfield, S., Josse, E. M., Kannangara, R., Gilday, A. D., Halliday, K. J. and Graham, I. A.** (2005). Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr Biol* **15**, 1998-2006.
- Petersen, M., Sander, L., Child, R., Onckelen, H. v., Ulvskov, P. and Borkhardt, B.** (1996). Isolation and characterization of a pod dehiscence zone-specific polygalacturonase from *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* **31**, 517-527.
- Pfluger, J. and Zambryski, P.** (2004). The role of SEUSS in auxin response and floral organ patterning. *Development* **131**, 4697-707.
- Pinyopich, A., Ditta, G. S., Savidge, B., Liljegren, S. J., Baumann, E., Wisman, E. and Yanofsky, M. F.** (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **424**, 85-8.
- Ragni, L., Belles-Boix, E., Gunl, M. and Pautot, V.** (2008). Interaction of KNAT6 and KNAT2 with BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE in Arabidopsis Inflorescences. *Plant Cell* **20**, 888-900.
- Raikhel, N.** (1992). Nuclear Targeting in Plants. *Plant Physiol* **100**, 1627-1632.
- Rajani, S. and Sundaresan, V.** (2001). The Arabidopsis myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology* **11**, 1914-1922.
- Reinhardt, D., Mandel, T. and Kuhlemeier, C.** (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**, 507-18.
- Reinhardt, D., Pesce, E. R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. and Kuhlemeier, C.** (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255-60.
- Remington, D. V., TJ.;Guilfoyle, TJ. Reed, JW.** (2005). Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. *Plant Physiol* **135**, 1738-1752.
- Robinson-Beers, K., Pruitt, R. E. and Gasser, C. S.** (1992). Ovule development in wild-type Arabidopsis and two female-sterile mutants. *Plant Cell* **4**, 1237-1249.
- Roeder, A., Lijegren, S., Ferrandiz, C. and Yanofsky, M.** (2005). Drawing a line in the Arabidopsis fruit. *Dev Biol* **283**, 658-658.
- Roeder, A. H.** (2005). Drawing a line in the *Arabidopsis* fruit. *Thesis*.
- Roeder, A. H., Ferrandiz, C. and Yanofsky, M. F.** (2003). The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the Arabidopsis fruit. *Curr Biol* **13**, 1630-5.
- Rollins, R. C.** (1993). The Cruciferae of continental North America - systematics of the mustard family from the Arctic to Panama. Stanford: Stanford University Press.
- Romano, C. P., Hein, M. B. and Klee, H. J.** (1991). Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev* **5**, 438-46.

- Sawa, S., Ito, T., Shimura, Y. and Okada, K.** (1999). FILAMENTOUS FLOWER controls the formation and development of arabidopsis inflorescences and floral meristems. *Plant Cell* **11**, 69-86.
- Scheres, B. B. P. D. L.** (2002). Root Development. *The Arabidopsis Book*.
- Schiestl, R. H. and Gietz, R. D.** (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**, 339-46.
- Scutt, C. P., Vinauger-Douard, M., Fourquin, C., Finet, C. and Dumas, C.** (2006). An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *J Exp Bot*.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C. and Machida, Y.** (2001). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128**, 1771-1783.
- Sessions, A., Nemhauser, J., McColl, A., Roe, J., Feldmann, K. and Zambryski, P.** (1997). *ETTIN* patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**, 4481-4491.
- Sessions, A., Weigel, D. and Yanofsky, M.** (1999). The Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J.* **20**, 259-263.
- Sessions, R. A.** (1997). Arabidopsis flower development and gynoecium patterning in wild-type and *ettin* mutants. *Am. J. Bot.* **84**, 1179-1191.
- Sessions, R. A. and Zambryski, P. C.** (1995). Arabidopsis gynoecium structure in the wild type and in *ettin* mutants. *Development* **121**, 1519-32.
- Sibout, R., Eudes, A., Mouille, G., Pollet, B., Lapierre, C., Jouanin, L. and Seguin, A.** (2005). CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 2059-76.
- Sieburth, L. E.** (1999). Auxin Is Required for Leaf Vein Pattern in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **121**, 1179-1190.
- Siegfried, K. R., Eshed, Y., Baum, S. F., Otsuga, D., Drews, G. N. and Bowman, J. L.** (1999). Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. *Development* **126**, 4117-28.
- Smirnov, M. N., Smirnov, V. N., Budowsky, E. I., Inge-Vechtomov, S. G. and Serebrjakov, N. G.** (1967). Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 299-304.
- Smith, H. M. S. and Hake, S.** (2003). The Interaction of Two Homeobox Genes, BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE, Regulates Internode Patterning in the Arabidopsis Inflorescence. *Plant Cell* **15**, 1717-1727.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. and Meyerowitz, E. M.** (1990). Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Sohlberg, J. J., Myrenas, M., Kuusk, S., Lagercrantz, U., Kowalczyk, M., Sandberg, G. and Sundberg, E.** (2006). STY1 regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium. *Plant J.*

- Somerville, C. and Koornneef, M.** (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat Rev Genet* **3**, 883-9.
- Spence, J., Vercher, Y., Gates, P. and Harris, N.** (1996). 'Pod shatter' in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *B. juncea*. *Journal of Microscopy* **181**, 195-203.
- Sridhar, V. V., Surendrarao, A., Gonzalez, D., Conlan, R. S. and Liu, Z.** (2004). Transcriptional repression of target genes by LEUNIG and SEUSS, two interacting regulatory proteins for *Arabidopsis* flower development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11494-9.
- Steeves, T. A. and Sussex, I. M.** (1989). Patterns in plant development. Cambridge New York Melbourne: Cambridge University Press.
- Strasburger, E. N., F.; Schenck, H.; Schimper, A. F. W. .** (1994). Tratado de Botánica. *Omega* **8<sup>a</sup> edición**.
- Suzuki, M., Kao, C. Y. and McCarty, D. R.** (1997). The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* **9**, 799-807.
- Suzuki, M., Wang, H. H. and McCarty, D. R.** (2007). Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. *Plant Physiol* **143**, 902-11.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. and Bennett, M.** (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev* **15**, 2648-53.
- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P. B. and Friml, J.** (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2738-54.
- The Arabidopsis Genome Initiative, T.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**.
- Tinkelenberg, A. H., Liu, Y., Alcantara, F., Khan, S., Guo, Z., Bard, M. and Sturley, S. L.** (2000). Mutations in yeast ARV1 alter intracellular sterol distribution and are complemented by human ARV1. *J Biol Chem* **275**, 40667-70.
- Tiwari, S. B., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J.** (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**, 533-43.
- Tsukagoshi, H., Morikami, A. and Nakamura, K.** (2007). Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2543-7.
- Tsukagoshi, H., Saijo, T., Shibata, D., Morikami, A. and Nakamura, K.** (2005). Analysis of a sugar response mutant of *Arabidopsis* identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiol* **138**, 675-85.
- Tsukaya, H., Inabahigano, K. and Komeda, Y.** (1995). Phenotypic characterization and molecular mapping of an *acaulis2* mutant of *Arabidopsis thaliana* with flower stalks of much reduced length. *Plant Cell Physiol*. **36**, 239-246.
- Tsukaya, H., Naito, S., Redei, G. P. and Komeda, Y.** (1993). A new class of mutations in *Arabidopsis thaliana*, *acaulis1*, affecting the development of both inflorescences and leaves. *Development* **118**, 751-764.

- Turner, S. S., L.E.** (2003). Vascular Patterning. *The Arabidopsis Book*.
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J.** (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**, 1865-8.
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J.** (1999). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* **19**, 309-19.
- Vercher, S. P. C., J.** (1991). Changes in the structure of ovary tissues and in the ultrastructure of mesocarp cells during ovary senescence of fruit development induced by plant growth substances in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant* **81**, 9.
- Vert, G., Nemhauser, J. L., Geldner, N., Hong, F. and Chory, J.** (2005). Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 177-201.
- Vivian-Smith, A. and Koltunow, A. M.** (1999). Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **121**, 437-51.
- Vivian-Smith, A., Luo, M., Chaudhury, A. and Koltunow, A.** (2001). Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development* **128**, 2321-2331.
- Waltner, J. K., Peterson, F. C., Lytle, B. L. and Volkman, B. F.** (2005). Structure of the B3 domain from *Arabidopsis thaliana* protein At1g16640. *Protein Sci* **14**, 2478-83.
- Wang, D., Pei, K., Fu, Y., Sun, Z., Li, S., Liu, H., Tang, K., Han, B. and Tao, Y.** (2007). Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene* **394**, 13-24.
- Weigel, D., Ahn, J. H., Blazquez, M. A., Borevitz, J. O., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E. J., Neff, M. M. et al.** (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**, 1003-13.
- Weigel, D. and Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. 354.
- Weijers, D. and Jurgens, G.** (2004). Funneling auxin action: specificity in signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 687-93.
- Weisman, L. S., Bacallao, R. and Wickner, W.** (1987). Multiple methods of visualizing the yeast vacuole permit evaluation of its morphology and inheritance during the cell cycle. *J Cell Biol* **105**, 1539-47.
- White, P. J.** (2002). Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *J Exp Bot* **53**, 1995-2000.
- Wisman, E., Cardon, G. H., Franz, P. and Saedler, H.** (1998). The behaviour of the autonomous maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Mol Biol* **37**, 989-99.
- Wolpert, L. B., R;Brockers,J;Jessell, T;Lawrence,P;Meyerowitz,E.** (2002). *Principles of Development*. Oxford University Press.
- Woodward, C., Bemis, S. M., Hill, E. J., Sawa, S., Koshiba, T. and Torii, K. U.** (2005). Interaction of auxin and *ERECTA* in elaborating *Arabidopsis* inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the *YUCCA* family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol* **139**, 192-203.
- Wu, H., Mori, A., Jiang, X., Wang, Y. and Yang, M.** (2006a). The *INDEHISCENT* protein regulates unequal cell divisions in *Arabidopsis* fruit. *Planta* **224**, 971-9.

**Wu, M. F., Tian, Q. and Reed, J. W.** (2006b). Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* **133**, 4211-8.

**Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tatenno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y. et al.** (2004). Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1. *Plant Cell* **16**, 3448-59.

**Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A. and Ori, N.** (2005). Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol* **15**, 1566-71.

**Zgurski, J. M., Sharma, R., Bolokoski, D. A. and Schultz, E. A.** (2005). Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of asymmetric leaf1 and asymmetric leaf2 Arabidopsis leaves. *Plant Cell* **17**, 77-91.

**Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D., Weigel, D. and Chory, J.** (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* **291**, 306-9.

## **IX. ANEXO I. CEBADORES**

---





<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>Orientación</b>	<b>Secuencia que aparea</b>
140P	5'GCT AAT GAT CTT CTC ACA CAA GAA C 3'	F	Genómico de IND1
140Q	5'ATC GCA TCC ATG TCT TCA TCG TAC 3'	R	Genómico de IND1
5'TOP2F	5'AAG CTT ATC TGC CAA ACC GAC GCT G 3'	F	TOP2 genómico
5'TOP2R	5'GGA TCC GAA ATC CAA CAC TGT GCC G 3'	R	TOP2 genómico
A904.gus1u	5'GGA TCC ATT ATG ACT TAT CTG A 3'	R	TOP1 genómico
BcDNA1	5'ATG ATC AAT TCG GAG AGC AGC AAC ACC 3'		Genómico de STY2
BcDNA2	5'ATG ATC ACC AGA GCA ACA AAA CAA AAG ACA 3'		Genómico de STY2
BRXL4F	5'ATG CTG ACG TGT ATA GCT CGT TC 3'	F	BRX-L4 ORF
BRXL4R	5'CAA GTA TTG TTC ATG TAT CCT TGC C 3'	R	BRX-L4 ORF
dsprm1	5'CTT ATT TCA GTA AGA GTG TGG GGT TTT GG 3'		dSPM transposón en mutantes STY
EN205	5'AGA AGC ACG ACG GCT GTA GAA TAG GA 3'	F	En-1/Spm
EN8130	5'GAG CGT CGG TCC CCA CAC TTC TAT AC 3'	R	En-1/Spm
EST3	5'TTC ACG GTG GCG TTT AGG AAC G 3'	R	Genómico de STY1
ful-2F	5'CAA ATG TTA CAC ATT ATA ACA TGT GAA 3'	F	Genómico de FUL
ful-2R	5'GCC TTG AGC TTA GCA TGT TCT AGG GCC 3'	R	Genómico de FUL
INDa	5'GAG CAA CCA CCG TCT GAG GAT CG 3'	F	Genómico de IND1
INDb	5'CGT CGA CGA TGA AAA TGG AAA ATG GTA TGT ATA 3'	R	Genómico de IND1
LB3	5'TAG CAT CTG AAT TTC ATA ACC AAT CTC GAT ACA C 3'	F	T-DNA del Garlic en top1-4
N-1136	5'GGA CAA GCT GGG ATC CAG G3'	F	TUBULINA 3
N-1137	5'CGT CTC CAC CTT CAG CAC C3'	R	TUBULINA 3
OAR32	5'CAA GTT CAA ACT CGA ATC CAA 3'	R	Genómico de RPL1
OAR46	5'ACC AGC TTC AAT TCA GCC ACA 3'	F	Genómico de RPL1
oDONR201F	5'TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC 3'	F	pDONR 201
oDONR201R	5'GTAACATCAGAGATTTGAGACAC3'	R	pDONR 201
oEGAD1	5' AAG ATA CAG TCT CAG AAG AC 3'	F	Plásmido pEGAD
oEGAD2	5'GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG 3'	F	Plásmido pEGAD
oMN1	5'GAATTCATGAATCAAGAAGATAAAGA 3'	F	TOP3
oMN2	5'GTCGACTCACCTATCCAAATCAAAAAGA 3'	R	TOP3
oMNG4	5'GAA TTC ATG ATG ACA GAT TTA 3'	F	TOP4 ORF
oMNG6	5'TTT AAC GAA TCT GCT CCA AC 3'	R	TOP4 genómico
oMNG9	5'GGT ACC CTT ACG GTT AAA ATA ATC CAC C 3'	R	TOP4
oMNG13	5'GAATTCATGAATCTTGACCAA 3'	F	TOP 2

OMT1	5'GGA TCC ATG GAT CTA TCC CTG G 3'	F	TOP 1
OMT2	5'GAG CTC TGG ATT GAA ATT GAG AGA 3'	R	TOP 1
OMT3	5'GGA TCC ATG ATT CTT GAC CAA GA 3'	F	TOP 2
OMT4	5'GAG CTC CTC TAA AGA TTT CC 3'	R	TOP 2
OMT5	5' AAG CTT CAA GGA TCG CCT CAG CTC C 3'	F	TOP 2
OMT6	5'GGA TCC TGG TCA AGA TTC ATT GTT GAG A 3'	R	TOP 2
OMT7	5'CCA TGA GCT CTT TCA TCA TCT TCT TG 3'	F	TOP 1
OMT8	5'GAA TCC TAT CAG TCT ATG CAT GCA TTC 3'	R	TOP 1
OMT9	5'GGA AAT CTT TAG AGC TCT GAA GAT AG 3'	F	TOP 2
OMT10	5'GAA TCC AAG GTC ACC GTC GAT CTA 3'	R	TOP 2
OMT11	5'AAG CTT AGT TTT TCT TTC ATC TCT CGG 3'	F	TOP 2 genómico
OMT13 ett-3 F	5'CCA ATC AGG TGG CCT GGT TCA AAA TG 3'	F	ETT genómico
OMT14 ett-3 R	5'CCA CAA TGT CGT CCC ACC TTC CCT G 3'	R	ETT genómico
OMT15 spt-2F	5'GTT TAT CTT TCT TGT CCC AGA GGA 3'	F	SPTgenómico
OMT16 spt-2R	5'ATC AAG CAT TGA AGC CTT ATC CGT 3'	R	SPTgenómico
OMT17 (lug-1F)	5'ATT CCT GGT AGG TTT GCT GTT CTG 3'	F	LUG genómico
OMT18 (lug-1R)	5'GTT TTT GCT GCT GAA GAA GAC CAG 3'	R	LUG genómico
oMT21	5'GAA TTC ATG GAT TGA AAT TGA GAG A 3'	R	TOP 1
OMT22(iaaMF)	5'TGA TCA C ATG TCA GCT TCA CCT CTC CTT GAT A 3'	F	IAAM
OMT23(iaaMR)	5'GAG CTC CTA ATT TCT AGT GCG GTA GTT ATA TCT CT 3'	R	IAAM
OMT33	5'ATT CGA CCC CCT GAA GCA ACC AAG GA 3'	F	SPTgenómico
OMT34	5'CAA CTA CGC ACC ACG GGT GAA GTA AG 3'	R	SPTgenómico
OMT45	5'GAA TTC ATG AAT CTT GAC CAA 3'	F	TOP 2
OMT47	5'AAG CTT GAA TTC AGT AGA AAG CAT ACA TAA TTA GAT AAT 3'	F	TOP 1 genómico
OMT48	5'AAG CTT GAA TTC ATG TAT AAA GAG ATT TTG AAA TTT 3'	F	TOP 1 genómico
OMT49	5'GGA TCC GAG CTC GTA CCG AGT AAT GCG TAG GGG CCC 3'	R	TOP 1 genómico
OMT55	5'CTG CAG GCGGCCG TGT AGG AAA TCT GCA TAT ATA 3'	F	TOP 1 genómico
OMT56bis	5'GGA TCC CAT TAT GAC TTA TCT GAT TTT C 3'	R	TOP 1 genómico
OMTGUS1	5'TGC ATC GGC GAA CTG ATC GT 3'	R	GUS genómico
OMTGUS2	5'CGT CGG TGA ACA GGT ATG GA 3'	F	GUS genómico
otl2THF(verOMNG4)	5'GAA TCC ATG ATG ACA GAT TTA 3'	F	TOP 4 ORF
otl2THR	5'GTC GAC TTG ATC CAA ATC AAA 3'	R	TOP 4 ORF
otp1THF(revisado)	5'GAA TTC ATG GAT CTA TCC CTG 3'	F	TOP 1 ORF

otp1THR	5'GTC GAC TGG ATT GAA ATT GAG 3'	R	TOP1 ORF
otp2THR	5'GTC GAC CTC TAA AGA TTT CC 3'	R	TOP2 ORF
p745	5' AAC GTC CGC AAT GTG TTA TTA AGT TGT C 3'	R	T-DNA Left Border de pDS-Lox TOL2
QRB3	5'CGC CAT GGC ATA TGC TAG CAT GCA TAA TTC 3'	R	T-DNA del Garlic en top1-4
SP6	5'ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3'	R	pGEM-T easy
SRS2:E	5'TGG GAG AAG CAA CCG GCA ACA TCG 3'		Genómico de STY2
SRSM	5'CAA CTT CAA TAC ACT ACA AAC CCA G 3'	F	Genómico de STY1
SS043	5'CCA ACG GCT CTG ATC CAA CAA TG 3'	R	TOP1 ORF
SS044	5'ACC GTC GAC AAC TAA ACA TAT ACA TAC 3'	F	TOP1 genómico
SS065	5'CCT CTC GAG TGA TAC TTT TGA TGA ATA TCT CAA C 3'	F	TOP2 genómico
SS066	5'GGA GGA TCC TCT TCA AAG CTC TAA AGA TTT CCC 3'	R	TOP2 ORF
SS070	5'CCC AGC GGA AAC AAC AAC CCT C 3'	F	TOP 1
SS071	5' AACGTATCATCACAGTGGTGG 3'	F	TOP4
SS079	5'AGA AAC AAT CGA ACC AGC AAG AGA AAG AAC AC 3'	F	TOP1 genómico
SS080	5'CTC AAC AGA CTC GTG ATC CCT AAA CAA CAC G 3'	R	TOP1 ORF
T7	5'TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'	F	pGEM-T easy
YAB3F	5'ATG TCG AGC ATG TCC ATG TCG TCC 3'	F	YAB3 ORF
YAB3R	5'GTT ATG GGC CAC CCC AAC GTT GGC 3'	R	YAB3 ORF



## **X. ANEXO II. CONSTRUCCIONES**

---



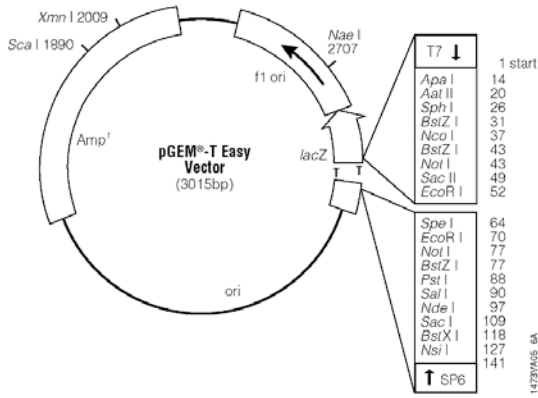
## NOMBRE pMT1

**ORIGEN** TOP1 ORF con sitios 5' Bam HI y 3' Sac I  
PCR sobre pSS065 con oligos OMT1 y OMT2

**PROPOSITO** paso previo para clonar en pGREENII-0029GR

### INSERTO TOP1 ORF

T7- EcoRI-BamHIOMT1 5'-TOP1-OMT2SacI 3'- EcoRI- SP6



**VECTOR**  
pGEM T-easy

**INSERTO**  
aprox. 1 Kb

**SECUENCIA**  
SI

**CEPA**  
E. coli

**RESISTENCIA**  
Ampicilina

**FECHA**  
01/02/2003

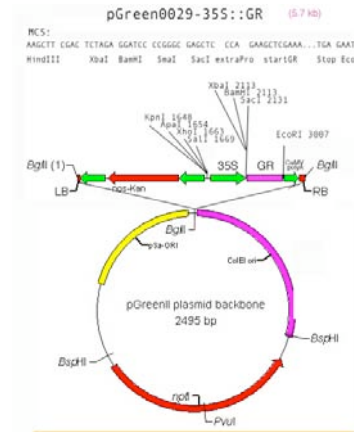
## NOMBRE pMT2

**ORIGEN** A partir de pMT1 y pGREEN0029-35S::GR cortados con BamHI y Sac I

**PROPOSITO** Infiltrar Arabidopsis. Actividad TOP 1 inducible.

### INSERTO TOP1 ORF

35S-BamHI-TOP1-SacI-GR



**VECTOR**

pG0029-35S::GR

**INSERTO**  
aprox. 1 Kb

**SECUENCIA**

**CEPA**

**RESISTENCIA**  
Kanamicina

**FECHA**

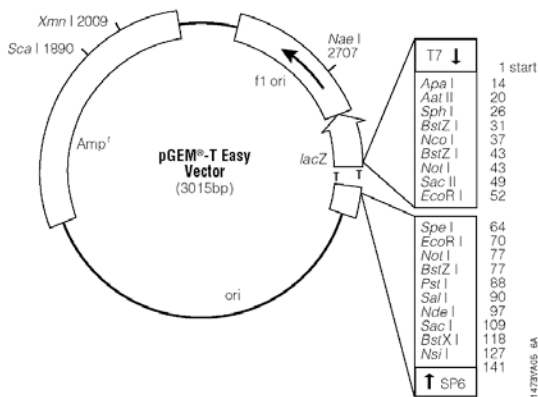
## NOMBRE pMT3

**ORIGEN** TOP2 ORF con sitios 5' BamHI y 3' Sac I.  
PCR sobre pSS066 con oligos OMT3 y OMT4

**PROPOSITO** Paso previo para clonar en pGREENII-0029GR

### INSERTO TOP2 ORF

T7-EcoRI- BamHIOMT3 5'-TOP2-OMT4SacI 3'-SP6



**VECTOR**  
pGEM T-easy

**INSERTO**  
aprox 1 kb

**SECUENCIA**  
SI

**CEPA**

**RESISTENCIA**  
Ampicilina

**FECHA**

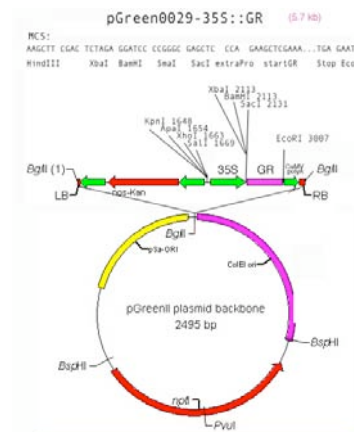
## NOMBRE pMT4

**ORIGEN** A partir de pMT3 y pGREEN0029-35S::GR cortados con BamHI y Sac I

**PROPOSITO** Infiltrar Arabidopsis. Actividad TOP 2 inducible.

### INSERTO TOP2 ORF

35S-BamHI-TOP2-SacI-GR



**VECTOR**

pG0029-35S::GR

**INSERTO**  
aprox. 1 Kb

**SECUENCIA**

**CEPA**

**RESISTENCIA**  
Kanamicina

**FECHA**



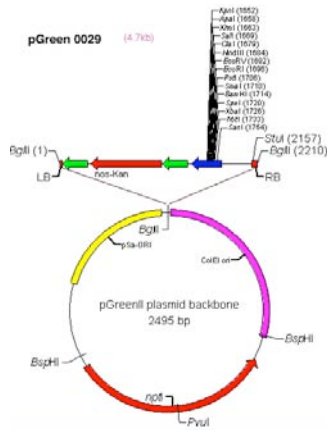
## NOMBRE pMT5

**ORIGEN** Ligación de CFM112 y pGREEN0029 cortados con HindIII y EcoRI. (5' TOP1::GUS)

**PROPOSITO** Infiltrar Arabidopsis y ver actividad 5' TOP1, mediante GUS

**INSERTO** 5' TOP1::GUS::nos-t

HindIII-5' TOP1- BamHI- GUS- SacI- nos-t- EcoRI



**VECTOR**  
pGREEN0029  
**INSERTO**  
aprox. 5,5 Kb  
3,5 Kb+1,8Kb+200  
**SECUENCIA**  
**CEPA**  
**RESISTENCIA**  
Kanamicina  
**FECHA**

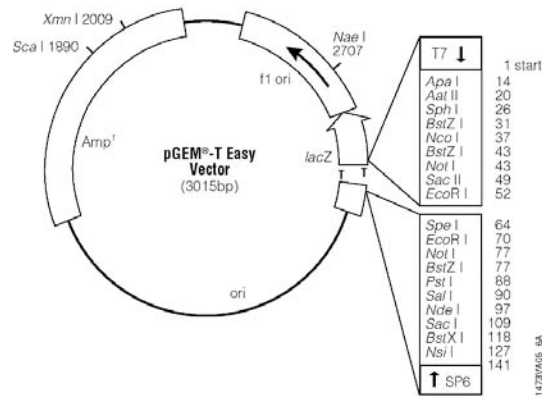
## NOMBRE pMT16.3

**ORIGEN** A partir de PCR sobre pSS065 con oligos oMT1(BamHI) y OMT21(EcoRI) metiendo el STOP

**PROPOSITO** Paso intermedio para sobreexpresión de TOP1. Se introducirá en el plásmido pG00229-35SGR quitando a este la GR

**INSERTO** TOP1 ORF

T7- EcoRI-BamHI OMT1 5' -TOP1-OMT21 EcoRI 3' - EcoRI- SP6



**VECTOR**  
pGREEN0029  
**INSERTO**  
aprox. 5,5 Kb  
3,5 Kb+1,8Kb+200  
**SECUENCIA**  
**CEPA**  
**RESISTENCIA**  
Kanamicina  
**FECHA**

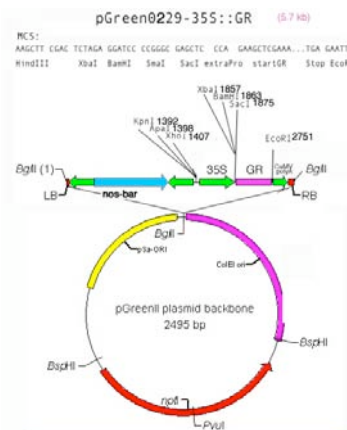
**VECTOR**  
**INSERTO**  
**SECUENCIA**  
correcta  
**CEPA**  
**RESISTENCIA**  
Ampicilina  
**FECHA**

## NOMBRE pMT17.15

**ORIGEN** A partir de pMT16.3 y pgreen022935S::GR (se quita la GR)cortando con BamHI y EcoRI

**PROPOSITO** Sobreexpresión de TOP1. Infiltrar plantas de Arabidopsis

**INSERTO** BamHI oMT1-TOP1-oMT21 EcoRI



**VECTOR**  
**INSERTO**  
**SECUENCIA**  
pMT17.15  
**CEPA**  
E. coli y  
**RESISTENCIA**  
Basta  
**FECHA**

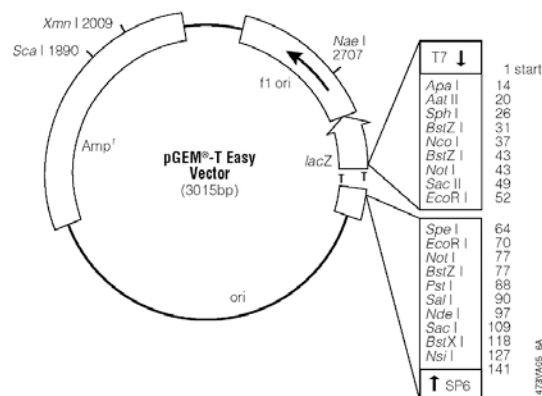
## NOMBRE pMN1

**ORIGEN** TOP1 CDS con sitios 5' Eco RI y 3' Sal I. PCR sobre pSS065 con oligos otp1 THR y otp1 THF

**PROPOSITO** Paso intermedio para clonar en el vector de levadura de dos híbridos.

**INSERTO** TOP1 CDS

T7 - SalI otp1 THR -3' TOP1 5'- otp1 THF EcoRI - SP6



**VECTOR**  
**INSERTO**  
**SECUENCIA**  
pMT17.15  
**CEPA**  
E. coli y  
**RESISTENCIA**  
Basta  
**FECHA**

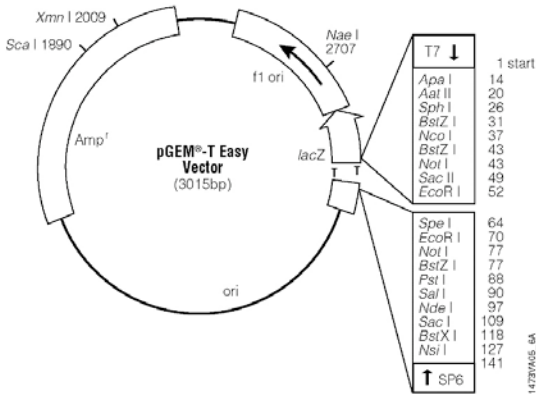
**VECTOR**  
pGEM-T easy  
**INSERTO**  
aprox. 1 Kb  
**SECUENCIA**  
si  
**CEPA**  
E. coli  
**RESISTENCIA**  
Ampicilina  
**FECHA**  
21/10/2004

**NOMBRE** pMN3

**ORIGEN** TOP4 CDS con sitios 5' Eco RI y 3' Sal I.  
PCR sobre pSS067 con oligos otl2 THR y oMNG4

**PROPOSITO** Paso intermedio para clonar en el vector de levadura de dos híbridos.

**INSERTO** TOP4 CDS  
T7 - EcoRI oMNG4 -5' TOP4 3'- otl2 THR SalI- SP6



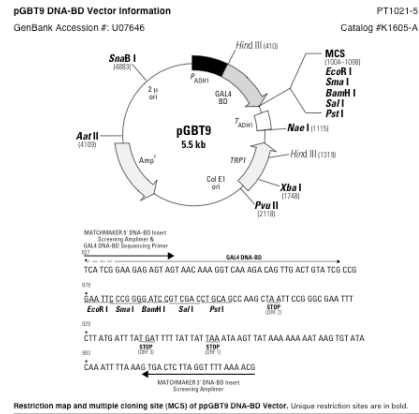
**VECTOR**  
pGEM - T easy  
**INSERTO**  
aprox. 1 Kb  
**SECUENCIA**  
si  
**CEPA**  
E.coli  
**RESISTENCIA**  
Ampicilina  
**FECHA**  
28/10/2005

**NOMBRE** pMT22

**ORIGEN** A partir de pMN1 cortando con EcoRI y SalI y pGBT9 cortando con EcoRI SalI

**PROPOSITO** Rastreo de una librería de Y2H. Con TOP1 en pGBT9

**INSERTO** TOP1 CDS



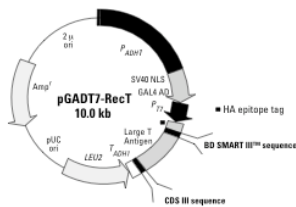
**VECTOR**  
5,5 Kb  
**INSERTO**  
1Kb TOP1  
**SECUENCIA**  
pMT22.6 bien  
**CEPA**  
**RESISTENCIA**  
Ampicilina  
**FECHA**

**NOMBRE** pMT22.6-92.3

**ORIGEN** positivo de interacción con TOP1 en Y2H. Es BRX-L4 en el plásmido de la librería pGADT7-REC

**PROPOSITO**

**INSERTO**



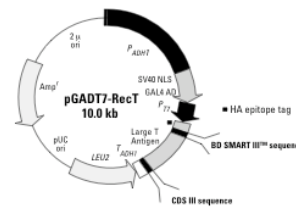
**VECTOR**  
**INSERTO**  
**SECUENCIA**  
**CEPA**  
**RESISTENCIA**  
**FECHA**

**NOMBRE** pMT22.6-137.3

**ORIGEN** positivo de interacción con TOP1 en Y2H. Es YABBY3 en el plásmido de la librería pGADT7-REC

**PROPOSITO**

**INSERTO**



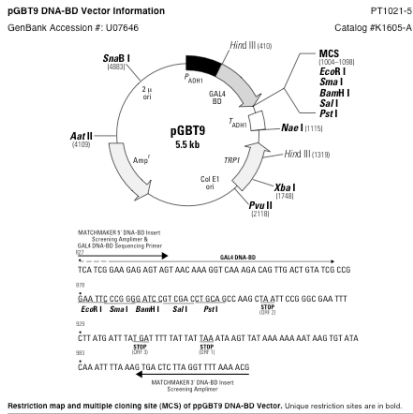
**VECTOR**  
**INSERTO**  
**SECUENCIA**  
**CEPA**  
**RESISTENCIA**  
**FECHA**

**NOMBRE** pMT23

**ORIGEN** a partir de pMN3 cortando con EcoRI y SalI y pGBT9 con EcoRI y SalI

**PROPOSITO** TOP4 en PGBT9 para Y2H

**INSERTO** TOP4 CDS



**VECTOR**

5,5kb

**INSERTO**  
TOP4 1Kb

**SECUENCIA**  
pMT23.1 bien

**CEPA**

**RESISTENCIA**  
ampicilina

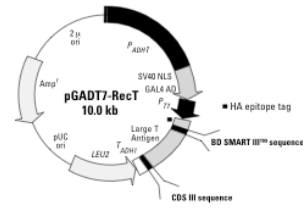
**FECHA**

**NOMBRE** pMT23.1-80.2

**ORIGEN** positivo de interacción con TOP4 en Y2H. Es YABBY3 en el plásmido de la librería pGADT7-REC

**PROPOSITO**

**INSERTO** YAB3



**VECTOR**

**INSERTO**

**SECUENCIA**

**CEPA**

**RESISTENCIA**

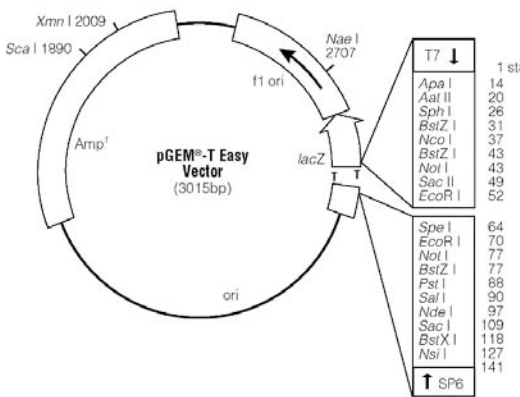
**FECHA**

**NOMBRE** ptop1-4 43/LB3

**ORIGEN** PCR de top1-4 con oligos SS043 y LB3

**PROPOSITO** secuenciar la inserción del T-DNA de top1-4

**INSERTO**



**VECTOR**

**INSERTO**

**SECUENCIA**  
SI

**CEPA**

E. coli

**RESISTENCIA**  
Ampicilina

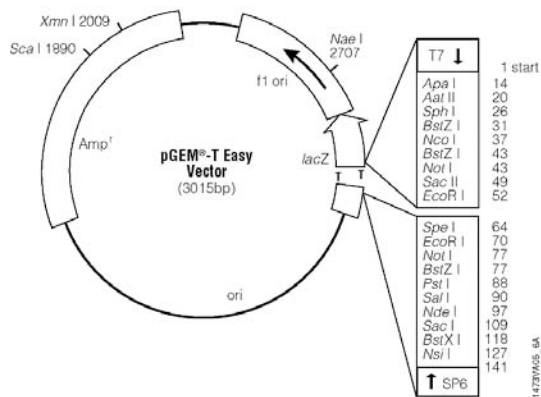
**FECHA**

**NOMBRE** ptop1-4 44/LB3

**ORIGEN** PCR de top1-4 con oligos SS044 y LB3

**PROPOSITO** secuenciar la inserción del T-DNA de top1-4

**INSERTO**



**VECTOR**

**INSERTO**

**SECUENCIA**  
si

**CEPA**

E. coli

**RESISTENCIA**

**FECHA**



