

ÍNDICE.....	I
ABREVIATURAS.....	XVII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. EL DESARROLLO VEGETAL.....	1
<u>1-1. Formación del fruto a partir del meristemo.....</u>	2
2. FACTORES HORMONALES QUE CONTROLAN EL DESARROLLO VEGETAL.....	4
<u>2-1. Hormonas vegetales.....</u>	4
2-1-1. Las Auxinas.....	4
2-1-2. Otras hormonas vegetales.....	6
3. EL DESARROLLO FLORAL. LAS FLORES COMO ÉXITO EVOLUTIVO.....	7
<u>3-1. El carpelo como hoja modificada.....</u>	7
4. EL DESARROLLO DEL FRUTO.....	8
5. <i>Arabidopsis thaliana</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO VEGETAL.....	9
<u>5-1. Aspectos generales.....</u>	9
5-2. Morfología y ciclo vital.....	10
6. <i>Arabidopsis thaliana</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DEL GINECEO.....	11
<u>6-1. El gineceo de <i>Arabidopsis</i>.....</u>	11
<u>6-2. Desarrollo floral en <i>Arabidopsis</i>.....</u>	15
7. FACTORES GENÉTICOS QUE CONTROLAN EL DESARROLLO DEL GINECEO EN <i>Arabidopsis</i>.....	17
<u>7-1. Genes que intervienen en el desarrollo del gineceo.....</u>	17
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
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.....	31

<u>8-1. Familia LAF.</u>	32
<u>8-2. Familia REM.</u>	33
<u>8-3. Familia ARF.</u>	34
<u>8-4. Familia RAV.</u>	35
8-4-1. La subfamilia TOP.	35
II. ANTECEDENTES.	39
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
III. OBJETIVOS.	47
1. OBJETIVO DE ESTA TESIS.	47
IV. RESULTADOS.	51
1. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LOS GENES <i>TOP</i>.	51
2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES <i>TOP</i>.	55
<u>2-1. Obtención de líneas de pérdida de función.</u>	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
<u>2-2. Caracterización fenotípica de los mutantes de pérdida de función <i>top</i>.</u>	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
2-2-4. Descripción de las alteraciones en el desarrollo vegetativo de los mutantes <i>top</i>	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
<u>2-3. Estudio de la expresión de los genes <i>TOP</i></u>	80
2-3-1. Localización del mRNA de <i>TOP1</i> y <i>TOP2</i> mediante hibridación <i>in situ</i>	80
2-3-2. Generación de la construcción pMT5 (<i>TOP1</i>_{pro}::<i>GUS</i>) y análisis de expresión del gen delator en planta	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
2-3-3. Tratamiento con NPA y 2-4D de plantas de la línea pMT5	91
2-3-4. Expresión de <i>TOP1</i>_{pro}::<i>GUS</i> en fondo mutante <i>top1-3 top2-2</i>	92
<u>2-4. Obtención y caracterización de líneas de ganancia de función</u>	93
2-4-1. Obtención y caracterización de las líneas de ganancia de función inducibles pMT2 y pMT4	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
2-4-2. Obtención y caracterización de la línea de sobreexpresión pMT17.....	99
<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
3. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES GENÉTICAS DE <i>TOP1</i> Y <i>TOP2</i> CON OTROS GENES RELACIONADOS.	108
<u>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>.</u>	108
3-1-1. Análisis de las interacciones con <i>STYLISH</i>.	109
<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_{pro}::GUS</i> y <i>TOP1_{pro}::GUS</i> en distintos fondos mutantes.</u>	115
3-1-2. Análisis de las interacciones con <i>LEUNIG</i>.	116
<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_{pro}::GUS</i> en <i>lug-1</i>.</u>	119
3-1-3. Análisis de las interacciones con <i>YUCCA</i>.	120
3-1-4. Análisis de las interacciones con <i>SPATULA</i>.	121
<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_{pro}::GUS</i> y <i>TOP1_{pro}::GUS</i> en distintos fondos mutantes.</u>	125
3-1-5. Análisis de las interacciones con <i>ETTIN</i>.	129

<u>Análisis de los fenotipos mutantes</u>	130
<u>Análisis de la expresión de la línea reportadora <i>TOP1_{pro}::GUS</i> en el fondo mutante <i>ett-3</i></u>	131
<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>	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
4. RASTREO DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN EN LEVADURAS DE cDNA DE <i>Arabidopsis</i> MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO	139
<u>4-1. Generación de las construcciones cebo <i>pMT22</i> y <i>pMT23</i> y levaduras recombinantes</u>	140
<u>4-2. Rastreo de la genoteca de doble híbrido y obtención de clones positivos</u>	140
4-2-1. YABBY3.....	142
4-2-2. BRX-L4.....	143
V. DISCUSIÓN	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
VI. CONCLUSIONES	181

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

2-4-3. Extracción de DNA en gel.	195
2-4-4. Reacciones de ligación de DNA.	195
<u>2-5. Transformación de bacterias</u>	195
2-5-1.Preparación de células competentes y transformación por electroporación.....	195
<u>2-6. Secuenciación de DNA.</u>	196
3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	196
<u>3-1.Generación de ribosondas marcadas con digoxigenina.</u>	196
<u>3-2. Cuantificación de las sondas.</u>	197
<u>3-3. Prehibridación e hibridación.</u>	198
<u>3-4. Inmunodetección colorimétrica de la señal.</u>	198
4.BIOLOGÍA CELULAR/ ANÁLISIS FENOTÍPICO TÉCNICAS DE HISTOLOGÍA VEGETAL.	199
<u>4-1. Observación y fotografía a bajo aumento.</u>	199
<u>4.2. Técnicas de microscopía.</u>	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
<u>4-3. Histología.</u>	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
5.TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS Y GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.	205

<u>5-1. Diseño de la construcción <i>pMT17</i> para la expresión constitutiva de <i>TOP1</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>.</u>	205
<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>	205
<u>5-3. Diseño de la construcción <i>pMT5</i> para la expresión de <i>TOP1</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>.</u>	206
<u>5-4. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</u>	206
<u>5-5. Realización de cruzamientos.</u>	207
6. TRATAMIENTOS DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS.	207
<u>6-1. Tratamiento con dexametasona de las plantas <i>pMT2</i> y <i>pMT4</i>.</u>	207
<u>6-2. Tratamiento con NPA y 2-4D de la línea <i>PMT5</i>.</u>	208
7. SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO.	209
<u>7-1. Cepas de levadura</u>	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
<u>7-2. Plásmidos</u>	215
<u>7-3. Cepas bacterianas</u>	216
7-3-1. Medios de cultivo.	216
<u>7-4. Diseño de las construcciones cebo para el sistema del doble híbrido.</u>	217
7-4-1. Construcción de los plásmidos cebo.	217
<u>7-5. Ensayo de la actividad de las proteínas codificadas por los genes delatores.</u>	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>	<u>218</u>
<u>7-7. Comprobación de la interacción entre TOP1 y YAB3, TOP1 y BRX-L4, TOP4 y YAB3, TOP4 y BRX-L4.</u>	<u>219</u>
VIII. BIBLIOGRAFÍA	223
IX. ANEXO 1. CEBADORES.....	241
X. ANEXO II. CONSTRUCCIONES.....	247
ÍNDICE FIGURAS	IX
Figura I-1. Representación esquemática de las regiones funcionales del meristemo apical del tallo.	3
Figura I-2. Diferentes estadios del desarrollo de Arabidopsis.....	10
Figura I-3. Ciclo vital de Arabidopsis.	11
Figura I-4. Micrografía electrónica de barrido coloreada de una flor de Arabidopsis.....	12
Figura I-5. Micrografía electrónica de barrido del gineceo de Arabidopsis en antesis.....	12
Figura I-6. Micrografía electrónica de barrido del gineceo de Arabidopsis	13
Figura I-7. Sección transversal de un fruto de Arabidopsis.....	14
Figura I-8. Estadios de desarrollo del gineceo de Arabidopsis.	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 Arabidopsis 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 top1-1D.	39
Figura II-2. Atenuación del fenotipo en el fruto de la líneas top1-1D en las generaciones siguientes.	40
Figura II-3. Esquema explicativo de los fenotipos atenuados de los frutos top1-1D.....	40
Figura II-4. Fenotipos vegetativos de la línea top1-1D.	41

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

Figura IV-19. Haces vasculares en gineceo silvestre en antesis	72
Figura IV-20. Haces vasculares en distintos gineceos <i>top</i> en antesis	74
Figura IV-21. Esquema del tallo de <i>Arabidopsis</i>	75
Figura IV-22. Secciones transversales de tallo teñidas con azul de toluidina para la detección de lignina	76
Figura IV-23. Esquema de los haces vasculares en los cotiledones de plantas silvestres	77
Figura IV-24. Fenotipo de las hojas de roseta de los distintos mutantes <i>top</i>	78
Figura IV-25. Raíces clareadas con hidrato de cloral y un esquema de las zonas de la raíz	79
Figura IV-26. Localización del mRNA de <i>TOP1</i> (A) y <i>TOP2</i> (B) mediante hibridación <i>in situ</i>	81
Figura IV-27. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro}::GUS</i> durante el desarrollo de la flor y del fruto	82
Figura IV-28. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro}::GUS</i> durante el desarrollo de los óvulos y las semillas	85
Figura IV-29. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro}::GUS</i> en cotiledones	86
Figura IV-30. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro}::GUS</i> en cotiledones y en hojas	87
Figura IV-31. Esquemas de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	88
Figura IV-32. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro}::GUS</i> durante el desarrollo de la raíz	88
Figura IV-33. Esquema comparativo de la distribución de la auxinas y sus transportadores en la raíz de <i>Arabidopsis</i>	90
Figura IV-34. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro}::GUS</i> en otras partes de la planta	90
Figura IV-35. Tratamientos de las plantas <i>pMT5</i> con auxinas (2-4D) y con inhibidores del transporte polar de las mismas (NPA)	91
Figura IV-36. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro}::GUS</i> en <i>top1-3 top2-2</i>	92
Figura IV-37. Fenotipo de los frutos <i>pMT2</i> sin inducir con dexametasona	94
Figura IV-38. Fenotipo de los frutos <i>pMT4</i> sin inducir con dexametasona	95
Figura IV-39. Fenotipo de las hojas de roseta de plantas <i>pMT2</i> crecidas en distintas concentraciones de dexametasona	96
Figura IV-40. Comparación del fenotipo del fruto en la línea <i>pMT14-4</i> al tratar o no con dexametasona	98
Figura IV-41. Fenotipo de las hojas de roseta de las plantas <i>pMT17</i>	99

Figura IV-42. Comparación de los tamaños de los 10 primeros frutos de las líneas <i>pMT17</i> frente a los del silvestre	100
Figura IV-43. Comparación de fenotipos de la plantas <i>pMT17-1</i> heterocigóticas y homocigóticas	101
Figura IV-44. Comparación del tamaño del estilo.....	102
Figura IV-45. Estudio de los tipos celulares del gineceo de <i>pMT17</i>	104
Figura IV-46. Patrón de lignificación de <i>pMT17</i>	105
Figura IV-47. Patrón de los haces vasculares en el gineceo de <i>pMT17</i>.....	107
Figura IV-48. Alteraciones en el patrón vascular en cotiledones.....	107
Figura IV-49. Otras alteraciones de las plantas <i>pMT17</i>.....	108
Figura IV-50. Comparación <i>STY-TOP</i>	111
Figura IV-51. Defectos en la fusión del septum y de fertilidad.....	112
Figura IV-52. Alteraciones en las regiones apicales del gineceo de las distintas combinaciones de mutantes <i>top</i> y <i>sty</i>	113
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>	114
Figura IV-54. Comparación del patrón de los haces vasculares de las distintas combinaciones mutantes <i>top sty</i>	114
Figura IV-55. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro} ::GUS</i> en distintos fondos mutantes <i>sty</i>	115
Figura IV-56. Patrón de expresión de <i>STY1_{pro}::GUS</i> en distintos fondos mutantes <i>top</i>	116
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>	117
Figura IV-58. Alteraciones en el gineceo de los mutantes <i>top lug</i> en comparación con las de <i>lug</i>.....	118
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>	119
Figura IV-60. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro} ::GUS</i> en el fondo mutante <i>lug-1</i>	119
Figura IV-61. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro} ::GUS</i> en <i>35S::YUC1</i>	121
Figura IV-62. Alteraciones de las regiones apicales del gineceo de mutantes <i>top spt</i>.....	122
Figura IV-63. Comparación del tamaño de los 10 primeros frutos	123

Figura IV-64. Aspecto del septum tras la dehiscencia de las valvas en frutos	123
Figura IV-65. Alteraciones en los haces vasculares de los mutantes <i>top spt</i>	124
Figura IV-66. Patrón de expresión de <i>SPT</i>	126
Figura IV-67. Patrón de expresión de <i>SPT_{pro}::GUS</i> en fondo silvestre y en fondo <i>top1-3</i>	127
Figura IV-68. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro}::GUS</i> en fondo silvestre, en fondo <i>spt-2</i> y en fondo <i>35S::SPT</i>	128
Figura IV-69. Fenotipo de dos plántulas <i>35S::TOP1 35S::SPT</i>	129
Figura IV-70. Alteraciones del gineceo del triple mutante <i>top1-3 top2-2 ett-3</i>	130
Figura IV-71. Patrón de expresión de <i>TOP1_{pro}::GUS</i> en fondo <i>ett-3</i>	131
Figura IV-72. Secciones transversales de frutos teñidos con floroglucinol para la detección de lignina	133
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	134
Figura IV-74. Alteraciones del doble mutante <i>top1-3 ful-2</i>	135
Figura IV-75. Alteraciones del triple mutante <i>top1-3 shp1 shp2</i>	137
Figura IV-76. Patrón de expresión de <i>INDpro::GUS</i> en distintos fondos genéticos	137
Figura IV-77. Alteraciones del doble mutante <i>top1-3 rpl-1</i>	138
Figura IV-78. Confirmación de las interacciones proteína-proteína de TOP1 y TOP4 con YAB3 y BRX-L4	142
Figura IV-79. <i>YAB3</i> y los genes <i>TOP</i>	143
Figura IV-80. Comparación de los patrones de expresión de <i>TOP1_{pro}::GUS</i> y <i>BRX_{pro}::GUS</i>	144
Figura V-1. Esporocarpos de <i>Marchantia polymorpha</i>	147
Figura V-2. Distintas posibilidades de interacción genética entre <i>TOP</i> y <i>STY</i>	153
Figura V-3. Secuencias promotoras de <i>YUC2</i> y <i>YUC4</i>	154
Figura V-4. Secuencia promotora de <i>TOP1</i>	156
Figura V-5. Distintas posibilidades de interacción genética entre <i>TOP</i> y <i>LUG</i>	157
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>	158
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>	159

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

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