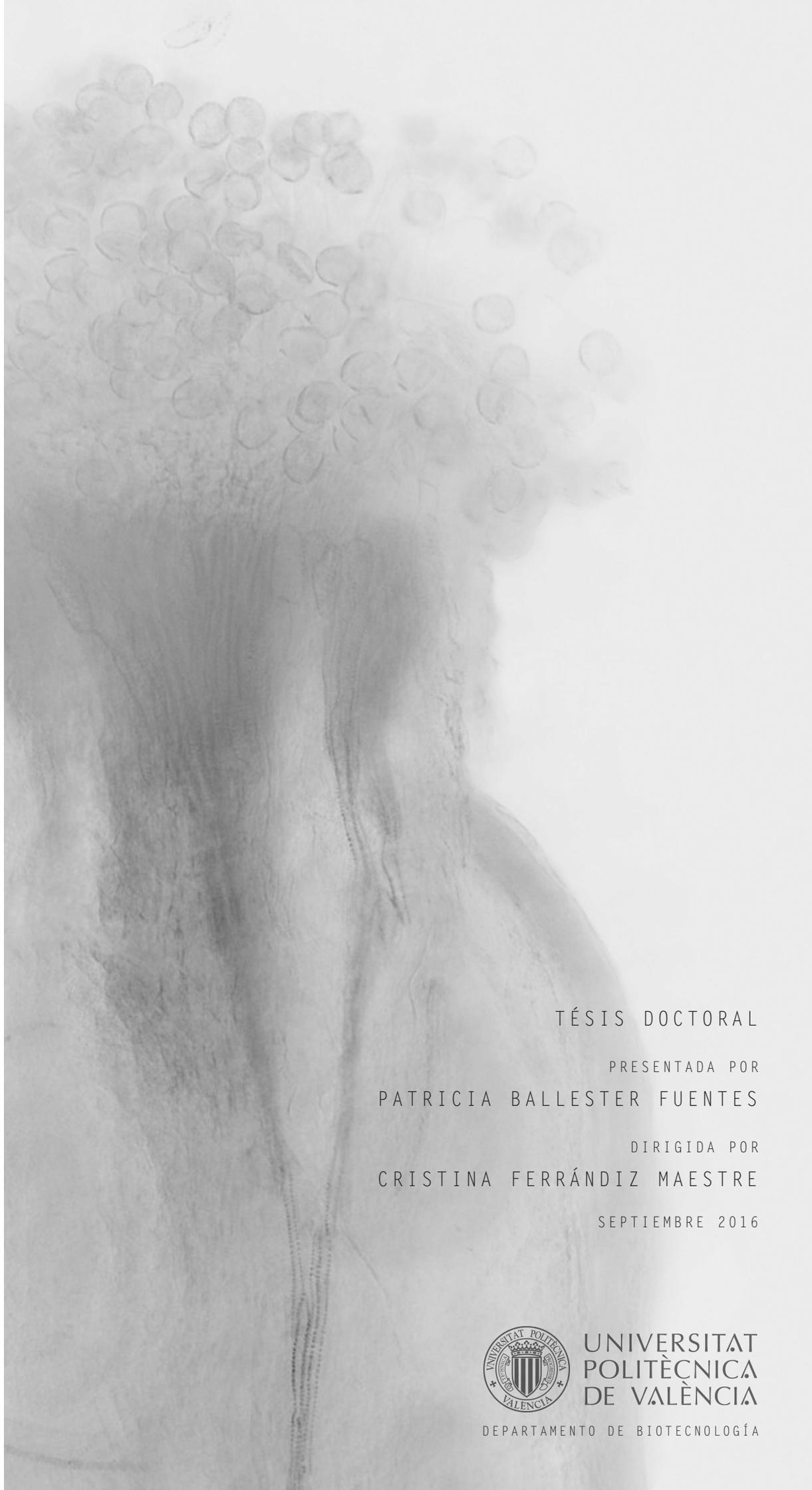


*LOS GENES NGATHA* ANÁLISIS GENÉTICO Y MOLECULAR DE  
SU PAPEL EN LA MORFOGÉNESIS DEL GINECEO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*



TÉSIS DOCTORAL

PRESENTADA POR  
PATRICIA BALLESTER FUENTES

DIRIGIDA POR  
CRISTINA FERRÁNDIZ MAESTRE

SEPTIEMBRE 2016



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA





UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología

**Los genes *NGATHA*: análisis genético y molecular de su papel en la morfogénesis del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.**

Memoria presentada por

**PATRICIA BALLESTER FUENTES**

para optar al grado de

**DOCTOR**

por la Universidad Politécnica de Valencia

Directora:

**CRISTINA FERRÁNDIZ MAESTRE**

Tutora:

**LYNNE PAULA YENUSH**



Valencia, Septiembre 2016



Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (Beca/Contrato JAE Predoctoral a PBF), por el Ministerio de Economía y Competitividad (DGI BIO2012-32902), por el Ministerio de Ciencia e Innovación (DGI BIO2009-09920) y por la Unión Europea (EVOCODE: FP7-PEOPLE- PIRSES-2009-247589).



*A mi hermano y mis padres, quienes siempre me dijeron que, con trabajo duro y determinación, podría ser todo lo que me propusiera. Gracias por estar siempre ahí.*

*A mi marido, Manuel, por su amor, paciencia e infinito apoyo.*



## RESUMEN

La familia de los genes *NGATHA* (*NGA*) está formada por cuatro genes muy relacionados, *NGA1*, *NGA2*, *NGA3* y *NGA4*, que codifican factores de transcripción con un dominio B3 de unión a DNA. Dentro de los genes B3, los genes *NGA* forman un subgrupo diferenciado de la subfamilia *RAV*, ya que, a diferencia del resto de sus miembros, carecen del dominio AP2 que sí poseen otros genes *RAV* (Álvarez et al., 2006).

Los genes *NGA* son funcionalmente redundantes en el desarrollo del estilo y el estigma de una manera dosis-dependiente. Mientras que los mutantes individuales en los diferentes genes *NGA* no presentan defectos en la morfología del carpelo o los defectos son muy sutiles, los mutantes múltiples presentan defectos cada vez mayores en el desarrollo de la parte apical del gineceo que está completamente alterada en el cuádruple mutante. Este fenotipo mutante está relacionado con la falta de activación en el dominio apical del gineceo de los genes *YUCCA2* y *YUCCA4* (*YUC2/4*), que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de auxinas. Los fenotipos mutantes de *NGA* son muy similares a los causados por las mutaciones en la familia de factores de transcripción *SHORT INTERNODES/STYLISH* (*SHI/STY*) de tipo RING-like zinc-finger. Se ha mostrado que *NGA* y *STY* cooperan para promover la especificación del estilo, dirigiendo la síntesis de auxinas mediada por YUC en el dominio apical del gineceo (Trigueros et al, 2009). Por otro lado, los fenotipos de los mutantes *nga* y de las líneas de sobreexpresión de *NGA* recuerdan a los fenotipos observados en fondos donde la expresión de otros genes con funciones relevantes en la morfogénesis del gineceo está alterada, como son: *FRUITFULL* (*FUL*), *HECATE* (*HEC*), *INDEHISCENT* (*IND*), *SPATULA* (*SPT*), etc. Así, es posible inferir que los genes *NGA* tienen un papel clave en este proceso, aunque su relación genética con otros factores importantes en el mismo no está clara, por lo que en la presente tesis hemos pretendido realizar un análisis genético detallado para determinar su posición y papel en estas rutas.

Para ello, la primera aproximación que hemos abordado ha sido el intentar determinar posibles reguladores de estos genes. Dado que los genes *NGA* muestran patrones de expresión casi idénticos, parecía probable que tuvieran reguladores comunes, por lo que se realizó un análisis informático de los promotores de los genes *NGA* en busca de las regiones más conservadas. En este análisis identificamos una región de 270 pb conservada en todos los promotores, en la que además se puede distinguir un subdominio de 50 pb muy similar entre todos ellos. Esta región presenta también similitud con un fragmento del promotor de *STYLISH1* (*STY1*), cuyo patrón de expresión es muy similar al de los genes *NGA*, y que por tanto también podría compartir reguladores.

Hemos utilizado estos dominios conservados para llevar a cabo escrutinios de genotecas de híbrido simple en levadura, gracias a los cuales hemos identificado como posibles reguladores de los genes *NGA* a un factor de transcripción de la familia de los *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)*, así como a tres miembros de la familia de genes *TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, AND PROLIFERATING CELL FACTORS (TCP)*. Tras la identificación de los reguladores candidatos, se han llevado a cabo distintos análisis moleculares para confirmar la unión de estos a los promotores de los genes *NGA*. También, para validar su interacción genética, hemos caracterizado los mutantes y las líneas de sobreexpresión de estos posibles reguladores, así como las combinaciones genéticas de los mutantes correspondientes con las líneas reportadoras de *NGA* y con mutantes de pérdida y ganancia de función *NGA* .

Además de la identificación de posibles reguladores, en esta tesis doctoral nos interesaba profundizar en el análisis de las interacciones genéticas de *NGA* y otros factores clave en la morfogénesis de los tejidos apicales del gineceo. Habíamos observado que las líneas de sobreexpresión de *HEC1, HEC3* y *NGA3* presentaban fenotipos similares en el fruto: ovarios reducidos, regiones apicales aumentadas y ginóforos largos, fenotipos similares a los de mutantes afectados en la señalización de auxinas. Por ello, gran parte de este análisis se ha centrado en determinar la relación funcional entre *NGA* y *HEC*. Para investigar la jerarquía regulatoria entre ambos factores hemos llevado a cabo análisis genéticos combinando las líneas reportadoras de estos genes con los mutantes *nga* o *hec*, o con las líneas de sobreexpresión. Por otro lado hemos realizado diferentes ensayos moleculares, mediante los cuales hemos comprobado que ambos factores actúan al mismo nivel formando parte de un complejo transcripcional con actividad cooperativa.

Por otra parte, en esta tesis se muestra también cómo, mediante análisis genéticos y moleculares similares en los que hemos incluido otros genes de la familia bHLH, hemos deducido la necesaria participación de las proteínas *NGA* en un complejo de mayor orden formado posiblemente por *NGA, HEC* y también los factores *IND* y *SPT*, que sería necesario para la correcta señalización de auxinas durante la morfogénesis del gineceo y la formación del estigma en *Arabidopsis thaliana*.

## RESUM

La família dels gens *NGATHA* (*NGA*) està formada per 4 gens molt relacionats (*NGA1*, *NGA2*, *NGA3* i *NGA4*) que codifiquen factors de transcripció amb un domini B3 d'unió a DNA. Els gens *NGA* pertanyen a la subfamília RAV dins dels gens B3, ja que, a diferència de la resta dels seus membres, formen un subgrup diferenciat que no té el domini AP2 que sí posseeixen altres gens RAV (Alvarez et al. 2006).

Els gens *NGA* són funcionalment redundants en el desenvolupament de l'estil i l'estigma d'una manera dosi-depenent. Mentre que els mutants individuals en els diferents loci *NGA* no presenten defectes en la morfologia del carpel, o els defectes són molt subtils, els mutants múltiples presenten defectes cada vegada majors en el desenvolupament de la part apical del gineceu que està completament alterada en el quàdruple mutant (Alvarez et al. 2009; Trigueros et al. 2009). Aquest fenotip mutant està relacionat amb la falta d'activació de dos enzims de la ruta de biosíntesi d'auxines, *YUCCA2* (*YUC2*) i *YUC4*, en el domini apical del gineceu. Els fenotips mutants de *NGA* són molt similars als causats per les mutacions en la família de factors de transcripció *SHORT INTERNODES / STYLISH* (*SHI / STY*) de tipus RING-like zinc-finger. S'ha observat que *NGA* i *STY* cooperen per promoure l'especificació de l'estil, dirigint la síntesi d'auxines mediada per *YUCCA*, en el domini apical del gineceu (Trigueros et al. 2009). D'altra banda, els fenotips dels mutants *nga* i de les línies de sobreexpressió de *NGA* recorden als fenotips observats en fons on l'expressió d'altres gens amb funcions rellevants en la morfogènesi del gineceu està alterada, com són: *FRUITFULL* (*FUL*), *HECATE* (*HEC*), *INDEHISCENT* (*IND*), *SPATULA* (*SPT*), etc. Així, és possible inferir que els gens *NGA* tenen un paper clau en aquest procés, encara que la seua relació genètica amb altres factors importants en el mateix no està clara, pel que en la present tesi hem volgut realitzar una anàlisi genètic profund per a determinar la seua posició i paper en aquestes rutes.

Per això, la primera aproximació que hem abordat ha sigut intentar determinar possibles reguladors d'aquests gens. Degut a que els gens *NGA* mostren patrons d'expressió quasi idèntics, semblava probable que tinguessin reguladors comuns, pel que es va realitzar una anàlisi informàtic dels promotors dels gens *NGA* per a buscar les regions més conservades. En aquest anàlisi identificarem una regió de 270 pb conservada en tots els promotors, en la que a més es pot distingir un subdomini de 50 pb molt similar entre tots ells. Esta regió presenta també similitud amb un fragment del promotor de *STYLISH1* (*STY1*), el patró d'expressió del qual és molt similar a la dels gens *NGA*, i que per tant també podria compartir reguladors.

Hem utilitzat aquests dominis conservats per dur a terme escrutinis de genoteques de simple híbrid en llevat, gràcies als quals hem identificat com a possibles reguladors dels

gens *NGA* un factor de transcripció de la família dels *SQUAMOSA PROMOTOR BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)*, així com tres membres de la família de gens *TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, AND PROLIFERATING CELL FACTORS (TCP)*. Després de la identificació dels reguladors candidats, s'han dut a terme diferents anàlisis moleculars per confirmar la unió d'estos als promotors dels gens *NGA*. També hem caracteritzat mutants i les línies de sobreexpressió d'aquests possibles reguladors, així com les combinacions genètiques dels mutants corresponents amb les línies reportadores de *NGA* i amb mutants de pèrdua i ganància de funció de *NGA* per validar la seua relació genètica.

A més de la identificació de possibles reguladors, en aquesta tesi doctoral ens interessava aprofundir en l'anàlisi de les interaccions genètiques de *NGA* i altres factors clau en la morfogènesi dels teixits apicals del gineceu. Havíem observat que les línies de sobreexpressió de *HEC1, HEC3* i *NGA3* presentaven fenotips similars en el fruit: ovaris reduïts, regions apicals augmentades i ginófors llargs (Gremski et al. 2007), fenotips similars als de mutants afectats en la senyalització d'auxines. Per això, gran part d'aquest anàlisi s'ha centrat en determinar la relació funcional entre *NGA* i *HEC*. Per investigar la jerarquia regulatòria entre els dos factors hem dut a terme anàlisis genètics combinant les línies reportadores d'aquests gens amb els mutants *nga* o *hec*, o amb les línies de sobreexpressió. D'altra banda hem realitzat diferents assajos moleculars, mitjançant els quals hem comprovat que els dos factors actuen al mateix nivell formant part d'un complex transcripcional amb activitat cooperativa.

D'altra banda, es mostra també que, per mitjà d'anàlisis genètics i moleculars semblants en què hem inclòs altres gens de la família bHLH, hem deduït la necessària participació de *NGA* en un complex de major ordre format possiblement per *NGA, HEC* i també els factors *IND* i *SPT*, que seria necessari per a la correcta senyalització d'auxines durant la morfogènesi del gineceu i la formació de l'estigma en *Arabidopsis thaliana*.

## SUMMARY

The *NGATHA* (*NGA*) gene family is composed of four highly related genes: *NGA1*, *NGA2*, *NGA3*, *NGA4*, which encode transcription factors with a B3 DNA-binding domain. The *NGA* genes form a subgroup within the *RAV* clade in the *B3* gene family, characterized by the lack of the AP2 domain which is present in the other *RAV* genes (Alvarez et al., 2006).

The *NGA* genes are functionally redundant in the development of the style and the stigma in a dose-dependent manner. While the single mutants in the *NGA* genes only show very subtle or no defects in carpel morphology, the multiple mutants exhibit greater defects in the development of the apical part of the gynoecium, which is completely altered in the quadruple mutant. This phenotype is related with the lack of activation, in the apical part of the gynoecium, of the *YUCCA2* and *YUCCA4* (*YUC2/4*) genes, which encode enzymes involved in auxin synthesis. The phenotype of the *nga* mutants is very similar to that of the mutants in the *SHORT INTERNODES/STYLISH* (*SHI/STY*) genes, which encode RING-like zinc-finger type transcription factors. It has been shown that *NGA* and *STY* work together to promote style specification, directing the YUC-mediated auxin synthesis in the apical part of the gynoecium (Trigueros et al., 2009). In addition, the phenotypes of the *nga* mutants and of the plants over-expressing *NGA*, resemble those observed in genotypes with altered expression of genes with relevant functions in gynoecium morphogenesis such as *FRUITFULL* (*FUL*), *HECATE* (*HEC*), *INDEHISCENT* (*IND*), *SPATULA* (*SPT*), etc. Thus, it can be inferred that the *NGA* genes have a key role in gynoecium morphogenesis, though their genetic interaction with the network of genes controlling this process is still unclear; therefore, in this thesis we have carried out a detailed genetic analysis to determine the position and role of *NGA* genes in this network.

With this aim, our first approach has been to identify and characterize regulators of the expression of *NGA* genes. As the four *NGA* genes show almost identical expression patterns, it seemed likely that they shared common regulators. For that reason, we made a bioinformatic analysis of the promoter regions of the *NGA* genes looking for conserved regions. In this analysis we identified a 270 bp region conserved in the four promoters; moreover, a 50 bp subdomain with very high similarity among the four promoters was found in this region. Interestingly, this region also shows similarity with a fragment in the promoter of the *STY1* gene, whose expression pattern is very similar to that of the *NGA* genes and that, therefore, could also share regulators with those genes. We have used these conserved domains to carry out yeast one-hybrid screenings of *Arabidopsis* cDNA libraries. These screenings led to the identification of a transcription

factor from the *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* family of and of three transcription factors from the *TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, AND PROLIFERATING CELL FACTORS (TCP)* family as candidates to regulate *NGA* expression. After the identification of these candidates, different molecular analysis have been carried out to confirm the binding of these transcription factors to the promoters of the *NGA* genes. To validate their genetic interaction we have also characterized mutants and over-expression lines of these candidates, as well as genetic combinations of these mutants with reporter and loss- and gain-of-function lines of the *NGA* genes.

In addition to the identification of regulators, in this thesis we were interested in analyzing in detail the genetic interactions of *NGA* genes with other genes with a key role in the development of the gynoecium apical tissues. We had observed that over-expression lines of *HEC1*, *HEC3* and *NGA3*, showed similar phenotypes in the fruit: reduced ovaries and enlarged apical regions and gynophores, similar phenotypes to those of mutants affected in auxin signaling. For that reason, a great part of our analysis has been focused to elucidate the functional relationship between *NGA* and *HEC*. To study the regulatory hierarchy between both factors we have carried out genetic analysis combining reporter lines of these genes with mutants in *NGA* or *HEC* or with their over-expression lines. We have also carried out several molecular assays which had allowed us to conclude that both factors act at the same level, forming part of a transcriptional complex with cooperative activity.

Finally, this thesis shows how, though similar genetic and molecular analysis in which other genes of the bHLH transcription factor family have been included, we have inferred the participation of the *NGA* proteins in a high-order complex, possibly composed by *NGA*, *HEC* and the *IND* and *SPT* proteins, which would be required for correct auxin signaling during gynoecium morphogenesis and stigma development in *Arabidopsis thaliana*.

## ABREVIATURAS

**3-AT:** 3-amino-1,2,4-triazol

**6-BAP:** 6-bencil-aminopurina

**%:** por ciento

**°C:** grados centígrados

**µg:** microgramos

**µl:** microlitros

**µM:** micromolar

**A:** adenina

**Arabidopsis:** *Arabidopsis thaliana*

**Amp<sup>r</sup>:** resistencia a ampicilina.

**DNA:** ácido desoxirribonucleico.

**RNA:** ácido ribonucleico

**RNA<sup>m</sup>:** ARN mensajero.

**RNA<sup>i</sup>:** ARN de interferencia

**Basta:** glufosinato de amonio.

**BiFC:** Complementación Fluorescente Bimolecular.

**BSA:** SÉRUM de albumina bovina.

**C:** citosina

**CaMV 35S:** promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

**cDNA:** DNA complementario.

**ChIP:** inmunoprecipitación de la cromatina (*Chromatine Immuno Precipitation*)

**ChIP-seq:** ChIP acoplado a un proceso de secuenciación masiva

**cm:** centímetros.

**Col-0:** ecotipo Columbia.

**C-terminal:** carboxilo terminal.

**dNTP:** desoxinucleósidos trifosfato.

**E:** Escala

**EDTA:** etilen-diamino-tetraacetato sódico.

**EMS:** etilmetanosulfonato.

**et al.:** y otros.

**Fig.:** figura.

**g:** gramos.

**Gen<sup>r</sup>:** resistencia a gentamicina

**G:** guanina

**GFP:** proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*).

**His:** histidina

**Hygro<sup>r</sup>:** resistencia a higromicina.

**IAA:** ácido indolacético.

**Kan<sup>r</sup>:** resistencia a kanamicina.

**kb:** kilobases.

**kcal:** kilocalorías..

**lacZ:** β-galactosidasa.

**LB:** medio Luria-Bertani.

**Ler:** ecotipo Landsberg, portador de la mutación erecta.

**Leu:** leucina

**m:** metros.

**M:** molar.

**MES:** ácido 4-morfolino-etano-sulfónico.

**mg:** miligramos.

**min:** minutos.

**ml:** mililitros.

**mm:** milímetros.

**mM:** milimolar.

**MS:** medio de Murashige y Skoog.

**ng:** nanogramos.

**NLS:** señal de localización nuclear (*Nuclear Localization signal*).

**nm:** nanomoles.

**nM:** nanomolar.

**NPA:** ácido 1-N-naphtylphtalamico.

**pág.:** página.

**PAT:** transporte polar de auxinas (*Polar Auxin Transport*).

**pb:** pares de bases.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chair Reaction*)

**PEG:** polietilen glicol

**qRT-PCR:** PCR cuantitativa a tiempo real.

**rpm:** revoluciones por minuto.

**RT-PCR:** retrotranscripción seguida de PCR.

**SAM:** meristemo apical del tallo (*Shoot Apical Meristem*)

**SDS:** n-dodecil sulfato sódico.

**seg.:** segundos.

**SEM:** microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*)

**T:** timidina

**TAE:** Tris-acético-EDTA.

**TBE:** Tris-borato-EDTA.

**TE:** Tris-EDTA.

**TER:** terminador.

**Trp:** triptófano

**U:** Uracilo

**UV:** ultravioleta.

**WT:** silvestre.

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónico.



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.- El gineceo y el fruto de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> .....	3
<b>2.- Rutas genéticas que dirigen la morfogénesis del gineceo.</b> .....	7
2.1.- <u>Factores genéticos implicados en el desarrollo de la parte apical del gineceo.</u> .....	9
<b>3.- El papel de las hormonas en la morfogénesis del gineceo.</b> .....	15
<b>4.- Los genes <i>NGATHA</i>.</b> .....	21
4.1.- <u>Propiedades moleculares de los factores de la subfamilia <i>NGATHA</i>.</u> .....	21
4.2.- <u>El papel de los genes <i>NGA</i> en la morfogénesis del gineceo de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</u> .....	23
4.3.- <u>El papel de los genes <i>NGA</i> en el crecimiento de los órganos laterales.</u> .....	25
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>RESULTADOS</b> .....	31
<b>CAPÍTULO 1: IDENTIFICACIÓN DE REGULADORES DE LOS GENES <i>NGATHA</i>.</b> ---	33
<b>1.- Identificación de motivos comunes potencialmente relevantes en los promotores de los genes <i>NGATHA</i>.</b> .....	33
<b>2.- Identificación de reguladores de los genes <i>NGA</i> mediante escrutinio por híbrido simple en levadura.</b> .....	34
2.1.- <u>Escrutinio por híbrido simple en levadura de una genoteca de cDNA de planta completa de <i>Arabidopsis</i>.</u> .....	34
2.2.- <u>Escrutinio por híbrido simple de levadura de una genoteca de factores de transcripción de <i>Arabidopsis</i>.</u> .....	37
2.3.- <u>Análisis de la interacción de los factores identificados con el promotor de <i>NGA3</i> mediante ensayos de activación transitoria.</u> .....	40
2.4.- <u>Estudio de la posible interacción física entre <i>SPL14</i> y <i>TCPs</i>.</u> .....	42
<b>3.- Análisis de la relación funcional entre los factores <i>SPL</i> y <i>NGA</i>.</b> .....	44
3.1.- <u>Estudio del efecto causado por la ganancia y la pérdida de función de <i>SPL14</i>.</u> --	45
3.1.1.- <u>Generación de líneas de sobreexpresión de <i>SPL14</i>.</u> .....	45
3.1.2.- <u>Caracterización fenotípica del mutante de pérdida de función <i>spl14-101</i>.</u> --	47
3.2.- <u>Estudio de la posible redundancia funcional de <i>SPL14</i> con sus parálogos cercanos.</u> .....	48
3.2.1.- <u>Análisis de la interacción de factor <i>SPL16</i> con el promotor de <i>NGA3</i> mediante ensayos de activación transitoria.</u> .....	51
3.2.2.- <u>Análisis de la interacción de los factores <i>SPL14</i> y <i>SPL16</i> con el promotor de <i>STY1</i> mediante ensayos de activación transitoria.</u> .....	52
3.2.3.- <u>Caracterización fenotípica del mutante de pérdida de función <i>spl16-101</i>.</u> --	53

3.2.4.- <i>Caracterización fenotípica del doble mutante de pérdida de función spl14-101 spl16-101.</i> -----	55
3.2.5.- <i>Análisis de la expresión de los genes NGA en fondos mutantes spl14-101, spl16-101 y spl14-101 spl16-101.</i> -----	57
3.2.6.- <i>Análisis de la relación funcional entre SPL8 y NGA.</i> -----	58
3.2.7.- <i>Análisis de la relación funcional entre los factores SPL1, SPL12 y NGA.</i> ----	59
3.2.8.- <i>Obtención de un alelo dominante negativo para SPL14.</i> -----	64
<b>4.- Análisis funcional de la relación entre los genes TCP del clado CIN-like y los genes NGA.</b> -----	66
4.1.- <i>Análisis de la expresión de los genes NGA en fondos mutantes tcp.</i> -----	66
4.1.1.- <i>Análisis del nivel de expresión de los genes NGA en fondos mutantes tcp.</i> --	66
4.1.2.- <i>Análisis del patrón de expresión de los genes NGA en fondo jaw-D.</i> -----	67
4.2.- <i>Análisis genético de la relación entre los genes NGA, TCP2 y TCP3.</i> -----	68
4.3.- <i>Estudio de la conservación de la interacción TCP/NGA en otras especies.</i> -----	70
<b>CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DE LA RELACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES NGATHA Y OTROS FACTORES bHLH IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LA PARTE APICAL DEL GINECEO DE <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> -----	73
<b>1.- Estudio de la interacción genética entre NGA y HEC.</b> -----	74
1.1.- <i>Análisis de la expresión de HEC en fondos con actividad NGA alterada.</i> -----	74
1.2.- <i>Caracterización fenotípica de las plantas 35S::NGA3 hec3 y 35S::NGA3 hec1 hec3.</i> -----	78
1.3.- <i>Generación de combinaciones genéticas entre 35S::HEC y los mutantes nga.</i> ---	84
1.4.- <i>Posibles mecanismos alternativos de interacción entre NGA y HEC.</i> -----	87
<b>2.- Estudio de la relación del complejo NGA-HEC con otros bHLH implicados en el desarrollo de la parte apical del gineceo de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> -----	92
2.1.- <i>Análisis de la expresión de IND en fondos con actividad HEC alterada.</i> -----	97
2.2.- <i>Caracterización fenotípica del efecto producido por la sobreexpresión de IND en fondos mutantes nga y hec.</i> -----	99
<b>DISCUSIÓN</b> -----	109
<b>1.- Identificación de factores reguladores de los genes NGATHA.</b> -----	112
1.1.- <i>Los factores del clado II de la familia SPL parecen actuar como reguladores de los genes NGA.</i> -----	113
1.2.- <i>Los genes NGA están regulados por factores de la familia TCP de tipo CIN-like.</i> 119	
1.3.- <i>¿Regulan los factores SPL y TCP a los genes NGA de manera independiente?.</i> -	123
1.4.- <i>Otros posibles reguladores de los genes NGA.</i> -----	123
<b>2.- La relación funcional de los factores NGA con otros factores bHLHs claves para la morfogénesis del gineceo.</b> -----	126
2.1.- <i>La relación funcional entre los genes NGA y HEC.</i> -----	126

2.2.- <u>La relación funcional entre los genes <i>NGA</i>, <i>HEC</i> y otros factores bHLH.</u>	130
2.3.- <u>Un código combinatorial para explicar la formación de los distintos tejidos del gineceo: la hipótesis del <i>Carpel-Code</i>.</u>	136
2.4.- <u>NGATHA parece funcionar como un cofactor transcripcional.</u>	139
<b>CONCLUSIONES</b>	141
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	147
<b>1.- Material biológico.</b>	149
1.1.- <u>Material bacteriano.</u>	149
1.2.- <u>Material vegetal.</u>	149
1.2.2.- <u>Líneas mutantes:</u>	149
1.2.3.- <u>Líneas transgénicas:</u>	150
<b>2.- Genotipado.</b>	150
2.1.- <u>Mutantes <i>nga</i>.</u>	150
2.2.- <u>Otros mutantes.</u>	151
2.3.- <u>Otros genotipados.</u>	151
<b>3.- Construcciones</b>	152
3.1.- <u>Vectores utilizados.</u>	152
3.1.1.- <u>Vectores de clonaje de productos de PCR.</u>	152
3.1.2.- <u>Vectores de transformación de plantas.</u>	153
3.1.3.- <u>Vectores para expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>.</u>	153
3.1.4.- <u>Vectores utilizados en los ensayos de simple híbrido de levadura.</u>	154
3.2.- <u>Construcciones.</u>	155
3.2.1.- <u>Diseño del microRNA artificial (Schwab, Ossowski et al. 2006).</u>	155
<b>4.- Análisis fenotípico de plantas mutantes y líneas transgénicas.</b>	156
4.1.- <u>Fotografía a bajo aumento.</u>	156
4.2.- <u>Técnicas microscópicas.</u>	157
4.2.1.- <u>Microscopia óptica.</u>	157
4.2.2.- <u>Microscopia electrónica de barrido.</u>	157
4.2.3.- <u>Microscopia confocal.</u>	157
<b>5.- Técnicas de histología vegetal.</b>	158
5.1.- <u>Aclarado con hidrato de cloral para la observación de los haces vasculares.</u>	158
<b>6.- Análisis de expresión.</b>	158
6.1.- <u>Determinación de los niveles de transcrito mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).</u>	158
6.2.- <u>Detección de la actividad <math>\beta</math>-glucuronidasa mediante tinción histoquímica.</u>	159
<b>7.- Análisis de interacciones proteína-proteína.</b>	160
7.1.- <u>Ensayo de complementación Fluorescente Bimolecular (BiFC).</u>	160
<b>8.- Análisis de interacción proteína-DNA.</b>	162

8.1.- <u>Ensayo de activación transitoria de la luciferasa en planta.</u> -----	162
8.2.- <u>Inmunoprecipitación de cromatina (ChiP).</u> -----	165
8.3.- <u>Escrutinio de híbrido simple de levadura (Y1H) frente una genoteca de factores de transcripción de Arabidopsis.</u> -----	168
8.3.1.- <u>Transferencia de DNA plasmídico en Levaduras.</u> -----	168
8.3.1.1.- <u>Método rápido de transformación: Lazy bones.</u> -----	168
8.3.1.2.- <u>Método de transformación por mating.</u> -----	169
8.3.2.- <u>Prueba de expresión del gen HIS3.</u> -----	169
8.3.3.- <u>Rastreo en genoteca de factores de transcripción de A. thaliana.</u> -----	170
8.3.4.- <u>Comprobación de la interacción entre genes rastreados.</u> -----	171
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> -----	173
<b>ANEXOS</b> -----	193
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### INTRODUCCIÓN

- Figura I.1:** Fotografía de una flor en estadio de antesis de *Arabidopsis thaliana*. ----- pág. 6
- Figura I.2:** Fotografías al microscopio electrónico de barrido (SEM) de flores de mutantes que dirigen la morfogénesis del gineceo. ----- pág. 8
- Figura I.3:** Fotografías al SEM de flores de mutantes implicados en el desarrollo de la parte apical del gineceo. ----- pág.11
- Figura I.4:** Fotografías al SEM de frutos de líneas con actividad *SHI/STY* alterada. ----- pág.12
- Figura I.5:** Fenotipo de los mutantes *nga*. ----- pág.13
- Figura I.6:** Fenotipo de las combinaciones de líneas con actividad *NGA*, *STY* y *CRC* alterada. ----- pág.15
- Figura I.7:** Modelos de acumulación de auxinas durante el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis thaliana*. ----- pág. 17
- Figura I.8:** Relación filogenética de los RAV de *Arabidopsis thaliana*. ----- pág. 22
- Figura I.9:** Diagrama del patrón de expresión de los genes *NGA* durante el desarrollo floral. ----- pág.24
- Figura I.10:** Comparación de la morfología de las hojas de roseta de Col-0, *nga1 nga2 nga3 nga4* y *35S::NGA3*. ----- pág.26

### RESULTADOS

#### CAPÍTULO 1: IDENTIFICACIÓN DE REGULADORES DE LOS GENES *NGATHA*.

- Figura C1.1:** Análisis de los promotores de los genes *NGATHA*. ----- pág.34
- Tabla C1.1:** Resultado del escrutinio de híbrido simple de levadura utilizando como cebo la región de 270 pb conservada del promotor de *NGA3* frente a una genoteca de cDNAs de planta completa de *Arabidopsis*. ----- pág.35
- Tabla C1.2:** Resultado del escrutinio de híbrido simple de levadura utilizando como cebo la región de 55 pb más conservada del promotor de *NGA3* frente a la genoteca de factores de transcripción RR. ----- pág.38
- Figura C1.2:** Resultados de la comprobación de las interacciones proteína-DNA de algunos factores identificados en el rastreo de híbrido simple de la genoteca de Factores de Transcripción RR y de *SPL14*, el clon positivo identificado en el rastreo de híbrido simple de la genoteca de cDNAs de *Arabidopsis*. ----- pág.39
- Figura C1.3:** Esquemas de las construcciones utilizadas en los ensayos de activación de la *LUCIFERASA* y activación transitoria de los promotores de *NGA3* y *NGA3Δ270* por las proteínas *SPL14*, *TCP1*, *TCP2* y *TCP3*. ----- pág.41
- Figura C1.4:** Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar la interacción de las proteínas *SPL14*, *TCP1*, *TCP2* y *TCP3* mediante ensayos de BiFC. ----- pág.43
- Figura C1.5:** Estudio de la interacción proteína-proteína entre *SPL14*, *TCP1*, *TCP2* y *TCP3*. ----- pág.44
- Figura C1.6:** Esquema de la construcción utilizada para generar plantas transgénicas de *Arabidopsis* con la sobreexpresión del gen *SPL14*. ----- pág.45
- Figura C1.7:** Fenotipo de las plantas *35S::SPL14*. ----- pág.46
- Figura C1.8:** Nivel de expresión de *SPL14* en plántulas Col-0, y 3 líneas independientes *35S::SPL14* (#5.8, #8.10 y #10.2). ----- pág.46
- Figura C1.9:** Diagrama de la localización de la inserción de T-DNA en el gen *SPL14* según la información disponible en el TAIR. ----- pág.47
- Figura C1.10:** Fenotipo de las plantas *sp14-101*. ----- pág.48
- Figura C1.11:** Relación filogenética de los genes *SPLs* de *Arabidopsis*, arroz, maíz, tomate, *Betula pendula* y *Antirrhinum majus*. ----- pág.49

<b>Figura C1.12:</b> Alineamiento de las secuencias proteicas de SPL1, SPL12, SPL14 Y SPL16. -----	pág.50
<b>Figura C1.13:</b> Esquemas de las construcciones utilizadas en los ensayos de activación de la <i>LUCIFERASA</i> . y activación transitoria de los promotores <i>NGA3</i> y <i>NGA3Δ270</i> por la proteína SPL16. -----	pág.51
<b>Figura C1.14:</b> Esquemas de las construcciones utilizadas en los ensayos de activación de la <i>LUCIFERASA</i> y activación transitoria del promotor <i>STY1</i> por las proteínas SPL14 y SPL16. -----	pág.53
<b>Figura C1.15:</b> Diagrama de la localización de la inserción de T-DNA en el gen <i>SPL16</i> según la información disponible en el TAIR. -----	pág.54
<b>Figura C1.16:</b> Análisis por RT-PCR de los niveles de transcrito del gen <i>SPL16</i> en plántulas de 15 días de edad de Col 0 y el mutante <i>spl16-101</i> . -----	pág.55
<b>Figura C1.17:</b> Fenotipo de las plantas <i>spl14-101 spl16-101</i> . -----	pág.56
<b>Figura C1.18:</b> Nivel de expresión de <i>NGA1</i> , <i>NGA2</i> , <i>NGA3</i> y <i>NGA4</i> en plántulas Col-0, <i>spl14-101</i> , <i>spl16-101</i> y <i>spl14-101 spl16-101</i> . -----	pág.57
<b>Figura C1.19:</b> Fenotipo de las plantas <i>spl8-1</i> . -----	pág.58
<b>Figura C1.20:</b> Esquemas de las construcciones utilizadas en los ensayos de activación de la <i>LUCIFERASA</i> y activación transitoria del promotor <i>NGA3</i> por las proteínas SPL8, SPL8VP16, SPL12 y SPL1. -----	pág.60
<b>Figura C1.21:</b> Nivel de expresión de <i>SPL1</i> y <i>SPL12</i> en plántulas de 3 líneas independientes de amiR-SPL1/12 en fondo <i>spl14-101 spl16-101</i> y 2 líneas independientes de amiR-SPL1/12 en fondo Col-0. -----	pág.61
<b>Figura C1.22:</b> Nivel de expresión de <i>NGA1</i> , <i>NGA2</i> , <i>NGA3</i> y <i>NGA4</i> en (A) plántulas y (B) inflorescencias de Col-0 y y las líneas #13 y #18 del amiRNA anti <i>SPL1 SPL12</i> sobre <i>spl14-101 spl16-101</i> . -----	pág.62
<b>Figura C1.23:</b> Fenotipo de las plantas <i>amiRNA antiSPL1 spl12</i> en fondo <i>spl14-101 spl16-101</i> . -----	pág.63
<b>Figura C1.24:</b> Esquema de la construcción utilizada para generar plantas transgénicas de Arabidopsis con la sobreexpresión del gen <i>SPL14:SRDX</i> . -----	pág.64
<b>Figura C1.25:</b> Fenotipo de carpelo de plantas 35S:: <i>SPL14:SRDX</i> . -----	pág.65
<b>Figura C1.26:</b> Nivel de expresión de <i>NGA1</i> , <i>NGA2</i> , <i>NGA3</i> y <i>NGA4</i> en plántulas Col-0, <i>tcp2-1</i> y <i>jaw-D</i> . ----	pág.67
<b>Figura C1.27:</b> Patrón de expresión de <i>NGA2</i> y <i>NGA3</i> en fondo <i>jaw-D</i> . -----	pág.68
<b>Figura C1.28:</b> Fenotipos de los diferentes mutantes y combinaciones generadas. -----	pág.69
<b>Figura C1.29:</b> Alineamiento del fragmento de 53 pb conservado en el promotor <i>AtNGA3</i> con los promotores de los otros genes <i>NGA</i> de Arabidopsis y de diferentes especies; y activación transitoria del promotor <i>SINGAa</i> por LA y del promotor <i>AtNGA3</i> de Arabidopsis por las proteínas TCP3 y LA. -----	pág.71

## **CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DE LA RELACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES *NGATHA* Y OTROS FACTORES bHLH IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LA PARTE APICAL DEL GINECEO DE *Arabidopsis thaliana*.**

<b>Figura C2.1:</b> Fotografías al SEM de frutos Col-0 , <i>hec1 hec2 hec3</i> , 35S:: <i>NGA3</i> , 35S:: <i>HEC3</i> , 35S:: <i>HEC1</i> . -----	pág.74
<b>Figura C2.2:</b> Patrón de expresión de <i>HEC1</i> descrito en la base de datos BAR, a partir de micromatrices de DNA. -----	pág.75
<b>Figura C2.3:</b> Comparación del patrón de expresión de <i>HEC1p::HEC1:GUS</i> y <i>HEC2p::GUS</i> en fondo silvestre, 35S:: <i>NGA3</i> y mutante <i>nga</i> en planta. -----	pág.76
<b>Figura C2.4:</b> Comparación del patrón de expresión de <i>HEC1p::HEC1:GUS</i> , <i>HEC2p::GUS</i> y <i>HEC3p::GUS</i> en fondo silvestre, 35S:: <i>NGA3</i> y mutantes <i>nga</i> en inflorescencia y flor en antesis. -----	pág.77
<b>Figura C2.5:</b> Nivel de expresión de <i>HEC1</i> , <i>HEC2</i> y <i>HEC3</i> en inflorescencias Col-0, 35S:: <i>NGA3</i> y cuádruple mutante <i>nga</i> . -----	pág.78
<b>Figura C2.6:</b> Fenotipos de sobreexpresión de <i>NGA3</i> en fondo <i>hec3</i> y <i>hec1 hec3</i> . -----	pág.79

<b>Figura C2.7:</b> Detalle de los defectos observados en los frutos Col-0, <i>hec3</i> , <i>hec1 hec3</i> , <i>35S::NGA3</i> , <i>35S::NGA3 hec3</i> y <i>35S::NGA3 hec1 hec3</i> . -----	pág.80
<b>Figura C2.8:</b> Detalle de los defectos observados en flores en antesis de <i>hec3</i> , <i>hec1 hec3</i> , <i>35S::NGA3</i> , <i>35S::NGA3 hec3</i> y <i>35S::NGA3 hec1 hec3</i> . -----	pág.82
<b>Figura C2.9:</b> Morfología de las hojas de la roseta de la línea <i>35S::NGA3</i> en fondo <i>hec3</i> y <i>hec1hec3</i> . -----	pág.83
<b>Figura C2.10:</b> Esquema de la construcción utilizada para generar plantas transgénicas de Arabidopsis con la sobreexpresión de los genes <i>HEC1</i> y <i>HEC3</i> . -----	pág.84
<b>Figura C2.11:</b> Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de <i>HECATE</i> . -----	pág.85
<b>Figura C2.12:</b> Caracterización fenotípica de las líneas <i>35S::HEC3 nga2 nga3 nga4</i> . -----	pág.86
<b>Figura C2.13:</b> Patrón de expresión de <i>NGA3</i> en fondo Col-0, <i>35S::HEC3</i> y <i>hec1 hec3</i> . -----	pág.87
<b>Fig C2.14:</b> Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar la interacción de la proteínas <i>NGA1</i> , <i>NGA3</i> , <i>HEC1</i> y <i>HEC3</i> mediante ensayos de BiFC. -----	pág.88
<b>Figura C2.15:</b> Controles utilizados para el estudio de las posibles interacciones entre <i>NGA1</i> , <i>NGA3</i> , <i>HEC1</i> Y <i>HEC3</i> . -----	pág.89
<b>Figura C2.16:</b> Estudio de la interacción proteína-proteína entre <i>NGA1</i> , <i>NGA3</i> , <i>HEC1</i> Y <i>HEC3</i> . -----	pág.90
<b>Figura C2.17:</b> Caracterización fenotípica de la línea <i>35S::NGA3 35S::HEC3</i> . -----	pág.91
<b>Figura C2. 18:</b> Detalle de los defectos observados en la parte apical de los frutos de las líneas (A) <i>ind-2 spt-12</i> , <i>HEC2-RNAi hec1 hec3</i> , <i>nga1 nga2 nga3 nga4</i> y <i>35S::IND</i> . Fotografía al microscopio electrónico de barrido de frutos de <i>35S::IND</i> , <i>35S::SPT</i> , <i>35S::NGA3</i> , <i>35S::HEC3</i> y <i>35S::NGA3 35S::HEC3</i> . Representación del modelo de Girin et al., 2011. -----	pág.94
<b>Figura C2.19:</b> Defectos observados en frutos completamente elongados de las líneas <i>35S::NGA3</i> , <i>35S::NGA3 ind-2</i> , <i>35S::NGA3 spt-2</i> . Fotografía a microscopio electrónico de barrido en frutos completamente elongados <i>35S::NGA3</i> , <i>35S::NGA3 spt-2</i> y detalle de la parte apical de los frutos <i>35S::NGA3 ind-2</i> . Comparación del patrón de expresión de <i>SPT::GUS</i> de gineceos en fondo silvestre y <i>35S::NGA3</i> . Comparación del patrón de expresión de <i>IND::GUS</i> . -----	pág.95
<b>Figura C2. 20:</b> Modificación propuesta del modelo de Girin et al., (2011). -----	pág.96
<b>Figura C2.21:</b> Comparación del patrón de expresión de <i>INDp::IND:GUS</i> en gineceos en fondos Col 0 y flores pertenecientes a las categorías fenotípicas 1 y 2 de <i>35S::HEC3</i> . -----	pág.97
<b>Figura C2.22:</b> Comparación del patrón de expresión de <i>IND::GUS</i> en fondo silvestre, <i>35S::NGA3</i> y <i>35S::NGA3 hec1 hec3</i> . -----	pág.98
<b>Figura C2.23:</b> Comparación del patrón de expresión de <i>SPT::GUS</i> en flores en antesis en fondo silvestre, <i>35S::NGA3</i> y <i>35S::NGA3 hec1 hec3</i> . -----	pág.99
<b>Figura C2.24:</b> Fenotipos asociados a la línea de sobreexpresión inducible por dexametasona de <i>IND</i> en fondo silvestre, <i>nga1 nga3 nga4</i> y <i>hec1 hec3</i> . -----	pág.100
<b>Figura C2.25:</b> Modelos de acción propuestos para los factores <i>NGA</i> y <i>HEC</i> . -----	pág.101
<b>Figura C2.26:</b> Controles utilizados en el estudio de la interacción proteína-proteína entre <i>NGA3</i> , <i>IND</i> , <i>SPT</i> Y <i>HEC3</i> . -----	pág.102
<b>Figura C2.27:</b> Estudio de la interacción proteína-proteína entre <i>NGA3</i> , <i>IND</i> , <i>SPT</i> Y <i>HEC3</i> . -----	pág.102
<b>Figura 2.28:</b> Detección histoquímica de la actividad <i>GUS</i> dirigida por el promotor de <i>PID</i> y <i>WAG2</i> en gineceos en fondo silvestre, cuádruple mutante <i>nga</i> , <i>35S::NGA3</i> . Expresión de <i>PID::PID:GFP</i> en, gineceos en fondos silvestre y <i>35S::NGA3</i> . -----	pág.104
<b>Figura C2.29:</b> Resultados de los experimentos de ChIP sobre el promotor de <i>PID</i> , <i>WAG2</i> Y <i>SPT</i> en inflorescencias de líneas <i>35S::IND-GR</i> y <i>35S::IND-GR nga1 nga3 nga4</i> . -----	pág.105
<b>Figura C2.30:</b> Fenotipos observados en los frutos que sobreexpresan los genes <i>NGA</i> . -----	pág.106

**Figura C2.31:** Resultados de los experimentos de ChIP sobre el promotor de *PID*, *WAG2* Y *SPT* en inflorescencias de la línea *35S::GR:NGA1*. ----- pág.107

## **DISCUSIÓN**

**Figura D1:** Hipotesis sobre la posible interacción de los genes *NGA*. ----- pág.129

**Figura D2:** Modelos de acción planteados para los factores *NGA* y *HEC*. ----- pág.133

**Figura D3:** Modelo ABCE. Representación del modelo ABCE. ----- pág.137

**Figura D4:** Modelo ABCE. Representación gráfica del modelo ABCE. ----- pág.138

**Figura D5:** Representación de los elementos propuestos en el CARPEL CODE. ----- pág.139

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

**Tabla M.1:** Cepas bacterianas utilizadas. ----- pág.149

**Tabla M.2:** Ecotipo silvestre utilizado en esta tesis. ----- pág.149

**Tabla M.3:** Líneas mutantes utilizadas en esta tesis. ----- pág.149

**Tabla M.4:** Líneas transgénicas utilizadas en esta tesis. ----- pág.150

**Tabla M.5:** Condiciones de PCR utilizadas para genotipar los mutantes *nga*. ----- pág.150

**Tabla M.6:** Condiciones de PCR utilizadas para genotipar otros mutantes. ----- pág.151

**Tabla M.7:** Condiciones de PCR utilizadas para genotipar otras líneas. ----- pág.152

**Tabla M.8:** Plásmidos utilizados en esta tesis. ----- pág.154

**Figura M.1:** Sustitución del miRNA319 del plásmido R300 por el microRNA específico para los genes *SPL1* y *SPL12*. ----- pág.156

**Tabla M.9:** Combinación de cebadores en las 4 PCRs utilizadas para la Sustitución del miRNA319 del plásmido R300 por el microRNA específico para los genes *SPL1* y *SPL12*. ----- pág.156

# **INTRODUCCIÓN**



La evolución de las plantas está en gran medida impulsada por su capacidad para adoptar diferentes estrategias que faciliten el éxito reproductivo de las mismas.

Sin ninguna duda el **gineceo**, el órgano específico femenino de la flor, es la adaptación que en mayor medida ha contribuido al éxito evolutivo de las angiospermas, que se diversificaron a partir de un ancestro común hasta llegar a ser hoy en día aproximadamente 300.000 especies vivas.

Entre las mayores ventajas adaptativas que proporciona el gineceo para la evolución en las angiospermas podemos destacar:

- La protección de los óvulos, que se desarrollan dentro del ovario, una parte del gineceo.
- El gineceo proporciona un sitio para el funcionamiento de los mecanismos de incompatibilidad auto- e inter-específicos: la autoincompatibilidad previene la endogamia y por lo tanto conserva la capacidad para el cambio evolutivo, mientras que la incompatibilidad entre especies impide hibridaciones que pueden conducir a la producción de descendencia inviable
- En el gineceo el estigma está adaptado para la correcta captación del polen por diferentes vías. Después de la polinización, los tubos polínicos son guiados con precisión a través de los tejidos del carpelo hacia los óvulos aún no fertilizados.
- Después de la fecundación los tejidos del gineceo se someten a cambios en el desarrollo para formar el **fruto**, que protege dentro de él las semillas en desarrollo y, tras la madurez, contribuye a la dispersión de éstas facilitando la continuidad de la especie.

Este papel fundamental en la competencia reproductiva de la especie requiere del desarrollo de numerosos tipos celulares y tejidos diferentes, haciendo del gineceo probablemente el órgano más complejo de la planta.

### **1.- El gineceo y el fruto de *Arabidopsis thaliana*.**

*Arabidopsis thaliana* es una pequeña planta herbácea que pertenece a la familia de las brasicáceas (Brassicaceae) y que ha emergido desde mediados de los 80 como el organismo modelo de elección para la investigación básica y aplicada en biología vegetal gracias a que posee numerosas características que la hacen muy interesante desde el punto de vista científico. Además de ser angiosperma y dicotiledónea, su pequeño tamaño permite siembras de alta densidad; su arquitectura es relativamente simple, y su ciclo vital corto, de 6 a 8 semanas. Además es autógama y produce gran cantidad de semillas. También resulta relativamente fácil realizar cruzamientos entre distintas plantas (Somerville and Koornneef 2002). También ha influido el tamaño relativamente pequeño de su genoma (125 Mb), diploide, dividido en cinco cromosomas, con escaso

## INTRODUCCIÓN

contenido en DNA repetitivo, y secuenciado en su totalidad en el año 2000 por la Arabidopsis Genome Initiative (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Otra de las características interesantes que presenta Arabidopsis es la facilidad con la que puede ser manipulada mediante ingeniería genética. Además, 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, información acerca de mutantes, polimorfismos de DNA, así como protocolos de laboratorio, etc.

En *Arabidopsis thaliana* el gineceo está compuesto por dos carpelos fusionados congénitamente que surgen desde un único primordio en el centro de la flor (Smyth et al. 1990). Posteriormente se forma una invaginación central y el primordio se elonga como un cilindro hueco (Ferrándiz et al. 1999). Tras esto, el desarrollo y diferenciación de los tejidos ocurre a lo largo de sus tres ejes principales, es decir, los ejes apical-basal, medio-lateral y adaxial-abaxial (Ferrandiz et al. 2010). En primer lugar, se forman dos protuberancias meristemáticas internas en posición medial que se desarrollan hacia el interior del gineceo, y que darán lugar a la placenta y los óvulos. Estas protuberancias se fusionan a lo largo de la zona central interna del gineceo para formar una pared denominada septum que lo divide longitudinalmente. Simultáneamente, las capas del meso-, endo- y exocarpo se diferencian a lo largo del eje adaxial-abaxial con dos grandes haces vasculares laterales perpendiculares a dicho eje. En estadios posteriores, se cierra la zona apical del cilindro formado por los carpelos y se empiezan a diferenciar los tejidos localizados en esta región, así como los dominios que se pueden distinguir a lo largo del eje apical-basal.

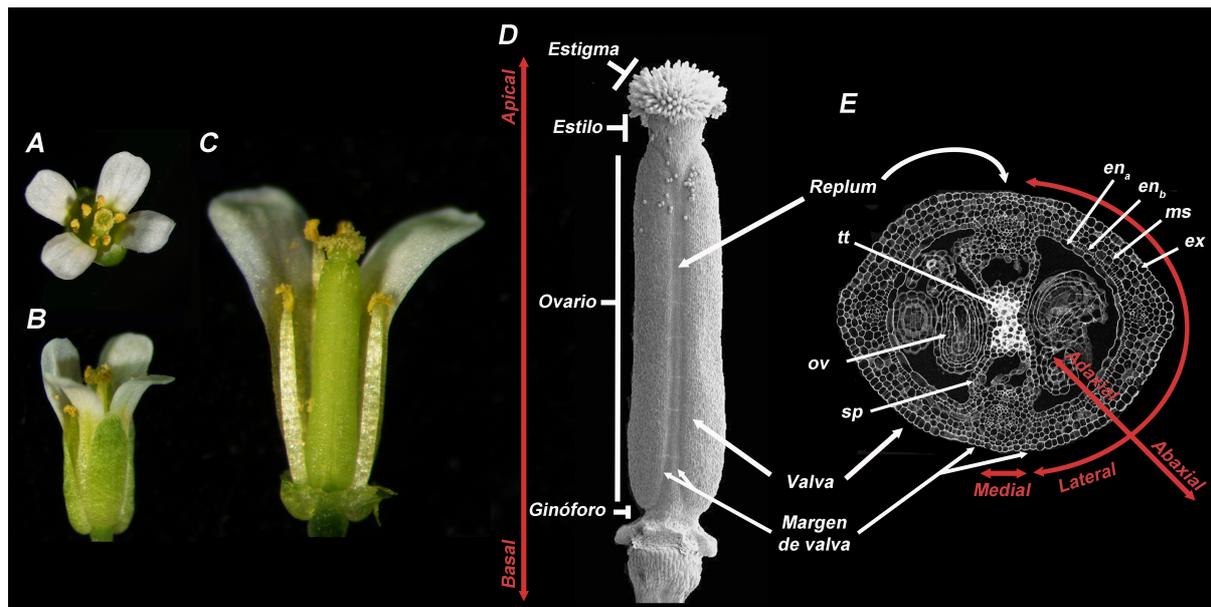
La maduración del carpelo se completa cuando la flor alcanza el estadio de antesis (Fig.I.1.A-C). En antesis, momento en el que tiene lugar la apertura de la flor y la dehiscencia de las anteras para liberar el polen, los tejidos necesarios para la maduración y dehiscencia del fruto ya están presentes, aunque seguirán desarrollándose después de la fructificación (Bowman et al. 1999; Roeder and Yanofsky 2005).

En el gineceo maduro (antesis) se pueden diferenciar distintas regiones a lo largo de los diferentes ejes del desarrollo. En el eje apical-basal, de la parte superior a la base, se distinguen: el estigma, el estilo, el ovario y el ginoforo (Fig.I.1.D).

- El **estigma** es una capa unicelular de células epidérmicas alargadas especializadas que forman las papilas estigmáticas; durante la fecundación, el estigma está involucrado en la adhesión y la germinación del polen. El estigma también representa el comienzo del **tracto de transmisión (tt)**, un tejido que se organiza en células alargadas conectadas por plasmodesmos y que segrega una matriz rica en polisacáridos especializada en guiar el avance de los tubos

polínicos a través del estilo y del ovario en dirección a los óvulos.

- El **estilo** es un cilindro corto y compacto cuyas células epidérmicas se disponen en filas cortas y exhiben depósitos de cera; la parte central se compone de células alargadas axialmente de tejido del tracto transmisión, entre las cuales crecen los tubos de polen, y entre este *core* y las células epidérmicas hay un anillo de tejido vascular y tres filas de células clorenquimáticas. Los tejidos apicales (estilo y estigma) son de origen medial, aunque sólo ocupen posiciones apicales y muestren simetría radial.
- El **ovario** ocupa la mayor parte de la longitud del gineceo. Externamente observamos dos **valvas** que terminan en 2 ó 3 filas de células más pequeñas que forman un hundimiento longitudinal llamado **margen de la valva**, y el **replum**. En una sección transversal del ovario podemos ver la distribución de los tejidos a lo largo del eje medio-lateral: las valvas, en posición lateral, corresponden a las paredes de los dos carpelos y en ellas se distinguen varias capas de células. El **exocarpo (ex)** es la epidermis exterior y comprende una única capa de células intercaladas con estomas inmaduros. Tres capas de células clorenquimáticas forman el **mesocarpo (ms)** y, por último, el **endocarpo** se compone de dos capas de células diferenciadas: una epidermis interna de células grandes, isodiamétricas de pared delgada (**endocarpoa -en<sub>a</sub>-**) y una capa epidérmica de células alargadas longitudinalmente pequeñas y muy juntas (**endocarpo b -en<sub>b</sub>-**). En posición central o medial, es decir, en la zona donde se fusionan los carpelos, se encuentran internamente el **septum (sp)** a través del cual discurre el tracto de transmisión, que junto con la placenta divide el ovario internamente en dos lóculos, en cuyo interior se encuentran los **óvulos (ov)**. Los óvulos son estructuras complejas que constan de un núcleo central que contiene el saco embrionario; dos tegumentos, que encierran el núcleo; y un tallo o funículo que los conecta con el tejido de la placenta. Todos los tejidos del ovario muestran polaridad adaxial-abaxial. Así pues, en la zona medial del ovario se encuentra el replum en posición abaxial, formando una estrecha capa entre los márgenes de la valva, mientras que septum, tracto transmisor, placenta y óvulos son adaxiales. Las valvas, en posición lateral, también muestran polaridad abaxial-adaxial, lo cual se refleja en las diferentes capas celulares que las constituyen (Balanzá et al. 2006).
- El **ginóforo**, una estructura corta y similar a un pedicelo, que une el ovario a la base de la flor.



**Figura I.1:** Fotografía a bajo aumento de una **flor en estadio de antesis de *Arabidopsis thaliana***. **(A)** Vista desde arriba, donde se pueden observar los cuatro verticilos florales. **(B)** Vista desde el lateral **(C)** Vista desde el lateral, donde se han eliminado algunos sépalos, pétalos y estambres, dejando ver el gineceo. **(D)** Fotografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) del gineceo en antesis de *Arabidopsis thaliana*, donde se muestra y señala la distribución de los tejidos a lo largo del eje apical-basal (en rojo) **(E)** Sección transversal del gineceo en antesis de *Arabidopsis thaliana*, donde se indican los ejes de polaridad (en rojo) y los tejidos presentes en los mismos. Imagen modificada de Roeder & Yanofsky, 2006.

Tras la fecundación de los óvulos, las células del ovario se dividen y expanden, el fruto se alarga y se diferencian una serie de tipos celulares distintos, que permiten la maduración óptima y la dispersión de las semillas (Ferrándiz 2002; Ferrándiz et al. 1999; Robles and Pelaz 2005).

El fruto seco y dehiscente de *Arabidopsis thaliana*, también llamado silicua, es representativo de más de tres mil especies de la familia de las brassicáceas. Esta silicua alargada y cilíndrica, mide de 1 a 2 centímetros de largo y 1 milímetro de ancho aproximadamente, y en su interior se desarrollan un promedio de 40 a 50 semillas (Bowman 1994).

El desarrollo de las semillas en el interior de la silicua junto con la diferenciación de tejidos requeridos para la dehiscencia del fruto es el principal proceso de desarrollo que ocurre posteriormente a la fructificación (Robles and Pelaz 2005). Esta diferenciación de los tejidos implica mayoritariamente al margen de valva y a la capa del endocarpo b.

El margen de valva se encuentra entre las valvas y el replum y al alcanzar la madurez se convierte en la zona de dehiscencia. La zona de dehiscencia comprende una capa de células pequeñas que constituyen la zona de separación y que define un plano longitudinal de ruptura a ambos lados del replum, junto con una zona adyacente de células lignificadas que se extiende hacia la valva. El endocarpo b, la capa de células interna de las valvas, también se lignifica. Estas dos regiones de células lignificadas suministran, cuando el fruto maduro y se seca, tensiones mecánicas que facilitan la

apertura de la silicua (Ferrándiz 2002). Una vez abierta la silicua, las semillas se desprenden por la fuerza mecánica del viento, la lluvia o el contacto físico.

## **2.- Rutas genéticas que dirigen la morfogénesis del gineceo.**

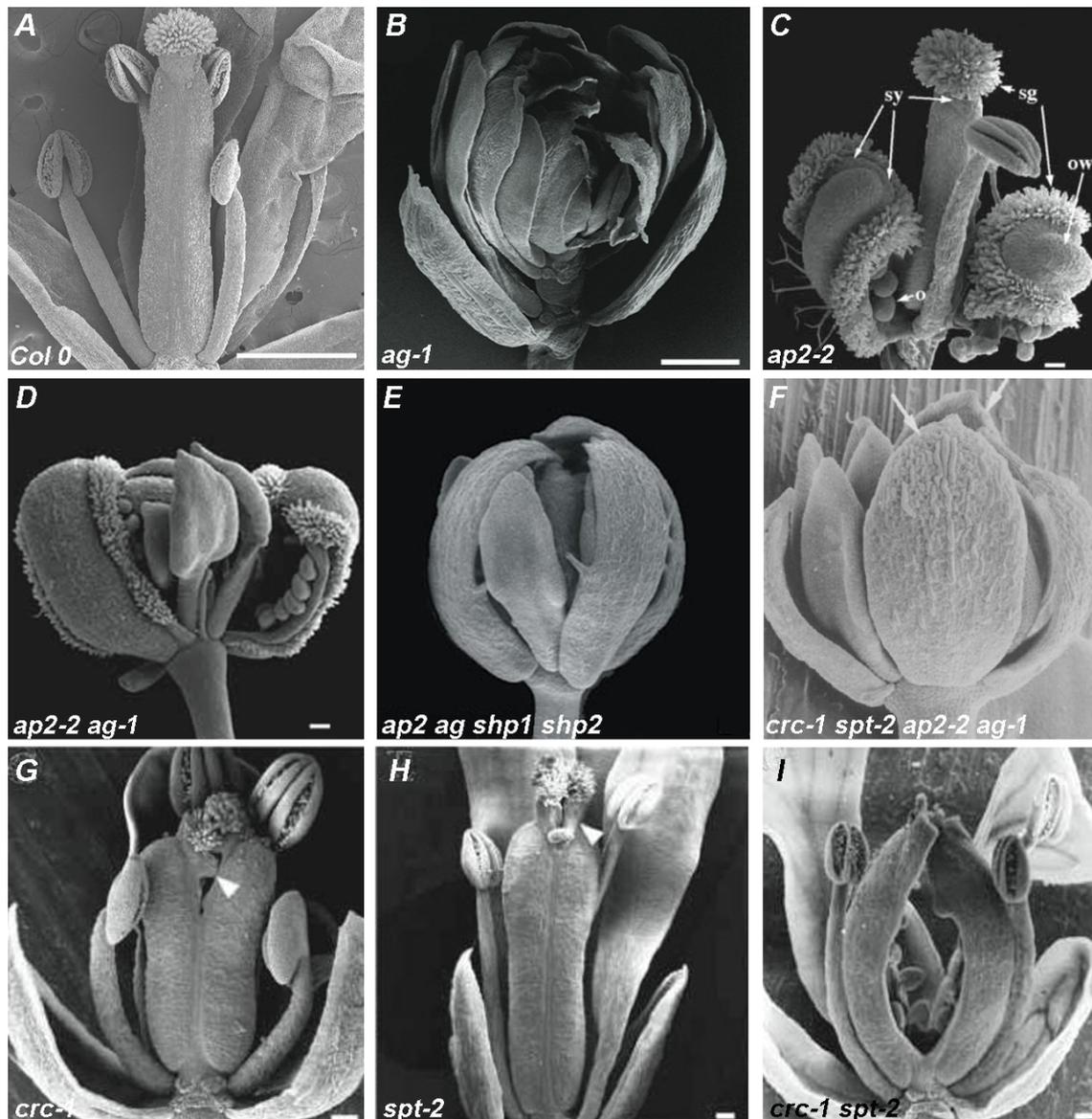
Las redes genéticas que controlan la formación del gineceo de *Arabidopsis* se han estudiado ampliamente y muchos genes necesarios para el desarrollo de los diferentes tejidos característicos del carpelo ya han sido identificados en los últimos años.

La identidad de carpelo en las angiospermas se especifica por los genes con función C de una manera ampliamente conservada, tal y como se define en el modelo ABC de la identidad de los órganos florales (Coen and Meyerowitz 1991); en *Arabidopsis* esta función es proporcionada por el gen de tipo MADS-box *AGAMOUS* (*AG*) (Yanofsky et al. 1990). En el mutante *ag* presenta un cambio de identidad de estambres a pétalos y de carpelos a sépalos (Fig.I.2 B). Una vez establecida la identidad del carpelo, las vías genéticas que controlan la morfogénesis del gineceo y el desarrollo de los tejidos específicos del carpelo se activan sucesivamente (Balanzá et al. 2006; Ferrandiz et al. 2010; Reyes-Olalde et al. 2013).

A pesar de su papel esencial en la especificación de la identidad del carpelo, *AG* no es el único factor que realiza esta función. De hecho, en el doble mutante *ap2 ag* aparece tejido estigmático y óvulos en el margen de los órganos del primer verticilo (Fig.I.2 C, D) (Bowman et al. 1991; Alvarez and Smyth 1998). Esta observación llevó a proponer que factores adicionales podían especificar, al menos parcialmente, la identidad del carpelo junto con *AG*. Estos factores fueron identificados como los genes MADS-box *SHATTERPROOF1* (*SHP1*) y *SHATTERPROOF2* (*SHP2*), que están principalmente implicados en la especificación de la identidad del margen de la valva (Liljegren et al. 2000). En el cuádruple mutante *ap2 ag shp1 shp2* no se forma ninguna estructura carpeloide (Fig.I.2 E). Estudios de complementación han demostrado que las proteínas *SHP* y *AG* son muy similares a nivel funcional y que el hecho de que tengan funciones diferentes durante el desarrollo del carpelo es debido, principalmente, a sus diferentes patrones de expresión (Pinyopich et al. 2003).

Los factores de transcripción de tipo YABBY (*YAB*) *CRABS CLAW* (*CRC*) y de tipo bHLH *SPATULA* (*SPT*) también son necesarios para el desarrollo del carpelo. Estos factores podrían actuar por debajo de *AG/SHP*, como sugiere el hecho de que el fenotipo del cuádruple mutante *ap2 ag shp1 shp2*, en el que no se forma ninguna estructura carpeloide, sea muy similar al del cuádruple mutante *ap2 ag spt crc* (Fig.I.2 F) (Alvarez and Smyth 1999), demostrando que estos dos genes son necesarios para especificar estos tejidos. *SPT* se expresa en diferentes tipos celulares y órganos a lo largo del desarrollo, y tanto en estructuras reproductivas como vegetativas (Heisler et al. 2001).

## INTRODUCCIÓN



**Figura I.2: Fotografías al microscopio electrónico de barrido (SEM) de flores de (A) Col-0 (Escala=1mm), (B) mutante *ag-1* (E=0,5mm) (tomada de Ferrándiz et al., 1999), (C) mutante *ap2-2* (E=50 $\mu$ m) (tomada de Alvarez et al., 1999), (D) doble mutante *ap2-2ag-1* (E=100 $\mu$ m) (tomada de Alvarez et al., 1999), (E) cuadruple mutante *ap2 ag shp1 shp2* (E=50 $\mu$ m) (tomada de Pinyopich et al., 2003), (F) cuadruple mutante *crc spt ap2 ag* (E=50 $\mu$ m) (tomada de Alvarez et al., 1998), (G) mutante *crc-1* (E=100 $\mu$ m) (tomada de Alvarez et al., 1999), (H) mutante *spt-2* (E=100 $\mu$ m) (tomada de Alvarez et al., 1999), (I) mutante *crc-1 spt-2* (E=100 $\mu$ m) (tomada de Alvarez et al., 1999).**

Sin embargo, el principal fenotipo asociado con las mutaciones *spt* son defectos en el desarrollo de los tejidos marginales del carpelo: estos mutantes muestran una reducción del crecimiento del estilo, el estigma, y el septum, y el tracto de transmisión está ausente (Fig.I.2 H) (Alvarez and Smyth 1999). Por otro lado, *CRC* se expresa de modo específico en nectarios y carpelo. En el mutante *crc*, los nectarios están ausentes, el gineceo es más corto y ancho que en el silvestre y la zona apical está reducida y parcialmente sin fusionar (Fig.I.2 G) (Bowman and Smyth 1999). En el doble mutante

*crc spt*, el gineceo está completamente sin fusionar y presenta una reducción considerable en el número de óvulos y de los tejidos estilar y estigmático (Fig.I.2 I) (Alvarez and Smyth 1999). Apoyando la idea de que CRC y SPT intervienen en la función de identidad de carpelo (al menos en cuanto a la especificación de los tejidos marginales) junto con AG/SHP, Alvarez y Smyth (1999) mostraron que CRC y SPT estaban también implicados en otros aspectos de la actividad AG, como la determinación del meristemo floral. Tanto *SHP* como *AG* parecen estar actuando al principio de la ruta de identidad del carpelo, y podrían desde esta posición activar directa o indirectamente a *SPT* y *CRC*. De hecho, *CRC* ha sido identificado como una diana directa de AG (Gomez-Mena et al. 2005), aunque sin embargo, se conoce menos sobre la activación de *SPT*. Una vez que la identidad de órgano ha sido especificada, el primordio del gineceo se divide en diferentes dominios y se van especificando todos los tejidos que forman el gineceo.

### 2.1.- Factores genéticos implicados en el desarrollo de la parte apical del gineceo.

Esta tesis tiene como objetivo general entender mejor como se diferencian los tejidos apicales presentes en el gineceo de *Arabidopsis thaliana*, por lo que dedicaremos un apartado de la introducción a describir varios genes que han sido identificados por su papel en la diferenciación de la parte apical del gineceo, aunque cabe destacar que ninguno parece tener exclusivamente estas funciones.

Como ya se ha descrito, *SPT* juega un papel importante en el desarrollo del estigma. El mutante *spt* de *Arabidopsis*, además de los defectos en estigma y estilo mencionados anteriormente (Fig.I.3 B), muestra defectos en el desarrollo del interior del carpelo y en la germinación de las semillas (Crawford and Yanofsky 2008). Aunque la sobreexpresión de *SPT* no produce un fenotipo anormal, cuando se sobreexpresa *SPT* fusionado a un dominio de activación transcripcional fuerte (VP16), se observan células del estigma y estilo ectópicas en el ápice de los sépalos y otros defectos en la morfología de pétalos, estambres y gineceo, que parece desarrollar repla ectópicos, o valvas con defectos de elongación (Groszmann et al. 2008). El hecho de que sólo cuando se añade un dominio de activación la sobreexpresión de *SPT* muestre efectos fenotípicos sugiere que la actividad *SPT* podría depender de la presencia de otros genes específicos de tejido para su funcionalidad durante el desarrollo.

Junto con *SPT*, los genes *HECATE* (*HEC1*, *HEC2* Y *HEC3*), que codifican factores de transcripción bHLH, son también esenciales para la formación del estigma, función en la que actúan de modo redundante. Los mutantes dobles *hec1 hec3* presentan defectos en

## INTRODUCCIÓN

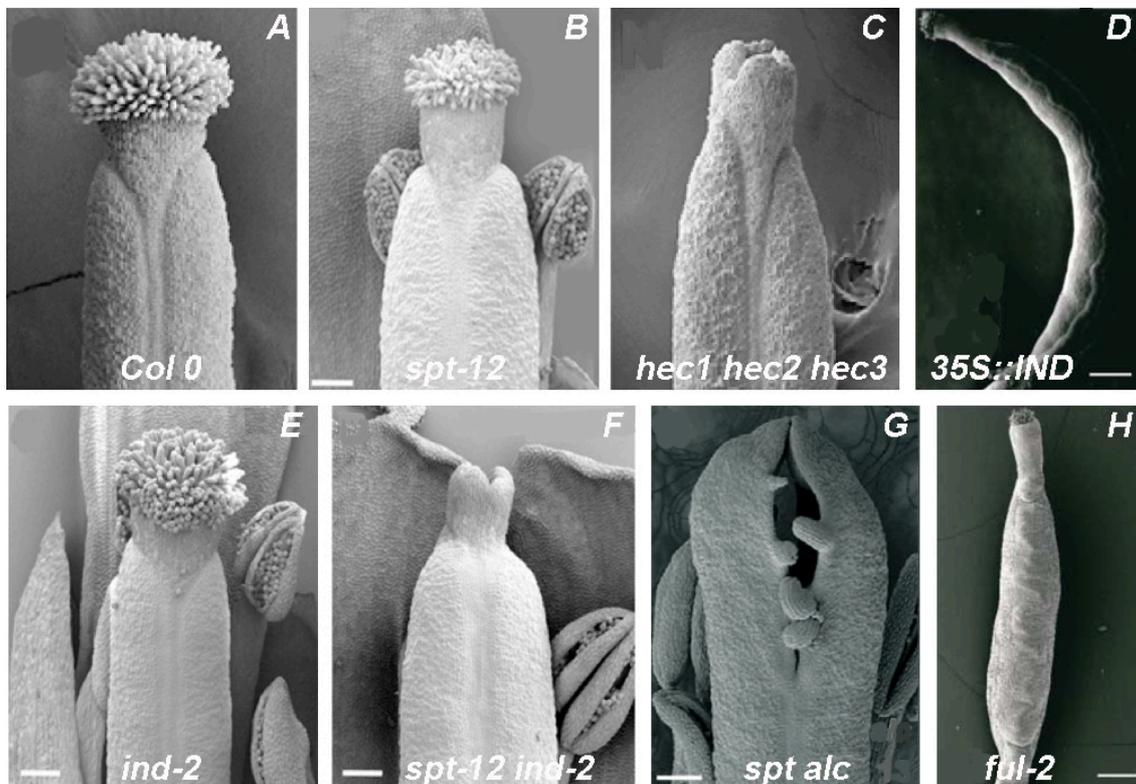
el estigma y el estilo equivalentes a los de un mutante *spt* débil, mientras que el triple mutante *hec1 hec2 hec3* es completamente estéril y muestra defectos de desarrollo más graves que los mutantes *spt* (Fig.I.3 C). La sobreexpresión de los genes *HEC* conduce a la producción ectópica de tejido estigmático y a otras alteraciones severas en la morfología del gineceo, como la reducción de las valvas y la mayor elongación del ginóforo (Gremski et al. 2007). Además se ha demostrado que las proteínas HEC son capaces de heterodimerizar con SPT en ensayos de doble híbrido de levadura (Gremski et al. 2007).

La proteína SPT también puede interactuar con INDEHISCENT (IND) (Girin et al. 2011) otro factor de transcripción de tipo bHLH, parálogo cercano de los genes *HEC* (Gremski et al. 2007). *IND* inicialmente se caracterizó por estar implicado en la especificación del margen de la valva, controlando la diferenciación de los tipos celulares que después de la fertilización del gineceo darán lugar a la zona de dehiscencia en el fruto. Los mutantes *ind* carecen por completo tanto de la capa de lignificación como de la capa de separación en la zona de dehiscencia, lo cual hace que los frutos maduros no se abran al final de desarrollo (Fig.I.3 E) (Liljegren et al. 2004; Sorefan et al. 2009) pero además también se ha descrito que *IND* está implicado en el desarrollo del estigma. Aunque los mutantes *ind* tan solo muestran una reducción muy sutil de la longitud de las papilas estigmáticas, el doble mutante *ind spt* presenta unos fenotipos similares a los del triple mutante *hec1 hec2 hec3* y carece por completo de estigma (Fig.I.3 F) (Girin et al. 2011). Por otro lado, las líneas *35S::IND* muestran ovarios reducidos con células pequeñas en las valvas, el replum en zig-zag, un incremento en la elongación del estilo y, en los casos con fenotipo más severo, una sobreproducción de tejido estigmático (Fig.I.3 D) (Girin et al. 2011; Liljegren et al. 2004).

Otro factor de tipo bHLH, ALCATRAZ (*ALC*), actúa junto con *IND* como regulador en la especificación del margen de valva, aunque los mutantes *alc* tienen únicamente afectada la capa de separación y solo presentan problemas leves en la dehiscencia del fruto (Rajani and Sundaresan 2001). *ALC* está filogenéticamente muy relacionado con *SPT*, y ambas proteínas comparten patrones de expresión solapantes y son capaces de heterodimerizar (Groszmann et al. 2011; Groszmann et al. 2008). El doble mutante *alc spt* presenta defectos pronunciados en la parte apical del gineceo, más severos que en los mutantes *spt*, y también en el margen de valva, produciendo frutos menos dehiscentes que los del mutante *alc*, indicando que *ALC* y *SPT* tienen papeles parcialmente redundantes en el desarrollo del gineceo (Fig.I.3 G) (Groszmann et al. 2011).

En resumen, podemos destacar que varios miembros de la familia bHLH tienen papeles importantes en el desarrollo del estigma, el estilo y el tracto de transmisión. Estos

factores pertenecen a dos subgrupos de parálogos cercanos: por un lado, *HEC1*, *HEC2*, *HEC3* e *IND* y, por otro, *SPT* y *ALC*, y funcionan de modo parcialmente redundante. La mayoría de ellos, además, participan en la formación del margen de valva y la zona de dehiscencia, proceso en el que *IND* es esencial. Además, como se ha ido mencionando, estos factores pueden formar homo y heterodímeros y estas interacciones pueden ser necesarias para su función, como se deduce del hecho de que el factor de transcripción *SPT* parezca depender de su interacción con otros factores para ser activo. Un ejemplo de la importancia funcional de estos complejos es el propuesto por Girin et al. en 2011, donde demuestran que *IND* activa a *SPT*, y después, formando un heterodímero, regulan conjuntamente a *PINOID* (*PID*) (Bennett et al. 1995) y *WAG2* (Santner and Watson 2006), quinasas encargadas de regular a los transportadores de auxinas de tipo *PINFORMED* (*PIN*) (Okada et al. 1991), para dar lugar al desarrollo del estigma.



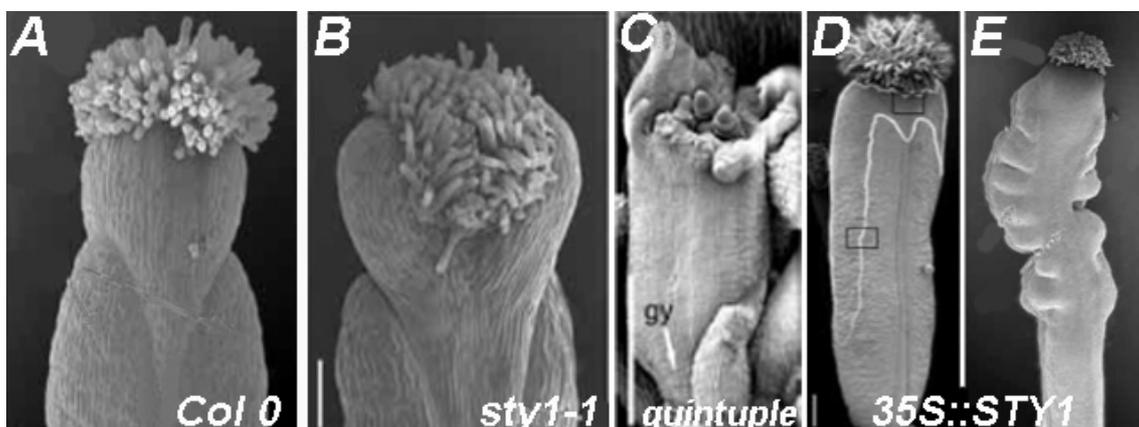
**Figura I.3: Fotografías al microscopio electrónico de barrido (SEM) de flores de (A) Col 0** (Escala=200 $\mu$ m) (tomada de Schuster et al., 2015), **(B) mutante *spt-12*** (E=100 $\mu$ m) (tomada de Girin et al., 2011), **(C) triple mutante *hec1 hec2 hec3*** (E=200 $\mu$ m) (tomada de Schuster et al., 2015), **(D) *35S::IND*** (E=500 $\mu$ m) (tomada de Liljegren et al., 2004), **(E) mutante *ind-2*** (E=100 $\mu$ m) (tomada de Girin et al., 2011), **(F) doble mutante *spt-12 ind-2*** (E=100 $\mu$ m) (tomada de Girin et al., 2011) **(G) doble mutante *spt alc*** (E=100 $\mu$ m) (tomada de Groszmann et al., 2011), **(H) mutante *ful-2*** (E=500 $\mu$ m) (tomada de Liljegren et al., 2004).

Otro elemento común entre estos factores es su regulación por factores de la familia MADS. Por un lado, *SHP1* y *SHP2* activan a *IND*, *ALC* y posiblemente a *SPT* (Groszmann et al. 2011), mientras que *FRUITFULL* (*FUL*), que se expresa principalmente en las

## INTRODUCCIÓN

valvas, actúa a su vez como regulador negativo de *SHP*, *IND*, *ALC* y *SPT* en este dominio (Ferrándiz et al. 2000b; Groszmann et al. 2011; Liljegren et al. 2004). Así, los mutantes *shp1 shp2* son indehiscentes, mientras que los mutantes *ful* producen frutos pequeños donde las valvas no se diferencian bien y adquieren características propias de la zona de dehiscencia, presentan un replum muy ensanchado, con células largas y dispuestas en zig-zag, y estilos alargados (Fig.I.3 H) (Ferrándiz et al. 2000a; Ferrándiz et al. 2000b; Gu et al. 1998).

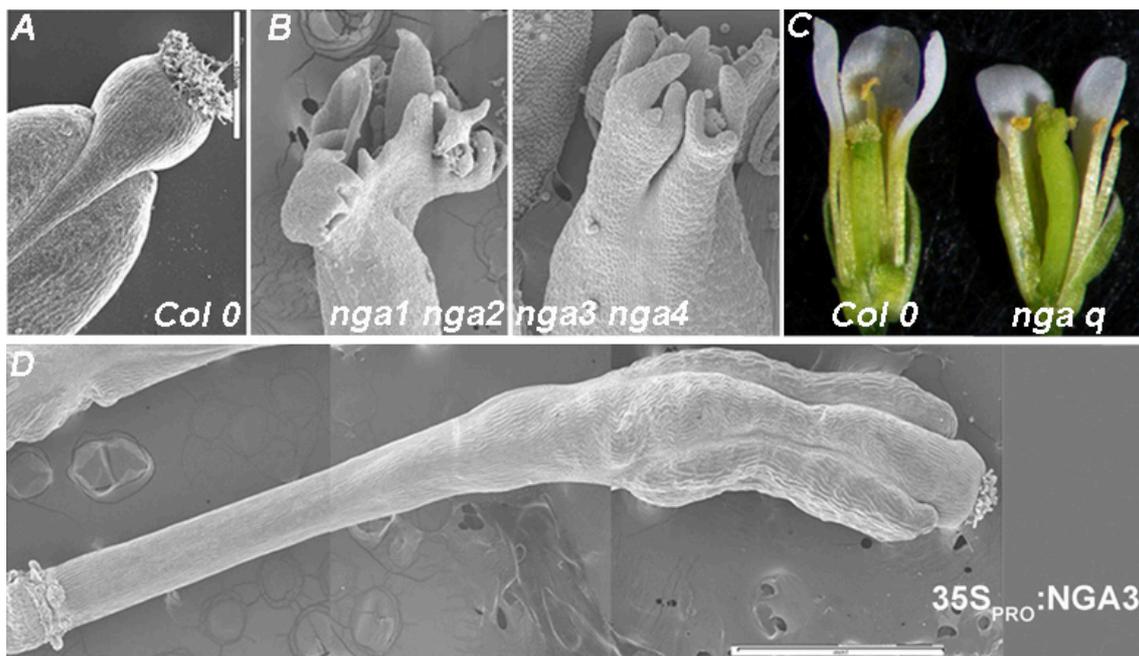
Otros factores esenciales para el desarrollo del estilo y el estigma son los miembros de la familia *SHORT INTERNODE /STYLISH (SHI/STY)*, que codifican factores de transcripción de tipo *zinc-finger*. Los genes de esta familia, compuesta por 10 genes, controlan de manera redundante el desarrollo del estilo y del estigma (Kuusk et al. 2002; Kuusk et al. 2006). De todos los mutantes sencillos de los genes de la familia *SHI/STY* únicamente el mutante *sty1-1* causa una pequeña depresión en el estilo (Fig.I.4 B) (Kuusk et al. 2002), mientras que las combinaciones de mutantes múltiples afectan gravemente el desarrollo de la parte apical del carpelo y presentan una disminución progresiva en la formación del tejido estigmático y estilar y en el tamaño del gineceo (Fig.I.4 C) (Kuusk et al. 2006). Las líneas de sobreexpresión de *STY1* presentan frutos anómalos con estilos cortos y compactos formados por células de tamaño y forma irregular desarrollando parches ectópicos de células estilares a lo largo de las valvas (Fig.I.4 D Y E) (Kuusk et al. 2002). Además de su papel en el desarrollo del gineceo, los genes *SHI/STY* tienen funciones generales en el desarrollo de otros órganos, ya que los mutantes múltiples en miembros de la familia presentan hojas anchas y aserradas, que frecuentemente muestran defectos en el establecimiento de la polaridad abaxial-adaxial, órganos florales con morfologías aberrantes y/o transformaciones homeóticas y defectos en el desarrollo vascular (Kuusk et al. 2006).



**Figura I.4: Fotografías al microscopio electrónico de barrido (SEM) de gineceos en estadio 13 de (A) Col 0 (Escala=100µm) (tomada de Kuusk et al., 2002), (B) *sty1-1* (E=100µm) (tomada de Kuusk et al., 2002), (C) gineceo en estadio 12 del quintuple mutante *sty1-1 sty2-1 shi-3 lrp1 srs5-1* (E=100µm) (tomada de Kuusk et al., 2006), (D) gineceo en estadio 13 de *35S::STY1* (E=100µm) (tomada de Kuusk et al., 2002), (E) silicua de *35S::STY1* (E=100µm) (tomada de Kuusk et al., 2002).**

Al igual que los genes *SHI/STY*, los genes *NGATHA* (*NGA*) juegan también papeles esenciales para la especificación de los tejidos apicales del gineceo (Alvarez et al. 2009; Trigueros et al. 2009). Los genes *NGA* forman una pequeña subfamilia de cuatro miembros dentro de la familia de factores de transcripción de tipo B3 y actúan de forma redundante para especificar la identidad del estilo y el estigma. Mientras que los mutantes simples no presentan defectos en la parte apical del gineceo o los defectos son muy sutiles, el cuádruple mutante *nga1 nga2 nga3 nga4* presenta problemas en la fusión de la parte apical del carpelo y carece por completo de estilo y estigma (Fig.I.5 A, B, C), fenotipos muy similares a los causados por las mutaciones múltiples en los miembros de la familia *SHI/STY* (Fig.I.4 B, C) (Trigueros et al. 2009).

Los frutos de las líneas de sobreexpresión de *NGA* se caracterizan por tener una parte apical engrosada, unos ovarios de pequeño tamaño que presentan unas valvas reducidas drásticamente, un replum ancho y con las células dispuestas en zig-zag, y unos ginóforos alargados (Fig.I.5 D) (Trigueros et al. 2009).

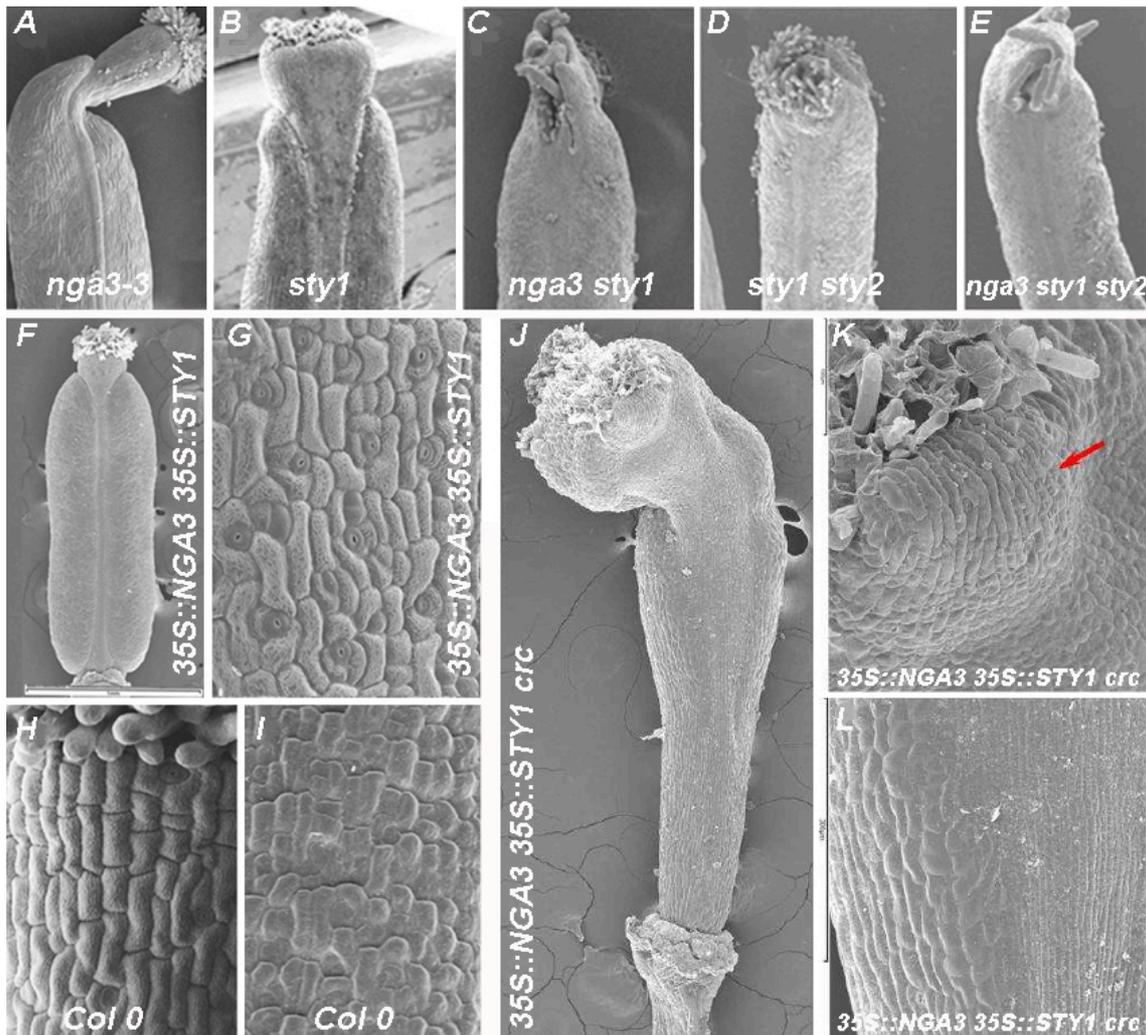


**Figura I.5: Fenotipo de los mutantes *nga*.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la parte apical de los carpelos de (A) Col-0 (E=500μM), (B) mutante cuádruple *nga1 nga2 nga3 nga4* (E=400μM). (C) Fotografía a bajo aumento de una flor Col-0 y *nga1 nga2 nga3 nga4*. (D) Imágen de microscopía electrónica de barrido (SEM) del fruto de la línea de sobreexpresión de *NGA3* (E=1mm). (Tomadas de Trigueros et al., 2009).

La similitud de los fenotipos de los mutantes múltiples de los genes *SHI/STY* y *NGA* sugiere que pueden estar actuando en la misma ruta genética, algo que concuerda con el fenotipo de las combinaciones dobles de mutantes en un miembro de cada una de las familias, prácticamente idéntico a los observados en los mutantes cuádruples *nga* (Fig.I.5 B) o los quintuples mutantes *sty1 sty2 shi lrp1 srs5* (Fig.I.4 C) (Trigueros et al.

## INTRODUCCIÓN

2009; Navarrete-Gómez 2011). Se ha descrito que, a pesar de expresarse de un modo muy similar y en dominios altamente solapantes, los genes *NGA* no parecen ser necesarios para regular a los genes *SHI/STY* y viceversa (Trigueros et al. 2009). Por otro lado, la expresión constitutiva simultánea de *NGA3* y *STY1* produce unos fenotipos fuertemente sinérgicos y muy diferentes a los de la sobreexpresión de cada uno de estos genes por separado. Las líneas *35S::STY1 35S::NGA3* se caracterizan por presentar unos gineceos donde, a diferencia de los sobreexpresantes simples, las proporciones relativas de ginóforo, ovario y tejidos apicales son similares a las de plantas silvestres, aunque el tamaño del gineceo está fuertemente reducido, y donde lo más destacable es que las células de la epidermis de las valvas muestran la morfología característica de las células del estilo (Trigueros et al. 2009); Fig.I.6 F-I). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que *NGA* y *STY* actúan cooperativamente para regular dianas comunes, entre otras, las que promueven la especificación del estilo, y que podrían hacerlo formando parte de un complejo transcripcional. Sin embargo, no se ha logrado detectar la interacción física directa entre estos factores (Trigueros et al. 2009; Navarrete-Gómez 2011), por lo que, de hacerlo, sería necesario proponer que su interacción pudiera estar mediada por otros componentes. Un candidato probable es el factor de transcripción de tipo YABBY CRC, al menos en cuanto a su papel en la especificación del estilo. Por un lado, *CRC* es necesario para el correcto desarrollo del estilo y en menor medida del estigma (Bowman and Smyth 1999) y, además de en las regiones apicales del gineceo, *CRC* se expresa en la epidermis de las valvas, el dominio afectado por la sobreexpresión conjunta de *STY1* y *NGA3*. Además, se ha mostrado que *CRC* es capaz de interactuar con *STY1* y *NGA3* simultáneamente mediante experimentos de Bi/TriFC (Navarrete-Gómez 2011). Por último, al sobreexpresar simultáneamente *NGA3* y *STY1* en un fondo *crc* se revierte totalmente la formación de tejido ectópico de estilo en la valva, los frutos muestran una reducción importante del tejido estigmático y sólo muy rara vez se forman células del estilo, que, cuando aparecen, forman grupos aislados asociados generalmente a las papilas estigmáticas (Fig.I.6 J-L). Todo ello sugiere que, posiblemente, un complejo formado por *STY*, *NGA* y *CRC* sería necesario para especificar el estilo (Navarrete-Gómez 2011).



**Figura I.6: Fenotipo de las combinaciones de líneas con actividad NGA, STY y CRC alterada.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la parte apical de los carpelos de (A) *nga3-3*, (B) *sty1*, (C) *nga3 sty1*, (D) *sty1 sty2*, (E) *nga3 sty1 sty2*. (A-E, E=500µM). (F) *35S::NGA3 35S::STY1*, cabe destacar que este fruto no mide más de 2 mm, frente a los 15 mm que puede llegar a medir un fruto Col-0 elongado (E=1mm), (G) detalle de las células epidérmicas en la región central de las valvas de *35S::NGA3 35S::STY1* (E=50µM), (H) detalle de las células epidérmicas en el estilo de Col 0 (E=50µM), (I) detalle de las células epidérmicas en la región central de las valvas de Col 0 (E=50µM), (J) *35S::NGA3 35S::STY1 crc* (E=1mm), (K) detalle de la zona apical del fruto *35S::NGA3 35S::STY1 crc*, donde se observan pequeños grupos aislados de células del estilo (flecha roja) (E=100µM), (L) detalle de la zona media del fruto *35S::NGA3 35S::STY1 crc*, donde no se observan células del estilo (E=300µM), (Tomadas de Trigueros et al., 2009; Navarrete-Gómez, 2011).

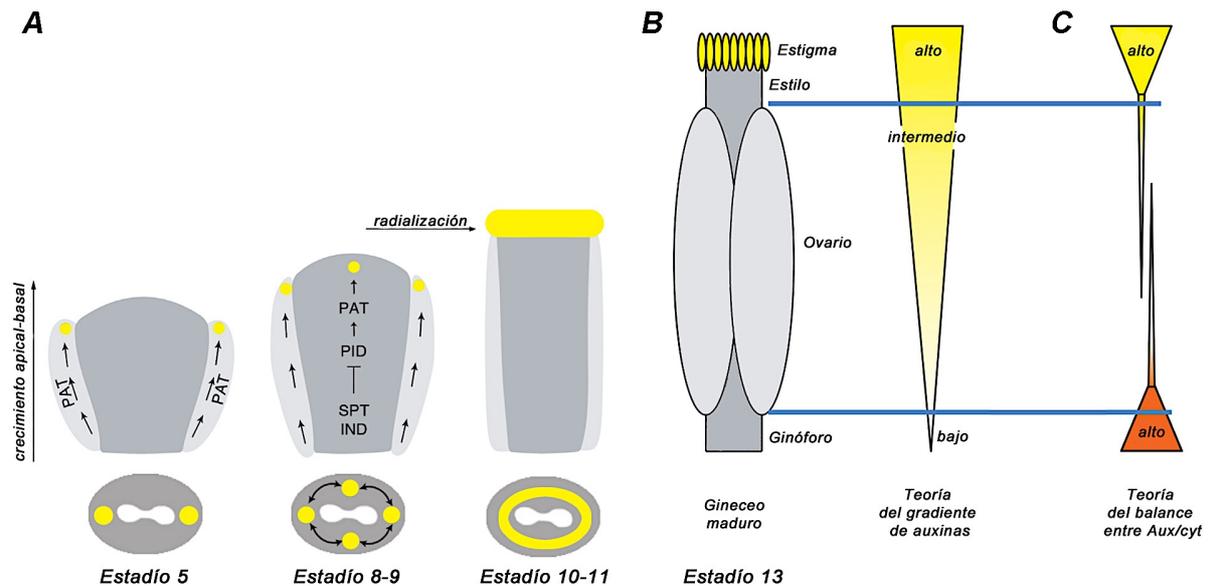
### 3.- El papel de las hormonas en la morfogénesis del gineceo.

Diversas evidencias experimentales indican que las hormonas también juegan un papel muy importante en el desarrollo del gineceo. Estas evidencias están basadas en: los efectos que producen las mutaciones en las rutas de biosíntesis, transporte, señalización y respuesta a las hormonas en este proceso; en el efecto de las mutaciones en los factores de transcripción que participan en la regulación de las vías hormonales; y en el efecto de los tratamientos exógenos de hormonas, solos o en combinación con los mutantes.

## INTRODUCCIÓN

La hormona vegetal auxina juega un papel central en la morfogénesis del gineceo. Nemhauser et al. (2000) propusieron un modelo en el que las auxinas estarían involucradas en el establecimiento de la polaridad apical-basal, postulando la existencia de un gradiente de auxinas a lo largo del primordio del gineceo, con un nivel máximo apical que induciría la diferenciación del estigma y el estilo, un nivel medio en el dominio central que dirigiría el desarrollo del ovario, y un nivel mínimo en la parte inferior especificando la formación del ginóforo (Fig.I.7 B). Este modelo explicaba bien los fenotipos que resultan de la inhibición del transporte de auxinas mediante tratamientos químicos o cuando se altera genéticamente la síntesis de las mismas o su transporte, aunque la propia existencia de dicho gradiente o su naturaleza exacta no ha podido ser validada experimentalmente de momento (Nemhauser et al. 2000).

Sin embargo, dos trabajos recientes han mostrado mediante la utilización de marcadores de concentración de auxinas y otras líneas reporteras relacionadas que, tras la aparición del primordio del gineceo y cuando aún no se ha empezado a formar el cilindro que dará lugar al pistilo, se detecta un máximo de auxinas en forma de banda en el plano lateral, que, una vez que el tubo empieza a elongarse, queda restringido a dos focos laterales de auxinas en la zona apical. Posteriormente, aparecen dos focos apicales adicionales ubicados en posición medial que se pueden detectar débilmente en un principio y que van aumentando en intensidad conforme avanza el desarrollo hasta que, inmediatamente antes de la formación del estilo, los cuatro focos se conectan entre si formando un anillo de alta concentración de auxinas con simetría radial que abarca toda la parte apical (Larsson et al. 2014); (Fig.I.7 A). Este estudio parece indicar que, más que la existencia del gradiente, es importante la generación de estos focos y del anillo apical en los estadios adecuados para que tanto la simetría medio-lateral como la posición y extensión de los distintos dominios se establezcan correctamente, así como para asegurar el cierre apical del gineceo y el desarrollo del estigma y el estilo, aunque no resuelve completamente como se establecen y mantienen. Otro trabajo reciente (Moubayidin and Ostergaard 2014) muestra que la formación del anillo apical de alta concentración de auxinas juega un papel crucial en la transición de simetría bilateral en el ovario a simetría radial en la parte apical del gineceo, el estilo y el estigma.



**Figura I.7: Modelos de acumulación de auxinas durante el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.** (A) **Modelo de establecimiento de simetría radial en el extremo superior de un órgano creciente.** El modelo muestra la acumulación de auxinaa (en amarillo) que se da a través del transporte polar de auxinas (PAT, flechas) y que precede al cambio de simetría bilateral a radial durante el desarrollo del gineceo. En el estadio 5 se observan dos picos de auxinas en cada lateral de la parte superior del gineceo, manteniendo el crecimiento apical-basal de éste; en el estadio 8 y 9, SPT e IND reprimen la expresión de PID, promoviendo así la localización apolar de PIN que lleva a la acumulación de auxina en la parte superior medial y, posteriormente, la formación del anillo de auxina radial en las etapas 10 y 11. (Tomada de Moubayidin et al., 2014), (B) **Teoría del gradiente de auxinas de Nemhauser et al. 2000.** En la teoría se sugiere que el patrón apical-basal depende y de acuerdo con el modelo propuesto, concentraciones altas de auxinas (amarillo) por lo general resultan en la proliferación estilo y el estigma, mientras que se requiere nivel intermedio auxina para la formación de ovario, y el nivel bajo para la formación del ginóforo. (Tomada de Sundberg et al., 2009), (C) **Modelo alternativo del gradiente de auxinas propuesto por Østergaard (2009).** En este modelo se sugiere que en la formación de la región ovario se requerirían bajas concentraciones de auxinas (amarillo) y citoquininas (naranja), mientras que altas concentraciones de auxinas inducen el estilo y el estigma y altas concentraciones de citoquinina el ginóforo. (Tomada de Sundberg & Østergaard, 2009).

Los modelos descritos, como se ha mencionado, no explican completamente cómo se generan éstos focos de concentración de auxinas ni su evolución, aunque proponen que existe un transporte polar hacia el ápice y que el vaciado progresivo en las regiones basales (compatible con el modelo del gradiente) podría producirse por la elongación del tubo pistilar (Larsson et al. 2013; Ostergaard 2009; Sundberg and Ostergaard 2009; Sehra and Franks 2015). Sin embargo, aunque las mutaciones en genes relacionados con el transporte polar de auxinas, como *PINFORMED* (*PIN*) o las quinasas encargadas de la localización de los transportadores *PIN*, *PID*, *WAG1*, *WAG2* y *PID2* tienen efectos evidentes en la morfogénesis del gineceo (Benková et al. 2003; Bennett et al. 1995; Friml et al. 2004; Okada et al. 1991; Santner and Watson 2006), también las mutaciones en los genes involucrados en la biosíntesis de auxinas como *YUCCA* (*YUC*) (Cheng et al. 2006; Mano and Nemoto 2012; Zhao et al. 2001), *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS* (*TAA*) (Mano et al. 2010; Stepanova et al. 2011) y *AMIDASE1* (*AMI1*) (Mano et al. 2010) afectan severamente la morfología del pistilo.

## INTRODUCCIÓN

Varios de estos genes se expresan en la parte apical del gineceo (Martinez-Fernandez et al. 2014; Trigueros et al. 2009), lo que sugiere que la síntesis local de auxinas también podría tener un papel importante en el establecimiento y/o mantenimiento de los máximos de concentración de esta hormona.

Junto con las alteraciones en la síntesis y el transporte, las mutaciones en algunos factores de respuesta a auxinas (*ARFs*) (Crawford and Yanofsky 2011; Sessions and Zambryski 1995) pueden provocar alteraciones en el desarrollo del gineceo. Los fenotipos de estos mutantes van desde defectos moderados del tracto de transmisión a morfologías anómalas del gineceo muy evidentes, tales como su transformación en estructuras similares a tallos, y alteraciones en el patrón normal del gineceo produciendo un aumento de las regiones apical y basal y una reducción importante en el tamaño del ovario (Reyes-Olalde et al. 2013).

El factor de respuesta a auxinas *ETTIN* (*ETT/ARF3*) ha sido propuesto como un factor esencial para el establecimiento de la polaridad apical-basal. En un principio se propuso que jugaba un papel importante en la correcta distribución e interpretación del gradiente de concentración de auxinas (Nemhauser et al. 2000), aunque actualmente se cree que su papel principal es la regulación negativa de *SPT*, *HEC* y otros factores en posiciones basales del ovario, quizá respondiendo a diferencias en la concentración de auxinas (Alvarez and Smyth 1999; Gremski et al. 2007; Heisler et al. 2001). El gineceo de los mutantes *ett* muestra un incremento de las regiones apicales (estilo y estigma) y basal (ginóforo), a costa de una reducción en el tamaño del ovario. La hipótesis que explica este fenotipo es que en los mutantes *ett* la respuesta a auxinas está alterada, interpretándose de manera errónea las concentraciones de la misma (Heisler et al. 2001; Sessions 1997; Sessions and Zambryski 1995). Además de *ETT*, se ha descrito que otros dos factores de transcripción de respuesta a auxina, *ARF6* y *ARF8*, parálogos cercanos, regulan la maduración tanto de los estambres como del gineceo. De hecho, las flores de los dobles mutantes *arf6 arf8* son estériles, tienen yemas cerradas, presentan pétalos pequeños y estambres con filamentos cortos y anteras indehiscentes que no liberan el polen y gineceos inmaduros (Nagpal et al. 2005; Rademacher et al. 2011).

Tanto los factores de la familia *SHI/STY* como los de la familia *NGA* tienen papeles importantes en la regulación de las vías de señalización de auxinas que podrían explicar, al menos en parte, su función esencial en la formación de estilo y estigma. Se ha descrito que *STY1* regula a los genes de biosíntesis de auxinas, *YUC4* y *YUC8* y otros genes de respuesta rápida a auxinas como *YADOKARI 1* (*GH3-2/YDK1*), involucrado en la desactivación de la hormona por conjugación y regula su concentración, entre otros (Takase et al. 2004; Eklund et al. 2010; Sohlberg et al. 2006; Staldal et al. 2012). Por otro lado, se ha mostrado que los factores *NGA* dirigen la síntesis de auxinas en la zona

apical del primordio del gineceo mediante la regulación de la expresión de *TAA1*, *AMI1*, *YUC2*, *YUC4* o *YUC8*, y que también regulan directa o indirectamente la expresión de genes implicados en su transporte, como *PIN3*, *PID* o *WAG2*, y en su respuesta, como *ARF1* y *ARF11*, pero en todos los casos (regulación, transporte y respuesta) *NGA* requiere de factores adicionales para ejercer su función (Martínez-Fernández et al. 2014; Trigueros et al. 2009). Los genes de la familia *SHY/STY* y los genes *NGA* comparten patrones de expresión (Trigueros et al. 2009) y dianas comunes como las mencionadas, lo que evidencia el paralelismo funcional que existe entre ellos y que se extiende también a la regulación de las auxinas.

Por último, y aunque ya se ha mencionado, cabe recordar que los factores bHLH importantes para el desarrollo de los tejidos marginales en el gineceo ejercen su función, al menos en parte, a través de la regulación directa de las vías de señalización de auxinas. Por un lado, *SPT* e *IND* se unen y regulan a *PID* y *WAG2* (Girin et al. 2011); por otro, crear un mínimo de auxinas en la zona de dehiscencia es esencial para que ésta ocurra y también depende de *IND* (Sorefan et al. 2009). Además, un estudio reciente ha mostrado que tanto *SPT* como *HEC* controlan la expresión de los transportadores de auxinas *PIN1* y *PIN3* y la enzima de biosíntesis de auxinas *YUC4* (Schuster et al. 2015). Además, como ya hemos mencionado, *SPT* y *HEC* están bajo control negativo de *ETT*, lo que impide la expresión de estos genes en los dominios abaxiales de las regiones basales durante el desarrollo del gineceo (Gremski et al. 2007; Heisler et al. 2001).

Junto con las auxinas, las citoquininas también participan de un modo crucial en la morfogénesis del gineceo. Estas hormonas vegetales están implicadas en diferentes procesos del desarrollo como son la formación y mantenimiento de los meristemas, la formación de los órganos laterales o la germinación de las semillas, pero además se ha demostrado que las citoquininas están implicadas en la regulación del tamaño de los órganos florales, el número de óvulos y el desarrollo de los mismos en el gineceo. De hecho, las mutaciones en las enzimas responsables del catabolismo de las citoquininas, por ejemplo la citoquinina oxidasa/deshidrogenasa (CKXs), causan gineceos de mayor tamaño y con más óvulos (Bartrina et al. 2011).

Clásicamente, las citoquininas han sido implicadas en funciones antagonistas a las auxinas (Shani et al. 2006). De acuerdo con esta visión, Ostergaard en 2009 propuso una modificación del modelo del gradiente de las auxinas en el que las citoquininas estarían distribuidas a lo largo del eje apical basal del gineceo formando un gradiente inverso al de las auxinas, donde en la parte basal del gineceo se localizaría un nivel máximo y estableciéndose, por tanto, tres territorios hormonales distintos donde niveles

## INTRODUCCIÓN

altos de auxinas y bajos de citoquininas promoverían el desarrollo de los tejidos apicales, niveles bajos de auxinas y de citoquininas especificarían el ovario y niveles bajos de auxinas y altos de citoquininas serían necesarios para la formación del ginóforo en la base (Fig.I.7 C) (Ostergaard 2009; Sundberg and Ostergaard 2009). Sin embargo, en trabajos recientes se ha estudiado el patrón de acumulación de citoquininas mediante el uso de líneas reporteras y no se han encontrado evidencias de este gradiente. De hecho, la acumulación de citoquininas está fundamentalmente ligada a los tejidos mediales: en gineceos en estadios tempranos, utilizando el marcador de respuesta transcripcional de citoquinina (TCS::GFP), se observa expresión en el meristemo medial del gineceo, y en estadios más avanzados la expresión se localiza en el septum, tracto de transmisión y en los márgenes de las válvulas (Marsch-Martinez et al. 2012a). Por otro lado, los tratamientos con citoquinina exógena (Benzyl Amino Purina, BAP) pueden producir defectos que recuerdan a los producidos por la inhibición del transporte de auxinas (Marsch-Martinez et al. 2012a) y además se ha observado que los mutantes del transporte de auxinas *pin3* y *pin7* y los de los factores de respuesta a auxinas *arf7* y *arf19* son hipersensibles a tratamientos con BAP (Marsch-Martinez et al. 2012a; Marsch-Martinez et al. 2012b; Zuniga-Mayo et al. 2014). Todo ello apunta a que la dinámica entre las auxinas y citoquininas tendría un carácter antagónico basándose, por un lado, en la similitud de los efectos que provocan en el patrón apical-basal de gineceos en estadios tempranos tanto las aplicaciones exógenas de BAP como de NPA (Zuniga-Mayo et al. 2014) y, por otro, en que los tratamientos exógenos con BAP provocan la proliferación de tejido ectópico en el que se observa expresión de DR5 y de PIN1 (Marsch-Martinez et al. 2012a; Zuniga-Mayo et al. 2014), lo que sugiere que las citoquininas pueden alterar el transporte de las auxinas en los tejidos del gineceo (Zuniga-Mayo et al. 2014).

El antagonismo entre auxinas y citoquininas implica también una coordinación e intercomunicación estrecha de las vías de señalización correspondientes. Varios estudios han demostrado que esta intercomunicación puede ocurrir a diferentes niveles: las citoquininas pueden afectar la síntesis, transporte y señalización/respuesta a las auxinas y de manera inversa, las auxinas pueden afectar la síntesis, degradación y señalización/respuesta a las citoquininas (Hwang et al. 2011; El-Showk et al. 2013). Muchos de los factores implicados en la morfogénesis del gineceo parecen desempeñar papeles en esta coordinación al ser reguladores de componentes de ambos tipos de vías de señalización. Por ejemplo, el factor de respuesta a auxinas ETT se une al promotor de una isopenteniltransferasa implicada en la biosíntesis de citoquinina, *ISOPENTENIL-TRANSFERASA 5 (IPT5)* (Cheng et al. 2013). Otra publicación reciente muestra como HEC1 y SPT interactúan físicamente y modulan la acción de las citoquininas activando

al regulador negativo de la señalización de citoquininas, *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR1 (ARR1)* (Schuster et al. 2015). Estos resultados, junto con los mencionados anteriormente del trabajo de Girin et al., (2011) donde describen que SPT e IND regulan a las quinasas *PID* y *WAG2*, que a su vez regulan a PIN; los de Heiser et al. (2001) y Gremski et al., (2007) donde indicaban que *SPT* y *HEC* están regulados por ETT; y los de Schuster et al., (2015), que dicen que SPT y HEC regulan a *PIN1*, *PIN3* y *YUC4*, indican que el control extremadamente fino del balance entre auxinas y citoquininas por diferentes factores, es importante para el correcto desarrollo del gineceo.

Además de las auxinas y las citoquininas, las mutaciones en los componentes de otras vías, tales como brasinoesteroides y giberelinas indican que estas hormonas también participan en el desarrollo del gineceo, aunque en algunos casos se requieren combinaciones de varias mutaciones para producir fenotipos alterados, lo que sugiere un alto grado de redundancia en las funciones de los genes implicados en estas vías e indicando que parecen tener papeles menores en el desarrollo del gineceo.

#### **4.- Los genes *NGATHA*.**

Como ya hemos indicado, esta tesis tiene como objetivo entender mejor como se diferencian los tejidos apicales en el gineceo de *Arabidopsis thaliana*. Por ello, hemos elegido estudiar con más detalle tanto la regulación como el modo de acción de los factores NGA, que como ya hemos descrito, son esenciales para la formación de dichos tejidos.

##### 4.1.- Propiedades moleculares de los factores de la subfamilia *NGATHA*.

Los genes *NGATHA (NGA)* están incluidos en la superfamilia de proteínas con dominio B3 de Arabidopsis. El dominio B3 (número de acceso en Pfam 02362) es un dominio de unión a DNA, el cual se ha caracterizado en un gran número de factores de transcripción de plantas. Fue denominado así porque es el tercer dominio básico en la proteína de maíz VIVIPAROUS1 (VP1). El dominio B3 no es un dominio específico de angiospermas, aunque sí de plantas, ya que también está presente en genes de gimnospermas, helechos, musgos, hepáticas y algas verdes.

Muchas de las proteínas que contienen dominios B3 se han clasificado funcionalmente como factores de respuesta hormonales, en concreto a ácido abscísico y a auxinas, fitohormonas con un papel importante en procesos de desarrollo como el crecimiento de las plantas y la maduración de las semillas (McCarty et al. 1989; Ulmasov et al. 1997).

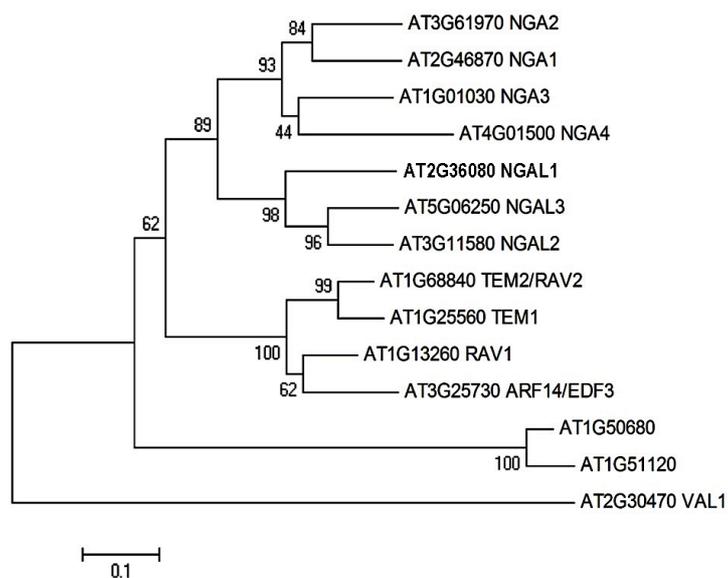
La superfamilia de factores de transcripción de tipo B3 de Arabidopsis consta de 118

## INTRODUCCIÓN

genes agrupados en 6 familias génicas. Las familias **LAV** (*LEAFY COTILEDON2 (LEC2)-ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3)-VAL*), **ARF** (*AUXIN RESPONSE FACTOR*), **RAV** (*RELACIONADO CON ABI3 Y VP1*) y **REM** (*REPRODUCTIVE MERISTEM*) son las más representativas (Swaminathan et al. 2008).

Los cuatro genes *NGATHA* (*NGA1, NGA2, NGA3* y *NGA4*) se encuentran formando un subgrupo dentro de la familia RAV. La familia RAV está formada por 13 genes (Fig.I.8). Los primeros miembros en ser identificados fueron los genes *RAV1* y *RAV2* (*RELATED TO ABI3/VP1*), los cuales recibieron ese nombre por su homología con los genes *ABI3* de *Arabidopsis* y *VP1* de maíz (Kagaya et al. 1999). Seis de los miembros de esta familia poseen, además de un dominio B3, un dominio de unión a DNA del tipo APETALA2 (Kim et al. 2006; Magnani et al. 2004; Okamoto et al. 1997). Algunos miembros de esta familia están relacionados con respuestas a otras hormonas, como brasinoesteroides (Mouchel et al. 2006; Vert and Chory 2006) y etileno (Alonso et al. 2003). Algunos genes de función conocida dentro de la familia RAV son el gen *RAV1*, que actúa como un regulador negativo del crecimiento y tiempo de floración y que está reprimido por brasinoesteroides (Hu et al. 2004; Zhao et al. 2008), y los genes *TEMPRANILLO1 (TEM1)* y *TEM2* que controlan el tiempo de floración (Castillejo and Pelaz 2008).

Como hemos indicado anteriormente, los 4 genes *NGA* pertenecen a la familia génica RAV ya que presentan un dominio B3 análogo al de los otros 9 miembros del grupo, pero los 4 genes *NGA* junto con otro clado hermano que consta de 3 genes más, los *NGATHA-LIKE (NGAL1, NGAL2/SOD7* y *NGAL3/DPA4)* (Engelhorn et al. 2012; Shao et al. 2012; Zhang et al. 2015), perdieron el dominio de unión a DNA del tipo AP2 característico del clado RAV.



**Figura I.8: Relación filogenética de los RAV de *Arabidopsis thaliana*.** Árbol filogenético de las proteínas RAV de *Arabidopsis*. VAL1 (At2g30470) se utilizó como un grupo externo, y los números representan el porcentaje de *bootstrap* de 1000 ensayos. (Modificado de Shao et al., 2012).

Experimentos de selección de sitios de unión (o SELEX) realizados con el factor RAV1, que contiene tanto el dominio AP2 como el B3 mostraron que estos dominios reconocían preferentemente los motivos CAACA y CACCTG respectivamente y sin restricciones rígidas de la distancia entre ellos ( $N_3$ - $N_9$ ) o la orientación en la que estaban presentes, y que la unión a estos dos motivos afectaba cooperativamente a la afinidad de la unión (Kagaya et al. 1999). Las proteínas NGA tienen un dominio B3 muy similar al de RAV1 (entre un 69 y un 75% de identidad de secuencia), pero experimentos llevados a cabo con el factor NGA1 mediante hibridación a micromatrices para unión de proteínas (PBM, de Protein Binding Microarrays; (Franco-Zorrilla and Solano 2014)) en colaboración con el grupo de los Dres. J.M. Franco-Zorrilla y R. Solano no fueron capaces de determinar ninguna secuencia preferente de unión, lo que sugiere que los factores NGATHA no son capaces de unirse a DNA de un modo específico, al menos como monómeros o como homodímeros, y que podría ser necesaria su interacción con otros factores para ello.

Se sabe que los genes *NGA1*, *NGA2*, *NGA3*, *NGA4*, *NGAL1*, *NGAL2/SOD7* y *NGAL3/DPA4* contienen un motivo de represión transcripcional (EAR). Este dominio es específico de los factores de transcripción de tipo B3 y contiene la secuencia de aminoácidos conservada, /RLFGV/, que es diferente a los motivos EAR conocidos y presentes en otros tipos de factores de transcripción (Ikeda and Ohme-Takagi 2009). También se ha demostrado que *NGA1*, *NGAL1* y *NGAL2/SOD7* son represores transcripcionales. Ikeda y Ohme-Takagi (2009) observaron que las plantas de las líneas que sobreexpresaban *NGA1L* y las plantas que lo sobreexpresaban fusionado con el dominio represor SRDX mostraban un fenotipo similar. Además en ensayos de expresión transitoria también demostraron que cuando se fusionaban *NGA1*, *NGAL1* y *NGAL2/SOD7* al dominio de unión a DNA de levadura Gal4 se reducía la expresión del gen reportador LUC que respondía a GAL4 en un 90% (Hiratsu et al. 2003; Ikeda and Ohme-Takagi 2009).

#### 4.2.- El papel de los genes *NGA* en la morfogénesis del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.

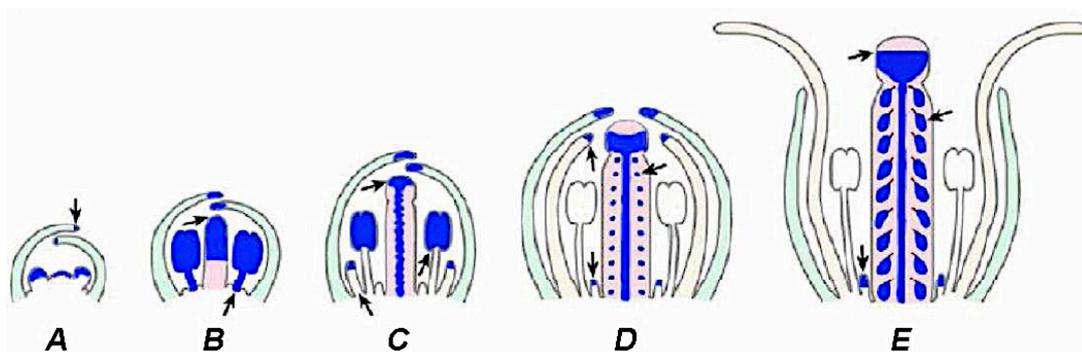
Como hemos dicho anteriormente, los genes *NGA* actúan de forma redundante en el desarrollo del gineceo, especialmente promoviendo la diferenciación de las células del estilo y el estigma. Mientras que los mutantes individuales en los diferentes loci *NGA* no presentan defectos en la morfología del carpelo, o los defectos son muy sutiles, los mutantes múltiples presentan defectos cada vez mayores en el desarrollo de la parte apical del gineceo y el cuádruple mutante *nga* presenta gineceos con ovarios normales, pero que carecen por completo de estilo, estigma y tracto de transmisión en la parte apical, terminando como una estructura abierta con protuberancias de tejido de valva. (Fig. I.5. A-C) (Trigueros et al. 2009). Por otro lado, y de una forma un tanto sorprendente, la sobreexpresión de *NGA3* produce frutos donde las alteraciones del

## INTRODUCCIÓN

desarrollo afectan tanto al eje apical-basal como al medio-lateral, con mayor desarrollo del ginóforo, del estilo y del estigma, un replum ancho y una reducción del ovario en comparación con el fenotipo silvestre (Fig. I.5.D). Estos fenotipos recuerdan en cierto modo a los de los mutantes *ful* o a los de las líneas de sobreexpresión de *IND* ya descritos (Fig. I.3.D y H) y, de hecho, se correlacionan con un bajo nivel de expresión de *FUL* y un alto nivel de expresión de *IND* en estos frutos (Navarrete-Gómez 2011).

Por otro lado, los fenotipos de sobreexpresión de *NGA3* recuerdan también a los observados en los gineceos de los mutantes *pin1*, *pid* o *ett*, o a los de gineceos tratados con NPA, el inhibidor del transporte de auxinas, lo cual concuerda con el papel regulador de los factores NGA a distintos niveles en las vías de señalización de auxinas ya señalados (Alvarez et al. 2009; Martínez-Fernández et al. 2014; Trigueros et al. 2009).

Los genes *NGA* se expresan de un modo bastante general durante el desarrollo de la planta, detectándose en raíces, tallos, hojas e inflorescencias (Trigueros et al. 2009). En éstas, los cuatro genes *NGA* comparten un patrón espacial muy similar, aunque con pequeñas diferencias. En general, la expresión en las yemas florales se localiza primero en todos los primordios florales cuando comienzan a emerger, para más tarde quedar restringida principalmente a la zona distal de todos ellos. Posteriormente, se observa señal en la parte apical del gineceo y la placenta, anteras, y extremo distal de pétalos y sépalos, y más tarde además en los primordios de los óvulos y nectarios. Cuando la flor alcanza su madurez en antesis, la expresión queda restringida a ovulos, placenta y estilo en el gineceo y los nectarios (Fig. I.9).



**Figura I.9: Diagrama del patrón de expresión de los genes *NGA* durante el desarrollo floral** (basado en resultados de hibridación *in situ* y actividad GUS). En azul se señalan las zonas donde se expresan los genes *NGA*. **(A)** Yema floral, se expresa en el extremo distal de sépalos y primordios de estambres y carpelos. **(B)** La señal se detecta en extremo distal de sépalos, mitad apical del gineceo y en estambres. **(C)** Los genes *NGA* se expresan en estambres, extremo distal de pétalos y sépalos y en la zona apical y la placenta del gineceo. **(D)** Además de en las regiones anteriores se empiezan a expresar en los primordios de óvulos y nectarios. **(E)** La expresión queda restringida al fruto, concretamente a los óvulos, placenta y estilo, y nectarios. (Tomado de Navarrete-Gómez, 2011).

A nivel más preciso, el patrón de expresión en gineceos de las líneas *NGA1p::GUS* se observa en la parte apical del gineceo, el estilo, la placenta y los primordios de los óvulos; en el caso de las líneas *NGA2p::NGA2:GUS* la expresión se observa en la zona

central del estilo, placenta, óvulos y valvas; en las líneas *NGA3p::GUS* la señal queda restringida a la zona del anillo apical que hay entre el estilo y el estigma, y los óvulos; y en las líneas *NGA4::GUS* se observa en el estilo y el estigma únicamente.

Cabe destacar que este patrón de expresión de los genes *NGA* durante el desarrollo de la flor coincide, en general, con zonas de máxima concentración de auxinas, lo cual concuerda con el papel descrito de los genes *NGA* en la regulación de estas vías de señalización.

Estudios realizados en la eudicotiledónea basal *Eschscholzia californica* y en la solanácea *Nicotiana benthamiana* indican que la función *NGA* está altamente conservada, al menos en las eudicotiledóneas (Fourquin and Ferrandiz 2014). Los patrones de expresión de *EcNGA*, *NtNGAa*, y *NtNGAb*, ortólogos en estas especies de los genes *NGA* de *Arabidopsis*, son similares entre ellos y también al de los genes *AtNGA*. Por otro lado, los mutantes *knockdown* generados mediante Silenciamiento Inducido por Virus (VIGS) en ambas especies produjo unos gineceos con una reducción extrema del estilo y de tejido estigmático, así como un gineceo abierto en la parte apical, características similares a las observadas en los mutantes múltiples de *A. thaliana*. Además, la expresión del gen *NtYUCCA* se encuentra reducida en los estilos y estigmas de los mutantes *knockdown NtNGA* generados por VIGS, sugiriendo que la conservación funcional se extendería también a la relación entre los genes *YUC* y *NGA*.

#### 4.3.- El papel de los genes *NGA* en el crecimiento de los órganos laterales.

Las hojas de roseta de los cuádruples mutantes *nga* son más anchas y más cortas que las hojas de las plantas silvestres (Fig. I.10. A,B), y este fenotipo se observa también en otros órganos florales, especialmente sépalos y pétalos (Alvarez et al. 2009; Alvarez et al. 2006; Fourquin and Ferrandiz 2014; Trigueros et al. 2009). Por el contrario, la sobreexpresión de *NGA* produce plantas de pequeño tamaño y con raíces primarias cortas, con hojas de roseta pequeñas, estrechas y alargadas (Fig. I.10. C), y este fenotipo se observa también en pétalos (Alvarez et al. 2009; Kwon et al. 2009; Trigueros et al. 2009). Alvarez et al. (2009) mostraron que los pétalos más grandes del mutante *nga1-1* son debidos al aumento de número de células, lo que sugiere que *NGA1* puede actuar como un regulador negativo de la proliferación celular en órganos laterales. Más recientemente, Lee et al., (2015) establecieron que los genes *NGA* actúan como reguladores negativos de la proliferación de las células de los órganos laterales basándose entre otras evidencias experimentales: en que el número de células de los órganos laterales se reducían significativamente en las líneas de sobreexpresión de los genes *NGA* y, a la inversa, aumentaban significativamente en el cuádruple mutante *nga*,

## INTRODUCCIÓN

y en los cambios observados en la expresión de los genes involucrados en la regulación del ciclo celular en los diferentes fondos *NGA* (Lee et al. 2015). Luego, además de su papel en el desarrollo del gineceo, estas evidencias demuestran que los genes *NGA* son importantes reguladores del crecimiento de los órganos laterales.



**Figura I.10: Comparación de la morfología de la hoja.** Fenotipo observado en las hojas de roseta de (A) Col-0, (B) *nga1 nga2 nga3 nga4* y (C) *35S:NGA3*. (la barra blanca equivale a 1 cm) (Tomadas de Trigueros et al., 2009).

La función de los genes *NGA* en la regulación del crecimiento de los órganos laterales está compartida con los genes *NGATHA-LIKE*, ya que también se ha demostrado que éstos juegan un papel en los diferentes mecanismos de desarrollo de los órganos laterales. De hecho, Shao et al. (2012) observaron que las líneas de sobreexpresión de *NGAL1/ABS2* se caracterizan por ser plantas de menor tamaño, con hojas de roseta menores y unos peciolos reducidos y flores de menor tamaño en comparación con el silvestre, e incluso en casos más dramáticos se observaban flores que carecían de algunos órganos florales como los sépalos o los pétalos. Por otro lado, Zhang et al. (2015) observaron que los dobles mutantes *sod7-2 dpa4-3* presentan cotiledones, semillas y pétalos de mayor tamaño, demostrando que *DPA4* y *SOD7* intervienen también en el control del tamaño de los diferentes órganos y las semillas (Engelhorn et al. 2012; Zhang et al. 2015). Cabe destacar que las similares funciones en la regulación general del crecimiento y la proliferación celular que parecen compartir los genes *NGA* y *NGAL* sugieren que ésta sea su función ancestral, mientras que el papel en el desarrollo del estilo y estigma sea específico de la subfamilia *NGA*.

## **OBJETIVOS**



Como hemos dicho en la introducción, el gineceo es el órgano reproductor femenino y de él depende en mayor medida la competencia reproductiva de la especie, ya que, entre otras ventajas, encierra y protege los óvulos, que posteriormente a la fecundación darán lugar a las semillas que serán dispersadas. De todos los tejidos presentes en el gineceo, los tejidos apicales juegan un papel crucial en la recepción y germinación del polen y en la dirección de los tubos polínicos hacia los óvulos para que estos sean fecundados.

Es por ello primordial entender como se diferencian estos tejidos apicales. Dado que los genes *NGA* participan en el desarrollo del estilo y el estigma, y también interactúan con factores importantes en el desarrollo de dichas regiones nos planteamos el siguiente objetivo principal:

- Caracterizar el papel y la posición de los genes *NGATHA* en las rutas genéticas que dirigen la morfogénesis del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.

El abordaje de este objetivo principal se ha realizado por medio de los siguientes objetivos específicos:

- Identificar reguladores de los genes *NGA*.
- Entender la relación funcional de los factores *NGA* y otros factores bHLH implicados en el desarrollo de la parte apical del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.



## **RESULTADOS**

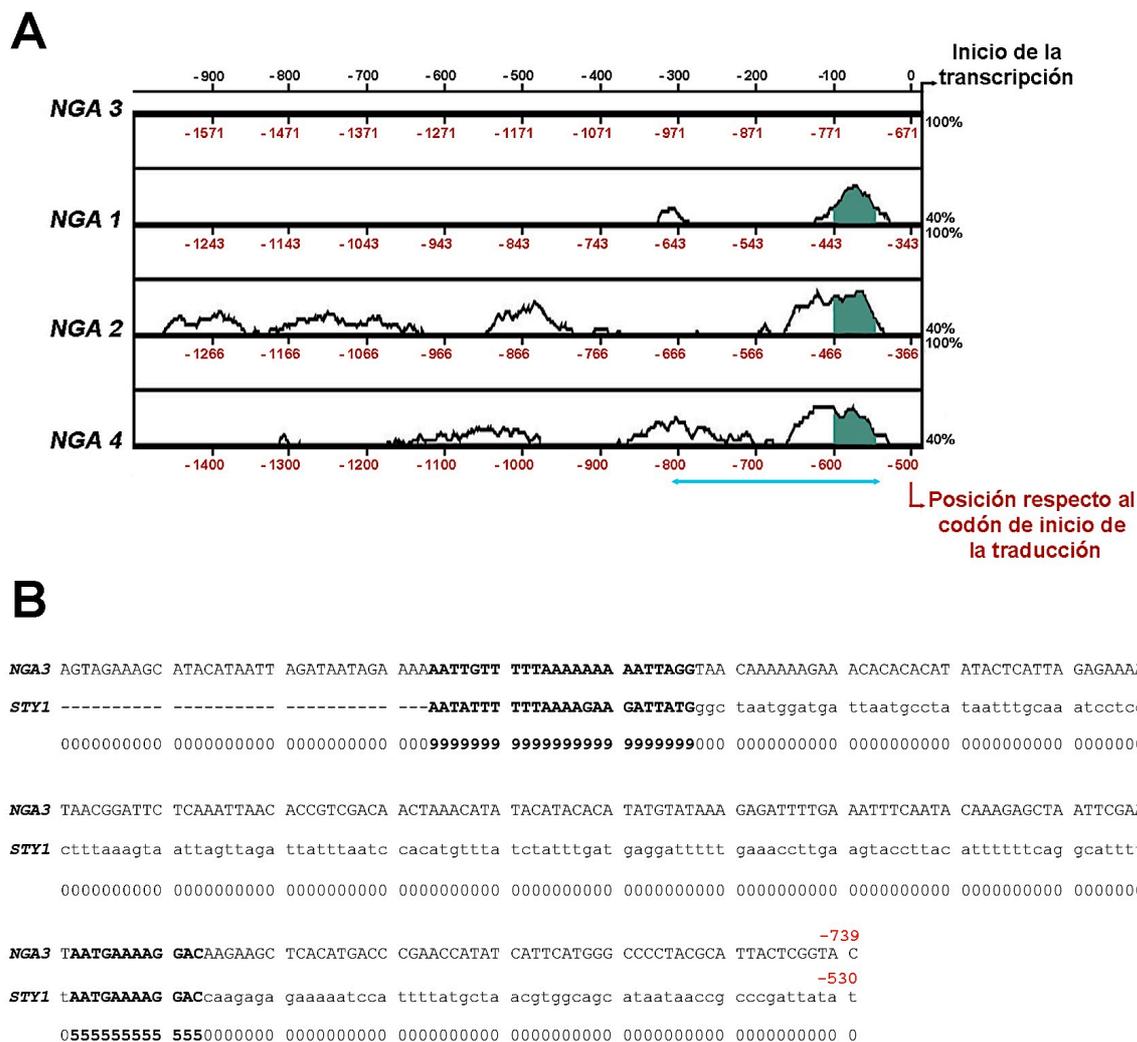


## **CAPÍTULO 1: IDENTIFICACIÓN DE REGULADORES DE LOS GENES NGATHA.**

### **1.- Identificación de motivos comunes potencialmente relevantes en los promotores de los genes NGATHA.**

La familia de los genes *NGATHA* está formada por cuatro miembros en *Arabidopsis thaliana*, que son funcionalmente redundantes y se expresan en dominios muy similares, lo que sugiere que pueden tener reguladores transcripcionales comunes (Alvarez et al. 2009; Trigueros et al. 2009). Con el propósito de identificar regiones funcionalmente importantes en sus promotores como punto de partida para la identificación de dichos reguladores se realizó un análisis *in silico* con la herramienta bioinformática VISTA (Frazer et al. 2004) donde se compararon 1000 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de las secuencias de los cuatro genes *NGA*.

En este análisis se observó que existía una región de aprox. 270 pb altamente conservada en los promotores de los cuatro genes *NGA*. Esta región de 270 pb fue identificada alrededor de las posiciones -300 a -30 aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, y su similitud es mayor entre las parejas *NGA1/NGA2* y *NGA3/NGA4*. Esta región contiene además un fragmento de aproximadamente 55 pb en posición proximal que muestra un nivel de conservación más alto (Fig. C1.1.A) y presenta similitud también con una región del promotor de *STYLISH1 (STY1)*, un gen de la familia de factores de transcripción *SHORT INTERNODES/STYLISH (SHI/STY)* de tipo RING-like zinc-finger (Fig. C1.1.B) (Kuusk et al. 2002). Los genes *NGA* y *STY1* comparten un papel común en la especificación de los tejidos apicales en el gineceo de *Arabidopsis*, y su patrón de expresión es muy similar (Trigueros et al. 2009), lo que sugiere que estos genes, *NGA* y *STY1*, podrían también compartir reguladores comunes.



**Figura C1.1: Análisis de los promotores de los genes *NGATHA*.** (A) Comparación de los promotores de los genes *NGATHA* mediante el programa VISTA. El análisis compara la secuencia de *NGA3* con las secuencias de los otros miembros de la familia *NGA* de *Arabidopsis*. En el eje de ordenadas aparece el grado de homología con la secuencia de *NGA3* (expresado en %), en el eje de abscisas la posición en pb respecto al inicio de la traducción (en rojo) y en la parte superior la posición en pb respecto al inicio de la transcripción (en negro). La línea azul indica los 270 pb conservados y en sombreado verde los 55 pb con más similitud. (B) Representación de la secuencia de la región conservada de 270 pb del promotor de *NGA3* (en mayúsculas) alineada con secuencias presentes en el promotor de *STY1* (en minúsculas) mediante el programa CHAOS/DIALIGN (Brudno et al. 2004). Las regiones más similares se representan en mayúsculas y negrita, y los números indican, en una escala de 0 a 9 como de significativa es la similitud encontrada. En rojo se indica la posición respecto al codón de inicio de la traducción.

## 2.- Identificación de reguladores de los genes *NGA* mediante escrutinio por híbrido simple en levadura.

### 2.1.- Escrutinio por híbrido simple en levadura de una genoteca de cDNA de planta completa de *Arabidopsis*.

Para identificar reguladores de los genes *NGA*, en un trabajo previo del laboratorio, se realizó un escrutinio por híbrido simple en levadura de una genoteca de cDNAs aislados

de plantas completas de Arabidopsis. Para este trabajo, Vicent Llopis Torregrosa (Llopis-Torregrosa 2009) clonó la región de 270 pb conservada en los promotores *NGA* correspondiente al promotor de *NGA3* fusionada al gen reportero *HIS3* en el vector pHIS2.1, para integrarla en el genoma de la cepa de levadura Y187. Posteriormente, la cepa Y187 que contenía esta construcción se conjugó con la cepa AH109 portadora de la genoteca de cDNA de Arabidopsis en el vector pGADT7-rec, facilitada por la Dra Simona Masiero (Sommer y Masiero, datos no publicados; (Costa et al. 2013). A partir de aquellas colonias que fueron capaces de crecer en medio selectivo se aisló el plásmido procedente de la genoteca y se secuenció el fragmento incluido en el mismo, obteniendo como resultado secuencias correspondientes a 37 genes diferentes (Tabla C1.1).

**Tabla C1.1:** Resultado del escrutinio de híbrido simple de levadura utilizando como cebo la región de 270 pb conservada del promotor de *NGA3* frente a una genoteca de cDNAs de planta completa de Arabidopsis.

Gen		Función
<b>At2g05810</b>		Proteína que pertenece a la familia de las ARM/beta-cateninas y cuya función es desconocida.
<b>At3g26720</b>		Proteína de la familia de las glycosyl-hydrolasas implicada en los procesos metabólicos de la manosa y el metabolismo de carbohidratos.
<b>At1g57765</b>		Función desconocida.
<b>At4g17390</b>		Pertenece a la familia de las proteínas ribosomales L23/L15e, componentes estructurales de los ribosomas que participan en la traducción.
<b>At1g20980</b>	<b>SPL14</b>	ATSP14 codifica una proteína nuclear específica de plantas, con rasgos característicos de un regulador transcripcional.
<b>At2g21500</b>		Proteína que pertenece a la superfamilia proteica RING/U-box con funciones en la unión de iones zinc.
<b>At1g17420</b>	<b>LOX3</b>	ATLOX3 codifica una lipoxigenasa que cataliza la oxigenación de los ácidos grasos.
<b>At1g63080</b>		Proteína involucrada en el procesamiento de ta-siRNAs.
<b>At1g30230</b>	<b>EF1BB</b>	EF1BB codifica un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que juega un papel importante en la elongación de la traducción.
<b>At2g01320</b>	<b>ABCG7</b>	Proteína de la familia de transportadores ABC tipo 2 con funciones en la actividad ATPasa acoplada al movimiento transmembrana de sustancias.
<b>At4g01897</b>		Función desconocida.
<b>At2g24590</b>	<b>RSZ22A</b>	AtRSZ22A es un factor de <i>splicing</i> rico en repeticiones de serina/arginina.
<b>At2g43210</b>		Pertenece a la superfamilia de proteínas similares a la UBIQUITINA.
<b>At3g03420</b>		Pertenece a la familia de proteínas de unión Ku70/Ku80 cuya función es la reparación del DNA dañado.
<b>At2g22670</b>	<b>IAA8</b>	Codifica un co-represor transcripcional de la respuesta a auxinas que carece de dominio de unión de DNA. Es inducible por auxinas y está implicado en la formación de las raíces laterales.
<b>At5g38430</b>	<b>RBCS1B</b>	Codifica un miembro de la familia multigénica de la subunidad pequeña Rubisco
<b>At3g21865</b>	<b>PEX22</b>	Interactúa con PEX4 y ambos son importantes durante la remodelación de los contenidos de la matriz de los peroxisomas.

## CAPÍTULO 1

<b>At2g46260</b>	<b>LRB1</b>	Proteína de tipo BTB que forma parte del complejo BTB/CULLIN-3 que participa en la ubiquitinación de otras proteínas mediante la interacción física con ellas.
<b>At1g03530</b>	<b>NAF1</b>	ATNAF1 esta implicado en la unión de snoRNAs que están implicados en las modificaciones químicas de otros RNAs.
<b>At4g38770</b>	<b>PRP4</b>	ATPRP4 codifica una de las cuatro proteínas ricas en prolina en Arabidopsis y que se localizan en la pared celular.
<b>At1g06890</b>	<b>UXT3</b>	UXT3 es un miembro de la subfamilia NST-KT de transportadores UDP/Xyl.
<b>At1g06700</b>		Pertenece a la superfamilia de quinasas ricas en Serina/Threonina.
<b>At1g08830</b>	<b>SOD1</b>	ATSOD1 codifica una superóxido dismutasa citosólica que puede desintoxicar los radicales superóxido.
<b>At3g20150</b>		Pertenece a la familia de las quinesinas implicadas en la actividad de los microtúbulos.
<b>At2g41840</b>		Pertenece a la familia de la proteínas ribosomales S5 y es un componente estructural de los ribosomas.
<b>At1g52740</b>	<b>HTA9</b>	ATHTA9, codifica las histonas H2A. La pérdida de H2A.Z (triple mutante con <i>hta8 hta9 hta11</i> ) da como resultado una reducción en la metilación del ADN.
<b>At4g32620</b>		Proteína que interacciona con SNL1 (SIN3-LIKE1) que esta envuelto en la regulación de la expresión génica y la estabilidad del genoma.
<b>At5g35416</b>		Función desconocida.
<b>At3g56050</b>		Pertenece a la superfamilia de quinasas.
<b>At5g03140</b>	<b>LECRK-VIII.2</b>	Lectina que pertenece a la superfamilia de quinasas Concanavalina-A (Con-A). Con funciones en la unión de carbohidratos.
<b>At4g26970</b>	<b>ACO2</b>	Codifica una aconitasa que puede catalizar la conversión de citrato a isocitrato a través de un intermediario <i>cis</i> -aconitato, lo que indica que puede participar en el ciclo TCA y otras rutas metabólicas primarias.
<b>At5g48470</b>	<b>PRDA1</b>	Función desconocida
<b>At3g50570</b>		Proteína de la familia de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina.
<b>At1g16920</b>	<b>RABA1B</b>	ATRABA-1B es una proteína de unión de GTP implicada en el tráfico intracelular de proteínas.
<b>At1g14320</b>	<b>SAC52</b>	Codifica una proteína ribosomal L10 y puede estar implicado en la regulación de la traducción.
<b>At3g52930</b>	<b>FBA8</b>	Proteína de la superfamilia de las aldolasas implicada en la unión del ión zinc en respuesta a estrés.
<b>At3g03960</b>		Proteína de la familia de las chaperoninas TCP-1/cpn60 implicada en la unión de las proteínas mal plegadas y la unión de ATP.

Entre éstos, solo se encontraba un cDNA que codificara un dominio de unión a DNA, el del factor de transcripción *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 14* (*AtSPL14*) y que por tanto resultó ser el único candidato potencialmente interesante. Además, en un trabajo previo se había descrito un mutante recesivo en *Arabidopsis thaliana*, *fumonisin B1-resistant* (*fbr6*), en el que la inserción de un T-DNA en el gen *AtSPL14* causaba alteraciones en el desarrollo que recordaban a algunos defectos presentes en los mutantes *ngatha* (Stone et al. 2005). En los mutantes *spl14-1/fbr6* las hojas de roseta son más grandes, aserradas y tienen unos peciolos más alargados (Stone et al. 2005). Además, en este mismo estudio, se describe que el gen *AtSPL14* se expresa en la

vasculatura de los cotiledones, de los peciolos y de las hojas, en los hidátodos y la base de los tricomas, así como en el estigma y la base de las inflorescencias y de los frutos, un patrón de expresión que solapa extensamente con el de los genes *NGA* (Stone et al. 2005). Por todo ello, SPL14 parecía un buen candidato para ser regulador de los genes *NGA*, por lo que se decidió investigar esta posible relación durante esta tesis doctoral.

## 2.2.- Escrutinio por híbrido simple de levadura de una genoteca de factores de transcripción de *Arabidopsis*.

Puesto que en el escrutinio anterior solo se había identificado un posible regulador de los genes *NGA*, decidimos ampliar este estudio realizando un nuevo escrutinio de híbrido simple de levadura pero utilizando los 55 pb más conservados en los promotores de los cuatro genes *NGA* como cebo frente a una genoteca de factores de transcripción disponible en el laboratorio del Dr. Luis Oñate Sánchez, en el CBGP de Madrid. Esta genoteca, denominada RR, consta de 1200 cepas, cada una de las cuales contiene un clon distinto correspondiente a cada uno de los factores de transcripción de *Arabidopsis* representados en las colecciones REGIA y REGULATORS (Castrillo et al. 2011). Dichas cepas se encuentran organizadas en 15 placas multipocillo (96 clones/placa), lo cual facilita enormemente el rastreo y la identificación de los clones.

Para realizar este ensayo, la región conservada de 55 pb del promotor de *NGA3* se fusionó al gen *HIS3* en el vector pTUY1H (cebo) y se integró en el genoma de la cepa de levadura Y187. Por otro lado, la genoteca RR estaba clonada en el plásmido pDEST22 (presa), dentro de la cepa de levadura YM4271.

Previamente a la realización del escrutinio, con el fin de investigar la posible actividad basal de la construcción cebo, se llevó a cabo un ensayo de activación del gen *HIS3* conjugando la cepa portadora de la construcción cebo con una levadura portadora de una construcción que dirigiera la expresión de una proteína cuya interacción con el cebo fuera muy improbable. En este caso se utilizó una cepa YM4271 que contenía una construcción con el gen de la proteína GFP en el vector pDEST22. El objetivo de este experimento es determinar la concentración mínima de 3AT necesaria para impedir que el crecimiento de colonias resultantes de la conjugación portadoras de ambas construcciones sea de un tamaño superior a 1 mm. Para la construcción cebo con el fragmento de 55 pb del promotor de *NGA3* se estableció que no era necesario la utilización de 3AT puesto que no había crecimiento de colonias en medio sin histidina.

Para el escrutinio, se procedió a la conjugación entre la cepa con el cebo y las cepas que contenían los clones individuales de la genoteca. La selección de las interacciones

## CAPÍTULO 1

positivas se llevó a cabo en medio selectivo sin histidina (SD/-L/-W/-H), obteniendo como resultado 7 clones positivos (Tabla C1.2). Puesto que la genoteca estaba organizada en placas, era posible identificar directamente los factores transcripcionales expresados en aquellas colonias que fueron capaces de crecer en medio sin histidina, aunque para confirmar su identidad se aisló el plásmido correspondiente de cada colonia positiva y se secuenció el fragmento incluido en el mismo.

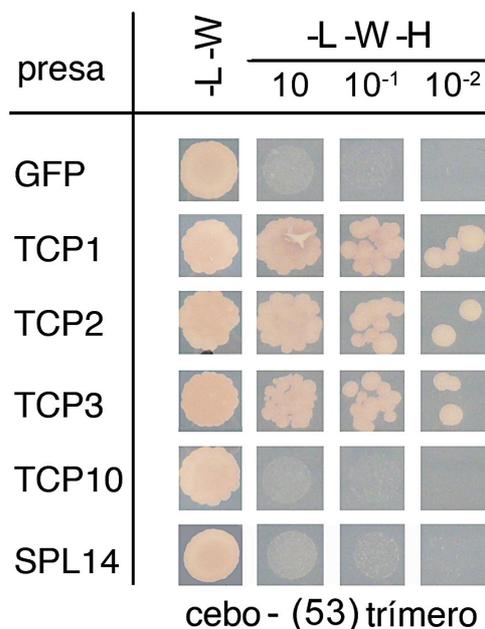
**Tabla C1.2:** Resultado del escrutinio de híbrido simple de levadura utilizando como cebo la región de 55 pb más conservada del promotor de *NGA3* frente a la genoteca de factores de transcripción RR.

Gen	Nombre	Familia	Función
<b>At1g53230</b>	TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA AND PCF TRANSCRIPTION FACTOR 3	<b>TCP3</b>	Intervienen mayoritariamente en la regulación de la diferenciación de los órganos laterales.
<b>At4g18390</b>	TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA AND PCF TRANSCRIPTION FACTOR 2	<b>TCP2</b>	
<b>At1g67260</b>	TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA AND PCF TRANSCRIPTION FACTOR 3	<b>TCP1</b>	Interviene en la elongación de las hojas y los tallos, y en la regulación de la simetría de los órganos florales.
<b>At5g65210</b>	TGACG SEQUENCE-SPECIFIC BINDING PROTEIN 1	<b>TGA1</b>	Interviene en el proceso de resistencia sistémica adquirida.
<b>At3G18100</b>	MYB DOMAIN PROTEIN 4R1	<b>MYB4R1</b>	Interviene en la diferenciación celular y el crecimiento del tubo polínico.
<b>At1g70510</b>	KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA 2	<b>KNAT2</b>	Interviene en el desarrollo del carpelo y el mantenimiento de los meristemas.
<b>At2g22200</b>	ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR ERF056	<b>ERF056</b>	Interviene en la ruta de señalización del etileno.

Una vez aislados los clones positivos, confirmada su capacidad de crecimiento en medio selectivo y corroboradas sus secuencias, éstos fueron sometidos a dos ensayos de interacción independientes en el sistema de levadura original. Para confirmar las interacciones observadas, en primer lugar, los plásmidos aislados de los clones positivos identificados en el rastreo con la región conservada del promotor de *NGA3* se transformaron en una cepa de levadura YM427 (la misma que contenía la genoteca) pero en este caso no portadora de plásmidos presa, y se llevó a cabo la conjugación de los transformantes resultantes con la levadura Y187 portadora de la construcción cebo utilizada en el escrutinio o de una segunda construcción donde los 55 pb más conservados se clonaron como un trímero frente al gen reportero con la intención de minimizar los falsos negativos y reforzar las interacciones positivas. En estos ensayos, tras observar el crecimiento de los diploides en medio selectivo sin histidina (SD/-L/-W/-H) solo tres positivos fueron confirmados, todos miembros de la clase-II de la familia de los genes *TCP*: *TCP2* y *TCP3*, que pertenecen al clado *CIN*-like y que están regulados por

el miR319; y *TCP1*, un miembro del clado CYC/TB1 y que no está regulado por miRNA (Martín-Trillo and Cubas 2010).

Por otro lado, dado que *TCP2* y *TCP3* pertenecen al mismo clado de la familia de los *TCPs* y están regulados por el miR319, decidimos incluir otro miembro de la familia muy similar en secuencia y también presente en la genoteca, *TCP10*, pero que no había crecido en medio selectivo sin histidina, con el fin de determinar si la unión de *TCP2* y *TCP3* era específica dentro del clado o podía deberse a que se hubiera producido algún falso negativo. En este mismo ensayo se analizó también la capacidad de unión de *SPL14* (resultado positivo del primer escrutinio de híbrido simple) a la región de 55 pb del promotor de *NGA3*, dado que *SPL14* no se encontraba incluido en la genoteca de factores de transcripción RR. Para ello, fue necesario clonar la secuencia codificante de *SPL14* en el vector pDEST22 y transformarla en la cepa YM4271, para a continuación realizar su conjugación tanto con la levadura Y187 portadora de la construcción con la región de 55pb, como con la portadora de la construcción con el trímero de esta región. Nuevamente en este ensayo solo las colonias que expresaban *TCP1*, *TCP2* y *TCP3* fueron capaces de crecer en medio selectivo, pero no las que expresaban *SPL14* o *TCP10* (Fig. C1.2), indicando que estos factores no son capaces de unirse a esta región conservada de 55 pb, al menos en este tipo de ensayos.



**Figura C1.2: Resultados de la comprobación de las interacciones proteína-DNA de algunos factores identificados en el rastreo de híbrido simple de la genoteca de Factores de Transcripción RR y de *SPL14*, el clon positivo identificado en el rastreo de híbrido simple de la genoteca de cDNAs de *Arabidopsis*** (solo se muestran los resultados correspondientes a la conjugación con la cepa portadora de la construcción del trímero). Las células diploides se hicieron crecer en un medio mínimo no selectivo sin Leucina y Triptófano (-L-W) o medio mínimo selectivo sin Leucina, Triptofano e Histidina (-L-W-H). Se analizaron tres diluciones seriadas de las células diploides (10, 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>).

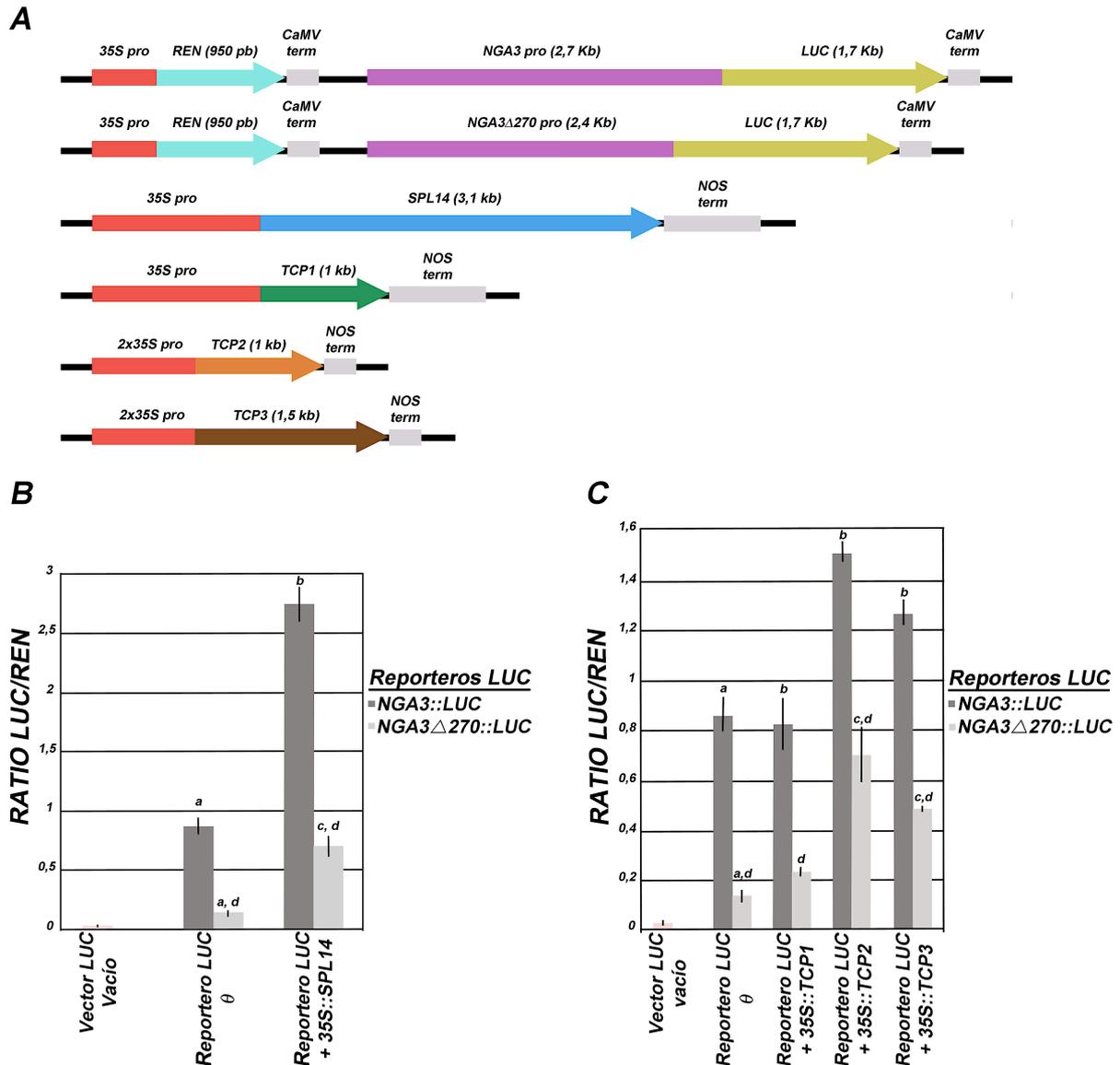
### 2.3.- Análisis de la interacción de los factores identificados con el promotor de *NGA3* mediante ensayos de activación transitoria.

Con el fin de confirmar la posible regulación de los genes *NGA* por parte de los factores de transcripción identificados en los ensayos de híbrido simple se llevaron a cabo ensayos *in vivo* de activación transitoria del promotor de *NGA3* mediante el sistema LUC/REN descrito por Hellens et al. (2005). Este sistema permite monitorizar la respuesta de un promotor dado a un factor de transcripción mediante la expresión transitoria de éste junto con una construcción reportera en la que el gen de la *LUCIFERASA (LUC)* está fusionado al promotor bajo estudio. La construcción también contiene el gen de la *RENILLA (REN)*, que codifica otro tipo de luciferasa, bajo un promotor constitutivo y que se utiliza para normalizar los datos de expresión.

Para generar la construcción reportera se clonaron 2700 pb aguas arriba del codón de inicio de la traducción del gen *NGA3* dirigiendo la expresión de la *LUCIFERASA (LUC)* en el vector pGREENII 0800-LUC (*NGA3::LUC*) (Fig. C1.3.A).

En un primer ensayo, se comprobó si la proteína SPL14 era capaz de afectar la actividad del promotor de *NGA3*. Para ello, se coinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con la construcción *NGA3::LUC* y con una construcción que dirigía la sobreexpresión de *SPL14 (35S::SPL14)*. En este ensayo se observó que el promotor de *NGA3* tenía una cierta actividad basal posiblemente debida a la presencia de factores capaces de activar a *NGA3* en la hoja de *Nicotiana*. Al coexpresar el reportero con *SPL14* se observó una activación significativa de la expresión del gen *LUC*. Por tanto, SPL14 parecía ser capaz de unirse al promotor de *NGA3* y de activarlo (Fig. C1.3.B).

Por otro lado, para determinar si la acción de SPL14 sobre el promotor de *NGA3* estaba mediada por su unión a la región de 270 pb que utilizamos en el escrutinio de híbrido simple en levadura, se generó una construcción similar pero en la que se deleccionaron estos 270 pb (*NGA3Δ270::LUC*), realizándose el mismo ensayo con este nuevo reportero. Los resultados mostraban que el promotor *NGA3Δ270* también confiere algo de actividad basal, pero en mucho menor medida que el promotor completo, sugiriendo la importancia de esta región en la regulación de *NGA3* (Fig. C1.3.B). Se observó también que la activación de *NGA3Δ270::LUC* en respuesta a SPL14 se reducía significativamente respecto a la del promotor completo, pero era también significativamente mayor que el nivel basal de activación de *NGA3Δ270::LUC* (Fig. C1.3.B). Estos resultados indican que SPL14 puede unirse directamente a este fragmento de 270 pb para activar a *NGA3 in vivo* y además sugieren que pueden existir otros elementos de respuesta a SPL14 en el promotor de *NGA3* que serían responsables de la activación observada en el promotor donde la región de 270 pb ha sido deleccionada.



**Figura C1.3: (A) Esquemas de las construcciones utilizadas en los ensayos de activación de la LUCIFERASA.** En las construcciones reporteras *NGA3::LUC* y *NGA3Δ270::LUC* se fusionó el promotor de *NGA3* y el promotor de *NGA3* sin la región de 270pb (en violeta) al gen de la *LUCIFERASA* (en amarillo), estas construcciones llevan como control interno el gen de la *RENILLA* (en azul cielo) flaqueado por el promotor 35S (en rojo) y el terminador CaMV (en gris). En las construcciones efectoras las CDS de los genes *SPL14*, *TCP1*, *TCP2* y *TCP3* (en azul, verde, naranja y marrón respectivamente) se clonaron bajo el control del promotor 35S (en rojo), y el terminador del gen *NOS* (en gris). **(B) y (C) Activación transitoria de los promotores de *NGA3* y *NGA3Δ270* por las proteínas *SPL14*, *TCP1*, *TCP2* y *TCP3*.** Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana bentamiana* con las combinaciones de plásmidos indicadas en las gráficas. Transcurridos tres días, se cuantificó en un luminómetro la señal emitida por la proteína LUC y por la RENILLA (control interno) y se representó el ratio LUC/REN. Como controles negativos se utilizaron hojas infiltradas con el vector vacío o sólo con la construcción reportera. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. Las letras encima de barras indican una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t de Student <0,05 a partir de (a) los valores obtenidos cuando infiltramos los reporteros solos respecto el vector LUC vacío; (b) los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3::LUC* + el efector correspondiente respecto al *NGA3::LUC* solo; (c) los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3Δ270::LUC* + el efector correspondiente respecto al *NGA3Δ270::LUC* solo; (d) los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3::LUC* + el efector correspondiente respecto los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3Δ270::LUC* + el efector correspondiente.

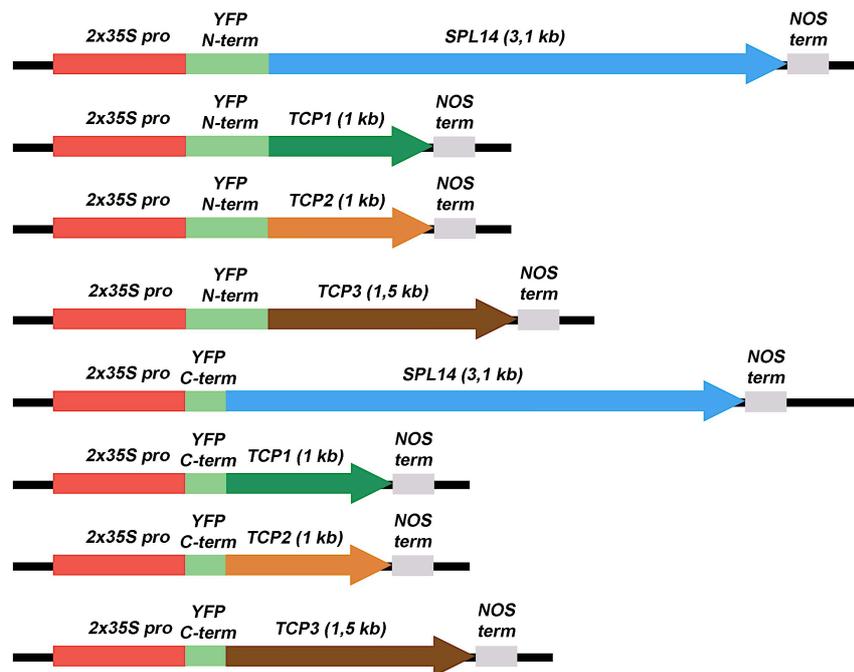
## CAPÍTULO 1

Se realizó un segundo estudio para caracterizar el efecto de TCP1, TCP2 y TCP3 sobre la actividad del promotor de *NGA3*. En este caso, se coinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con el vector *NGA3::LUC* y con las construcciones de sobreexpresión de *TCP1*, *TCP2* y *TCP3*. Como resultado de estos experimentos, se determinó que TCP1 no era capaz de activar al reportero, ya que no se apreciaron diferencias significativas con respecto a la actividad basal de *NGA3::LUC*. Sin embargo, las proteínas TCP2 y TCP3 sí que fueron capaces de activar de forma significativa la expresión del reportero *LUC* (Fig. C1.3.C). Cuando se utilizó como reportero la construcción *NGA3Δ270::LUC* se observó que la activación de *NGA3Δ270::LUC* en respuesta a TCP2 y TCP3 se reducía significativamente frente a la del promotor completo (Fig. C1.3.C), indicando que TCP2 y TCP3 pueden unirse directamente a este fragmento de 270 pb para activar a *NGA3 in vivo*. Del mismo modo que en el caso de SPL14, también se observó que la activación de *NGA3Δ270::LUC* en respuesta a TCP2 y TCP3 era mayor que el nivel basal que presentaba el reportero *NGA3Δ270::LUC* (Fig. C1.3.C), sugiriendo de nuevo que muy probablemente pueden existir otros elementos de regulación mediada por TCP2/TCP3 en el promotor de *NGA3*.

### 2.4.- Estudio de la posible interacción física entre SPL14 y TCPs.

Puesto que tanto SPL14 como los tres factores TCP identificados eran capaces de unirse a una misma región del promotor de *NGA3*, podía pensarse que lo hicieran formando un complejo proteico. Con el propósito de comprobar si SPL14 podía interaccionar con TCP1, TCP2 y TCP3 formando dímeros en planta se empleó un ensayo de complementación fluorescente bimolecular (BiFC) realizado en hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas transitoriamente. Este experimento está basado en la reconstitución de moléculas fluorescentes mediada por la interacción de dos proteínas que llevan fusionada una mitad de la proteína YFP. Si las dos proteínas interaccionan físicamente, la proximidad de los dos fragmentos de la YFP restaurará la fluorescencia de la molécula, que puede detectarse mediante microscopía confocal.

Para el ensayo se clonaron las regiones codificantes completas de los genes *SPL14*, *TCP1*, *TCP2* y *TCP3* fusionadas a continuación de la secuencia codificante de cada mitad de la proteína YFP (Belda-Palazon et al. 2012). (Fig. C1.4).

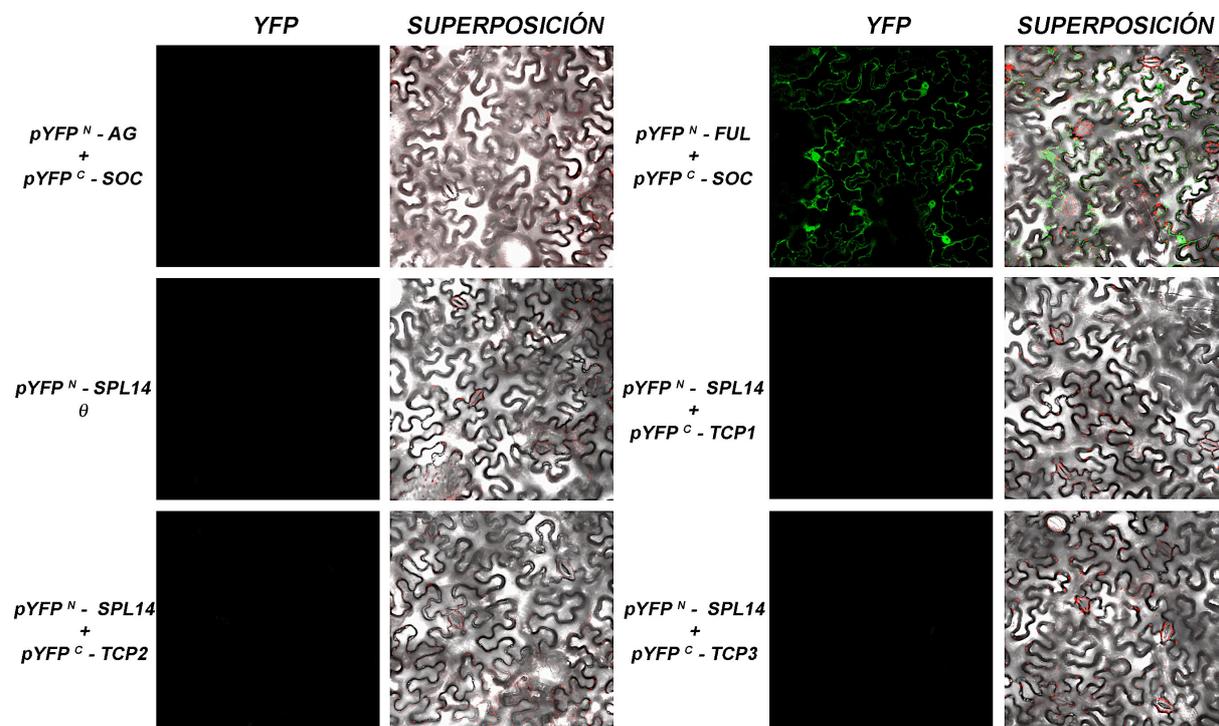


**Figura C1.4: Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar la interacción de las proteínas SPL14, TCP1, TCP2 y TCP3 mediante ensayos de BiFC.** En las construcciones se fusionaron las regiones codificantes de SPL14, TCP1, TCP2 y TCP3 a las de los dominios C-terminal y N-terminal de la proteína YFP. Se representa el promotor 35S (en rojo), los dominios C-terminal y N-terminal de la YFP (en verde claro), las CDSs de los genes SPL14, TCP1, TCP2 y TCP3 (en azul, verde oscuro, naranja y marrón respectivamente) y el terminador del gen NOS (en gris).

Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* y tras 3 días fueron observadas al microscopio confocal. Como control positivo se utilizaron fusiones a las mitades de la YFP de dos factores de transcripción de la familia MADS cuya interacción física ha sido demostrada por varios métodos anteriormente, *FRUITFULL (FUL)* y *SUPPRESSOR -OF-OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, mientras que como control negativo, utilizamos *SOC1* junto con *AGAMOUS (AG)*, otro factor de la familia MADS con el que ya se ha comprobado que no interactúa físicamente (Balanza et al. 2014; de Folter et al. 2005; Immink et al. 2002b). También como control se infiltraron los dominios YFP<sup>N</sup> fusionados a los genes de estudio (*SPL14*, *TCP1*, *TCP2* y *TCP3*) por sí solos, dado que este dominio corresponde a un fragmento de mayor tamaño de la YFP y en algunos casos es capaz de emitir autofluorescencia por la conformación que toma al fusionarlo con la proteína de interés, pudiendo así resultar en falsos positivos.

Cuando la infiltración se realizó con las construcciones individuales, en ningún caso se observó fluorescencia, y tampoco cuando se agroinfiltró con la combinación pYFP<sup>N</sup>-AG + pYFP<sup>C</sup>-SOC1. Por el contrario, sí se observó fluorescencia con la combinación pYFP<sup>N</sup>-FUL + pYFP<sup>C</sup>-SOC1. Así pues, los controles positivos y negativos tuvieron el comportamiento

esperado. Cuando se infiltraron las construcciones para ensayar la interacción de SPL14 con los tres factores TCP y se observaron las hojas infiltradas al confocal, no se detectó señal YFP en ninguno de los casos (Figura C1.5), lo cual indicaba que las proteínas no interactuaban, al menos en estas condiciones.



**Figura C1.5: Estudio de la interacción proteína-proteína entre SPL14, TCP1, TCP2 y TCP3.** Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda. Control positivo: pYFP<sup>N</sup>-FUL + pYFP<sup>C</sup>-SOC1; Control negativo: pYFP<sup>N</sup>-AG + pYFP<sup>C</sup>-SOC1 (Se muestran solo los resultados en una dirección, en la otra dirección los resultados eran equivalentes).

### 3.- Análisis de la relación funcional entre los factores SPL y NGA.

El gen *AtSPL14* ha sido implicado en la respuesta a la toxina fúngica Fumonisina B1 que induce la muerte celular programada (PCD) en plantas y animales (Stone et al. 2005). En este trabajo se describe un mutante (*fbr6*) en el que la inserción de un T-DNA en el 3'UTR del gen *SPL14* causa que los mutantes correspondientes sean resistentes a esta toxina. Además, es importante destacar que el fenotipo descrito para estos mutantes (*fbr6*) también afecta otros aspectos del desarrollo, como hojas de roseta más grandes, aserradas y con peciolos alargados, que recuerdan a los observados para los mutantes *nga* (Alvarez et al. 2009; Stone et al. 2005; Trigueros et al. 2009). También los patrones de expresión de los genes *NGA* y *SPL14* en el gineceo de *Arabidopsis thaliana* son solapantes, observándose actividad GUS de las líneas reporteras correspondientes en el estigma y la base de las inflorescencias y de los frutos (Alvarez et al. 2009; Stone et al.

2005; Trigueros et al. 2009). Todo ello, junto con la identificación de *SPL14* como potencial regulador de los genes *NGA* mediante el escrutinio de híbrido simple y las posteriores comprobaciones funcionales de su actividad sobre dicho promotor, indicaba que *SPL14* podía estar activando a los genes *NGA* durante el desarrollo de la planta.

### 3.1.- Estudio del efecto causado por la ganancia y la pérdida de función de *SPL14*.

#### 3.1.1.- Generación de líneas de sobreexpresión de *SPL14*.

Con el objetivo de estudiar la regulación de los genes *NGA* mediada por *SPL14* y determinar su posible papel en el desarrollo del gineceo, decidimos analizar más detalladamente el efecto que producía tanto la ganancia como la pérdida de función de *SPL14* en el desarrollo de la planta, para así compararlo con el observado en mutantes o líneas de sobreexpresión de *NGA*.

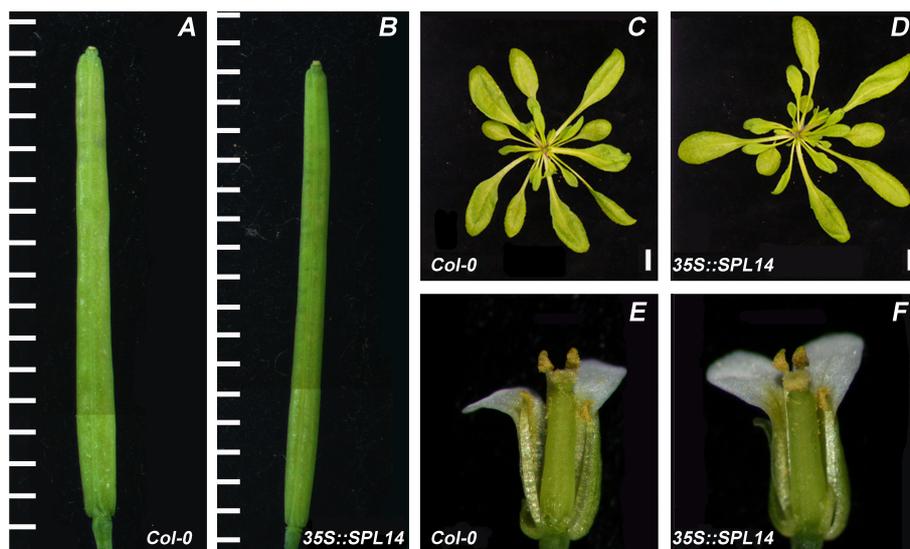
Por ese motivo generamos en primer lugar una línea de sobreexpresión de *SPL14*. Para ello, generamos la construcción 35S::*SPL14* (Fig. C1.6), con la que se transformaron plantas Col-0.



**Figura C1.6: Esquema de la construcción utilizada para generar plantas transgénicas de *Arabidopsis* con la sobreexpresión del gen *SPL14*.** Se representa el promotor 35S (en rojo), la secuencia codificante de *SPL14* (en azul) y el terminador del gen *NOS* (en gris).

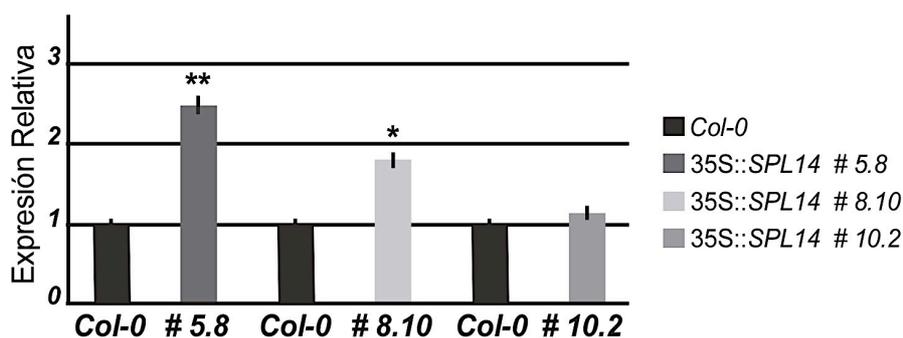
En esta transformación se obtuvieron 21 líneas transgénicas independientes. Tras el análisis de segregación del transgén en las correspondientes plantas T2, seleccionamos tres líneas en las que el transgén se había insertado aparentemente en un único locus, y seleccionamos para cada una de ellas plantas homocigotas para el transgén, obteniendo así las líneas #5.8 #8.10 y #10.2.

Una vez aisladas las líneas homocigotas 35S::*SPL14*, se procedió a analizar su fenotipo, observándose que las plantas de las tres líneas 35S::*SPL14* no mostraban ninguna diferencia morfológica aparente con respecto a las plantas silvestres (Fig. C1.7. A-F).



**Figura C1.7: Fenotipo de las plantas 35S::SPL14.** Fotos a la lupa de frutos completamente elongados en estadio 17-18 (las unidades de la regla son mm) **(A)** Col-0, **(B)** 35S::SPL14. Fotografía a bajo aumento de las rosetas (la barra blanca equivale a 1cm) **(C)** Col-0, **(D)** 35S::SPL14. Fotos a la lupa de flores en anthesis **(E)** Col-0, **(F)** 35S::SPL14.

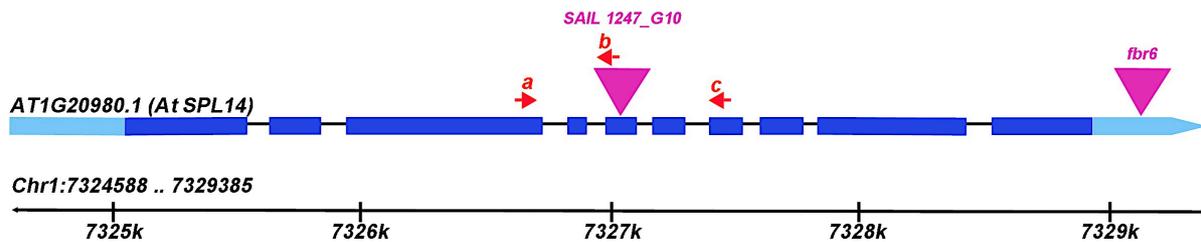
Dado que no observamos diferencias evidentes con respecto al silvestre, decidimos analizar si las líneas seleccionadas realmente sobrexpresaban el gen *SPL14*. Para ello, se compararon mediante RT-qPCR los niveles de expresión de *SPL14* de plantas de las líneas transgénicas seleccionadas con el nivel en Col-0. Este análisis mostró que dos de las tres líneas transgénicas duplicaban los niveles de *SPL14* con respecto a las correspondientes líneas Col-0, lo que indicaba que, en efecto, las líneas #5.8 y #8.10, sobrexpresaban el transgén, aunque no observáramos ningún efecto fenotípico en estas líneas (Fig. C1.8).



**Figura C1.8: Nivel de expresión de *SPL14* en plántulas Col-0, y 3 líneas independientes 35S::SPL14 (#5.8, #8.10 y #10.2).** Los niveles relativos de expresión de *SPL14* se determinaron en plántulas de dos semanas mediante RT-qPCR, utilizando *TIP-41* como gen constitutivo de referencia. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar y se han normalizado frente al valor obtenido en Col-0. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

### 3.1.2.- *Caracterización fenotípica del mutante de pérdida de función *spl14-101*.*

Por otro lado quisimos caracterizar en detalle el fenotipo asociado a la pérdida de función de *SPL14*. No fue posible conseguir el alelo *spl14/fbr6* descrito en Stone et al. (2005), por lo que se buscaron mutantes de inserción para el gen *SPL14* en las colecciones públicas. Para *SPL14* se encontró una línea que pertenecía a la colección SAIL (SAIL 1247\_G10). Según la información proporcionada por la base de datos correspondiente, se trataba de una línea con una inserción de T-DNA en el quinto exón (Fig.C1.9).



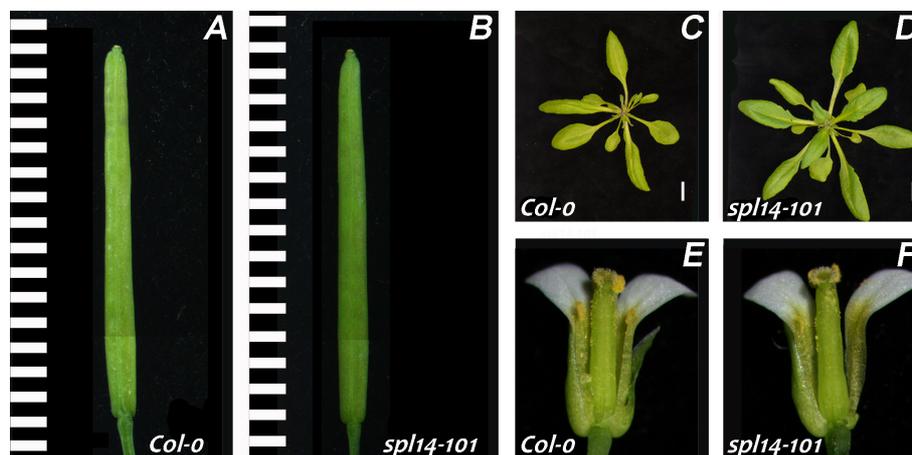
**Figura C1.9: Diagrama de la localización de la inserción de T-DNA en el gen *SPL14* según la información disponible en el TAIR.** La región codificante está representada en azul oscuro y las regiones 5'UTR y 3'UTR en azul claro. En la parte superior se indica la localización predicha de las inserciones *spl14-101* (SAIL 1247\_G10) y *spl14/fbr6* (Stone et al., 2005). En la parte inferior se representa la región donde se localiza el gen *SPL14* en el cromosoma I. Las flechas rojas indican la posición aproximada de los cebadores utilizados para corroborar la posición de la inserción: (a) corresponde al cebador oPBF18, (b) corresponde al cebador LB1 y (c) corresponde al cebador oPBF58.

Para comprobar si la inserción se localizaba exactamente donde indicaba la información disponible en el TAIR e identificar una línea mutante homocigota, se realizó una PCR a partir de DNA genómico con cebadores específicos del gen y del T-DNA. Se utilizaron los cebadores oPBF18 y oPBF58, localizados en la región codificante delante y detrás de la inserción respectivamente, para amplificar el alelo silvestre, y los cebadores oPBF18 y LB1, localizado este último en el T-DNA, para amplificar el alelo mutante. La posterior secuenciación de los productos de PCR permitió comprobar que la inserción se localizaba en la posición que indicaba la información del TAIR (+ 2456). Este alelo se denominó *spl14-101* para diferenciarlo de otros posibles alelos caracterizados. Una vez identificado el mutante homocigoto para dicha inserción se procedió a su caracterización fenotípica.

Cuando se compararon las flores en antesis del mutante *spl14-101* con las de las plantas silvestres Col-0 no se observaron diferencias significativas en tamaño y morfología (Fig. C1.10. E-F). De igual modo, tampoco se observaron diferencias evidentes cuando se compararon los frutos maduros (Fig. C1.10. A-B).

Por otro lado, al comparar las hojas de roseta de los mutantes *spl14-101* y las plantas silvestres Col-0 sí se observaron algunas diferencias. El mutante *spl14-101* presentaba unas hojas de roseta algo más grandes, aserradas y con unos peciolo más alargados que las hojas de la planta silvestre, que son más redondeadas y de bordes más suaves

(Fig. C1.10. C-D). Estos defectos eran parecidos a los descritos en Stone et al. (2005) para el mutante *fbr6*, aunque más débiles, un resultado algo inesperado, puesto que en el alelo *fbr6* la inserción del T-DNA parece estar en la zona 3'UTR del gen y era de esperar que se tratara de un alelo hipomorfo, mientras que podía predecirse que el alelo *spl14-101* caracterizado en este trabajo fuera prácticamente un alelo nulo.

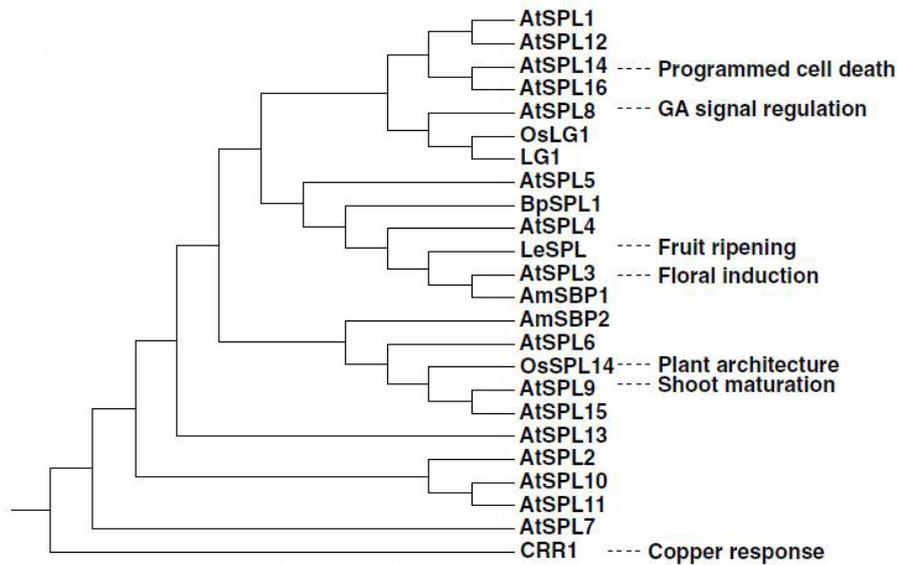


**Figura C1.10: Fenotipo de las plantas *spl14-101*.** (A-B) Fotos a la lupa de frutos completamente elongados en estadio 17-18 (las unidades de la regla son mm) (A) Col-0, (B) *spl14-101*. (C-D) Fotografía a bajo aumento de las rosetas (C) Col-0, que presentan hojas de roseta redondeadas y con los bordes lisos, y (D) *spl14-101*, que presentan unas hojas de roseta grandes, aserradas y con unos peciolo alargados (las barras blancas equivalen a 1cm) (E-F) Fotos a la lupa de flores en anthesis en estadio (E) Col-0, (F) *spl14-101*.

Así, la caracterización del mutante *spl14-101* reveló que dicha mutación no causaba defectos fenotípicos muy relevantes y, en particular, no afectaba significativamente al desarrollo del gineceo, que es el órgano más afectado por las mutaciones *nga*. Puesto que *SPL14* pertenece a una familia génica y tiene parálogos muy cercanos, este hecho podía ser debido a que el papel de *SPL14* estuviera enmascarado por su posible redundancia funcional con otros miembros de la familia *SPL*.

### 3.2.- Estudio de la posible redundancia funcional de *SPL14* con sus parálogos cercanos.

Si observamos el árbol filogenético de los genes *SPL* publicado por Chen et al. en 2010 (Fig. C1.11) vemos que *SPL14* pertenece a un clado formado por 5 genes en *Arabidopsis* (Chen et al. 2010). Uno de ellos, *AtSPL8*, es basal al clado y está relacionado con dos genes de monocotiledóneas, *LIGULELESS1* de maíz (*LG1*) (Moreno et al. 1997; Becraft et al. 1990) y *OsLG1* de arroz (Lee et al. 2007), mientras que los otros cuatro forman 2 parejas más estrechamente relacionadas, *AtSPL1/AtSPL12* y *AtSPL14/AtSPL16*.



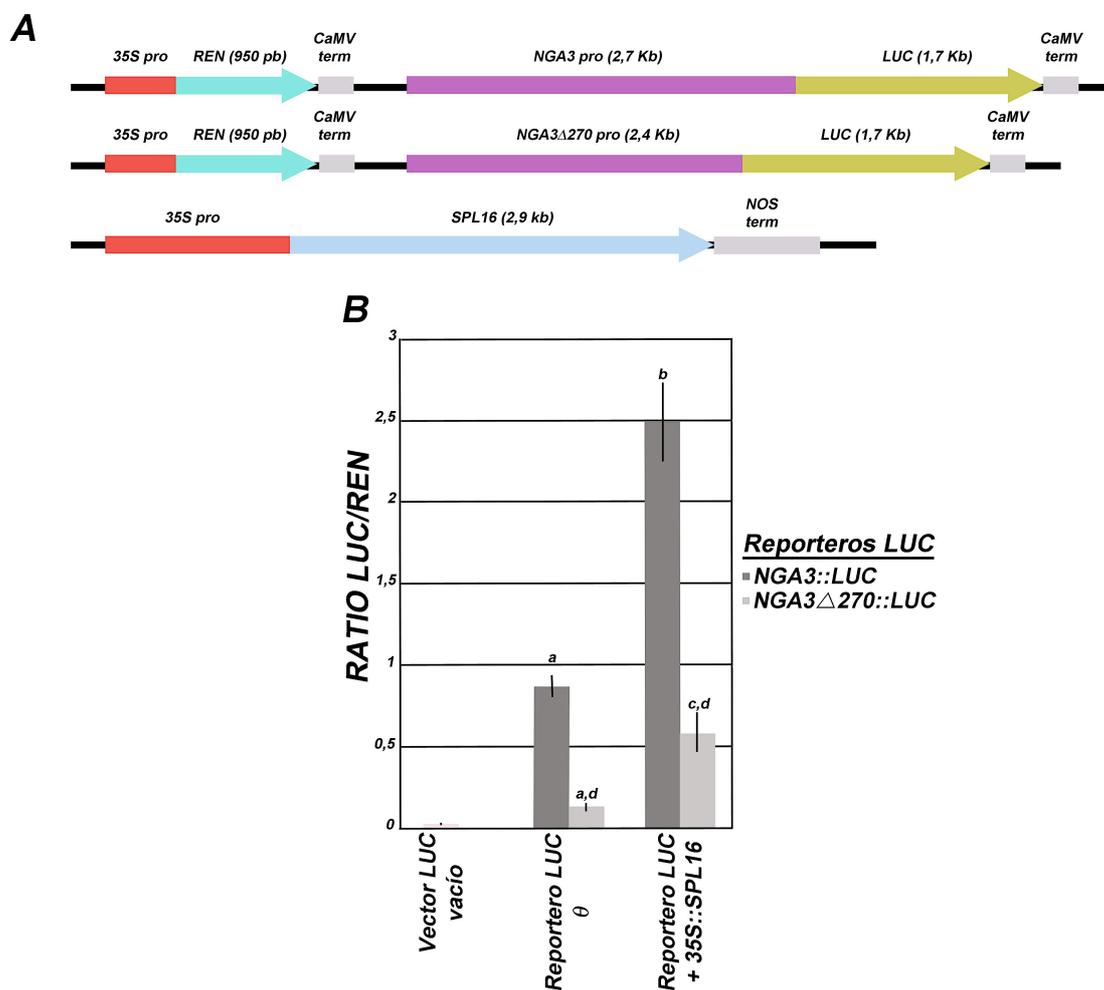
**Figura C1.11: Relación filogenética de los genes SPLs de Arabidopsis, arroz, maíz, tomate, *Betula pendula* y *Antirrhinum majus*.** Arbol filogenético construido a partir del alineamiento de las secuencias de los dominios SBP de los diferentes genes SPLs utilizando el software MEGA.3.1. Las funciones descritas de los genes SPL que han sido caracterizadas se indican a la derecha (tomado de Chen et al. 2010).

Para comparar sus secuencias proteicas, realizamos un alineamiento con la herramienta ClustalW (Larkin et al. 2007; Thompson et al. 2002), observando que, aunque la similitud entre los cuatro miembros del subclado es muy alta y se extiende a toda la secuencia, los más similares entre sí son SPL14 y SPL16, presentando un porcentaje de identidad de 79'7%, lo que sugería que era probable que SPL16 y SPL14 fueran funcionalmente redundantes (Fig. C1.12).



3.2.1.- Análisis de la interacción de factor SPL16 con el promotor de NGA3 mediante ensayos de activación transitoria.

Para explorar esta hipótesis, en primer lugar se comprobó si la proteína SPL16 era capaz de afectar la actividad del promotor de *NGA3* como lo hacía SPL14. Para ello, se coinfiltraron nuevamente hojas de *Nicotiana benthamiana* con la construcción *NGA3::LUC* y con una construcción de sobreexpresión de *SPL16* generada a tal efecto (Fig. C.1.13.A). El resultado del experimento mostró que SPL16 activaba de forma significativa la expresión del gen *LUC* por encima de su nivel de actividad basal. Por tanto, SPL16 parecía ser capaz de unirse al promotor de *NGA3* y de activarlo igual que ocurría con SPL14 (Fig. C.1.13.B).



**Figura C1.13: (A) Esquemas de las construcciones utilizadas en los ensayos de activación de la LUCIFERASA.** Las construcciones reporteras *NGA3::LUC* y *NGA3Δ270::LUC* se han descrito previamente. En la construcción efectora la CDS del gen *SPL16* (en azul cielo) se clonó bajo el control del promotor 35S (en rojo), y frente al terminador del gen *NOS* (en gris). **(B) Activación transitoria de los promotores *NGA3* y *NGA3Δ270* por la proteína *SPL16*.** Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con las combinaciones de plásmidos indicadas en las gráficas. Transcurridos tres días, se cuantificó en un luminómetro la señal emitida por la proteína LUC y por la REN (control interno) y se representó el ratio LUC/REN. Como controles negativos se utilizaron hojas infiltradas con el vector vacío o sólo con la construcción reportera. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. Las letras encima de barras indican una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t

## CAPÍTULO 1

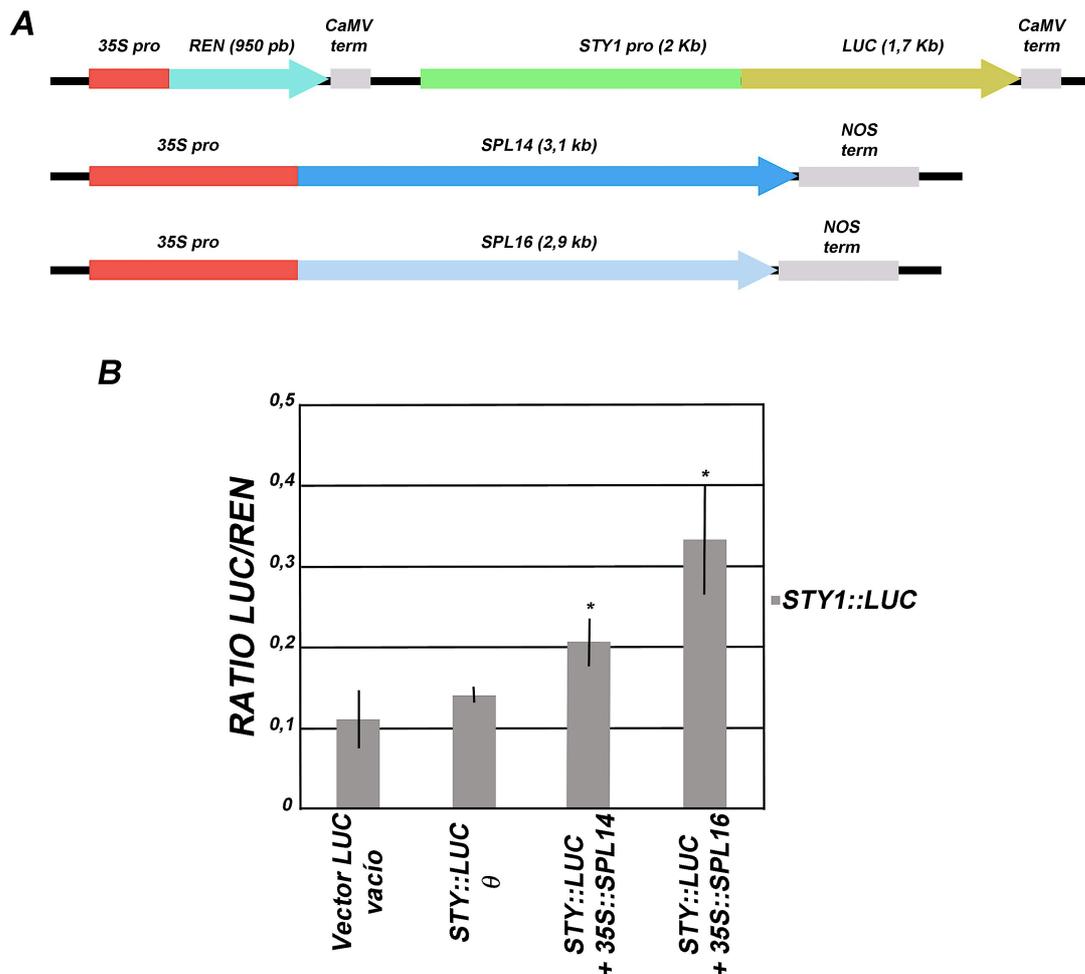
de Student  $<0,05$  a partir de (a) los valores obtenidos cuando infiltramos los reporteros solos respecto el vector LUC vacío; (b) los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3::LUC* + SPL16 respecto al *NGA3::LUC* solo; (c) los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3Δ270::LUC* + SPL16 respecto al *NGA3Δ270::LUC* solo; (d) los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3::LUC* + SPL16 respecto los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3Δ270::LUC* + SPL16.

Observamos también que la activación de *NGA3Δ270::LUC* en respuesta a SPL16 se reducía significativamente respecto a la de *NGA3::LUC* (Fig. C.1.13.B), sugiriendo que SPL16, al igual que SPL14, puede unirse directamente al fragmento de 270 pb conservado en los promotores *NGA* y activarlo *in vivo*.

### 3.2.2.- Análisis de la interacción de los factores SPL14 y SPL16 con el promotor de *STY1* mediante ensayos de activación transitoria.

Puesto que la región conservada de 270 pb en los promotores de los genes *NGA* compartía también un cierto grado de similitud con una región del promotor de *STYLISH1 (STY1)*, y dado que los genes *STY1* y *NGA* comparten un papel común en la especificación de los tejidos apicales en el gineceo de *Arabidopsis* y su patrón de expresión es muy similar, podía pensarse que SPL14 y SPL16 fueran también reguladores de *STY1*. Para comprobar esta hipótesis, se clonaron 1995 pb aguas arriba del ATG del gen *STY1* dirigiendo la expresión de la *LUCIFERASA (LUC)* en el vector pGREENII 0800-LUC (*STY1::LUC*) (Fig. C.1.14.A). Se infiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con esta construcción y con las construcciones que sobreexpresaban *SPL14* y *SPL16* (Fig. C1.14.B). Del análisis de los resultados se pudo deducir que el promotor de *STY1* no presentaba actividad basal como ocurría con el promotor de *NGA3*, así como que SPL14 y SPL16 activaban de forma significativa la expresión de *STY1*.

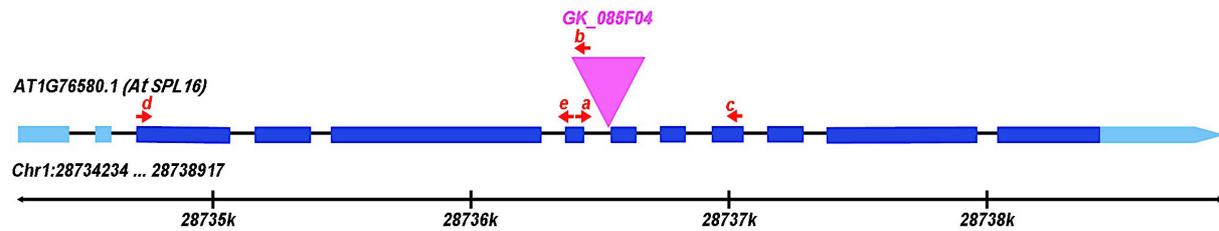
Estos resultados sugerían que SPL14 y SPL16 podían estar regulando de un modo similar a los genes *NGA*, y quizá, aunque en menor medida, a *STY1*, por lo que decidimos estudiar si *SPL14* y *SPL16* podían actuar de un modo redundante en estas rutas.



**Figura C1.14: (A) Esquemas de las construcciones utilizadas en los ensayos de activación de la LUCIFERASA.** En la construcción reportera *STY1::LUC*, se fusionó el promotor de *STY1* (en verde claro) al gen de la *LUCIFERASA* (en amarillo), estas construcciones llevan como control interno el gen de la *RENILLA* (en azul turquesa) flaqueado por el promotor 35S (en rojo) y el terminador CaMV (en gris). En la construcción efectora la CDS de los genes *SPL14* y *SPL16* (en azul y azul cielo respectivamente) se clonaron bajo el control del promotor 35S (en rojo), y el terminador del gen *NOS* (en gris). **(B) Activación transitoria del promotor *STY1* por las proteínas *SPL14* y *SPL16*.** Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con las combinaciones de plásmidos indicadas en las gráficas. Transcurridos tres días, se cuantificó en un luminómetro la señal emitida por la proteína LUC y por la *REN* (control interno) y se representó el ratio LUC/REN. Como controles negativos se utilizaron hojas infiltradas con el vector vacío o sólo con la construcción reportera. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. El asterisco encima de barras indica una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t de Student <0,05 a partir de los valores obtenidos cuando infiltramos *STY1::LUC* + el efector correspondiente respecto a *STY1::LUC* solo.

### 3.2.3.- Caracterización fenotípica del mutante de pérdida de función *spl16-101*.

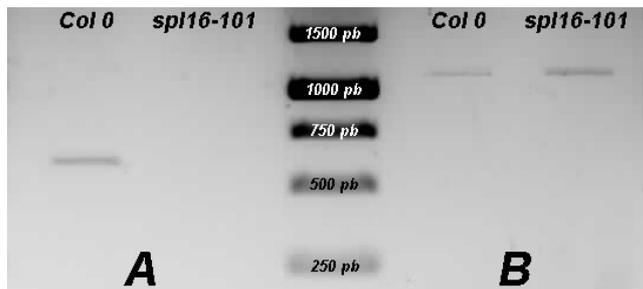
En primer lugar y puesto que no se encontraron mutantes *spl16* descritos en la literatura, se identificó una línea de la colección GABIKAT (GK085F04) que contenía una inserción de T-DNA en *SPL16*. La información proporcionada por la base de datos correspondiente indicaba que se trataba de una línea con una inserción de T-DNA en el sexto intrón (Fig. C1.15), pero dado que no se encontraron líneas con inserciones en exones se procedió a trabajar con ésta.



**Figura C1.15: Diagrama de la localización de la inserción de T-DNA en el gen *SPL16* según la información disponible en el TAIR.** La región codificante está representada en azul oscuro y las regiones 5'UTR y 3'UTR en azul claro. En la parte superior se indica la localización predicha de la inserción *sp16-101* (SAIL 1247\_G10). En la parte inferior se representa la región donde se localiza el gen *SPL16* en el cromosoma I. Las flechas rojas indican la posición aproximada de los cebadores utilizados en experimentos posteriores: (a) corresponde al cebador oPBF59, (b) corresponde al cebador 8474, (c) corresponde al cebador oPBF55, (d) corresponde al cebador oPBF42 y (e) corresponde al cebador oPBF38.

Para identificar una línea mutante homocigota se analizaron mediante PCR los DNA genómicos de diversas plantas individuales con cebadores específicos del gen y del T-DNA. Se utilizaron los cebadores oPBF55 y oPBF59, localizados en la región codificante delante y detrás de la inserción respectivamente, para amplificar el alelo silvestre y los cebadores oPBF59 y 8474, localizado este último en el T-DNA, para amplificar el alelo mutante (Fig. C1.15). La posterior secuenciación de los productos de PCR permitió comprobar que la inserción se localizaba en el lugar que indicaba la información del TAIR (+ 2104). Este alelo se denominó *sp16-101*.

Una vez identificado el mutante homocigoto y puesto que la inserción se localizaba en un intrón, se determinó el efecto de la inserción en la transcripción del gen *SPL16* mediante RT-PCR. Para ello se utilizaron los cebadores oPBF38 y oPBF42 para amplificar la región anterior a la inserción del gen y los oligos oPBF55 y oPBF59, que como hemos dicho anteriormente están localizados delante y detrás de la inserción del T-DNA (Fig. C1.15). Los resultados de la RT-PCR parecían indicar que en el mutante *sp16-101* no se transcribía el gen *SPL16* silvestre, puesto que utilizando cebadores a ambos lados de la inserción se observa un producto de la amplificación en el silvestre Col-0, pero no en la línea *sp16-101* (Fig. C1.16.A), mientras que sí era posible que se transcribiera un mensajero alternativo que diera lugar a una proteína truncada, ya que utilizando los cebadores que están delante de la inserción se amplificaba un fragmento tanto en el Col-0 como en la línea *sp16-101* (Fig. C1.16.B). Estos resultados indicaban que, a pesar de que la inserción se encontrara en un intrón, el alelo *sp16-101* probablemente causaba la pérdida de función del gen.



**Figura C1.16: Análisis por RT-PCR de los niveles de transcrito del gen SPL16 en plantulas de 15 días de edad de Col 0 y el mutante *spl16-101*. (A)** Se representan los niveles de expresión del gen SPL16 en la RT-PCR utilizando los cebadores oPBF55 y oPBF59. **(B)** Se representan los niveles de expresión del gen SPL16 en la RT-PCR utilizando los cebadores oPBF38 y oPBF42.

A continuación se procedió a la caracterización fenotípica de las plantas *spl16-101*. Al igual que en el caso de los mutantes *spl14-101*, cuando se compararon las flores en antesis del mutante *spl16-101* con las de las plantas silvestres Col-0 no se observaron diferencias significativas en tamaño y morfología (Fig.C1.17.E,G). De igual modo, tampoco se observaron diferencias cuando se compararon los frutos maduros (Fig.C1.17.I,K).

Únicamente se observaron diferencias muy sutiles en las hojas de roseta de los mutantes *spl16-101*, que eran de bordes suaves y no aserradas, a diferencia de las hojas de roseta de las plantas *spl14-101*, pero más alargadas y estrechas que las de plantas silvestres y ligeramente curvadas hacia el envés en su parte distal (Fig.C1.17.A,C).

#### 3.2.4.- Caracterización fenotípica del doble mutante de pérdida de función *spl14-101 spl16-101*.

Una vez descritos los mutantes homocigotos simples se generó mediante cruzamiento el doble mutante *spl14-101 spl16-101*.

Cuando se compararon las flores en antesis del doble mutante *spl14-101 spl16-101* con las de las plantas silvestres Col-0 tampoco se observaron diferencias significativas en tamaño y morfología (Fig.C1.17.E,H). De igual modo, tampoco se observaron diferencias cuando se compararon los frutos maduros (Fig.C1.17.I, L).

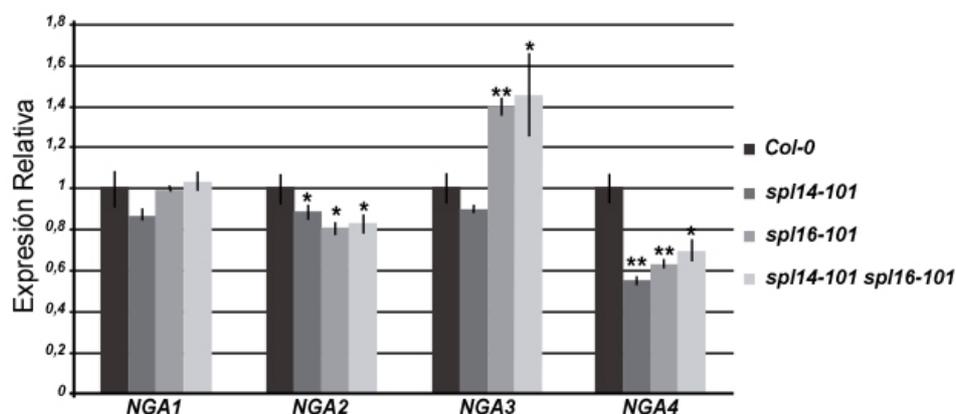
En cuanto a la morfología de las hojas de roseta, en el doble mutante no se observaron efectos sinérgicos de ambas mutaciones. Las hojas de roseta del doble mutante eran más aserradas y de mayor tamaño que las hojas de la planta silvestre, aunque no mostraban diferencias con respecto al mutante simple *spl14-101* (Fig.C1.17.A-D).



**Figura C1.17: Fenotipo de las plantas *spl14-101 spl16-101*.** Fotografía a bajo aumento de las rosetas (la barra blanca equivale a 1cm) **(A)** *Col-0*, **(B)** *spl14-101* **(C)** *spl16-101*, **(D)** *spl14-101 spl16-101*. Fotos a la lupa de flores en anthesis **(E)** *Col-0*, **(F)** *spl14-101* **(G)** *spl16-101*, **(H)** *spl14-101 spl16-101*. Fotos a la lupa de frutos completamente elongados en estadio 17-18 (las unidades de la regla son mm) **(I)** *Col-0*, **(J)** *spl14-101* **(K)** *spl16-101*, **(L)** *spl14-101 spl16-101*.

3.2.5.- Análisis de la expresión de los genes NGA en fondos mutantes *spl14-101*, *spl16-101* y *spl14-101 spl16-101*.

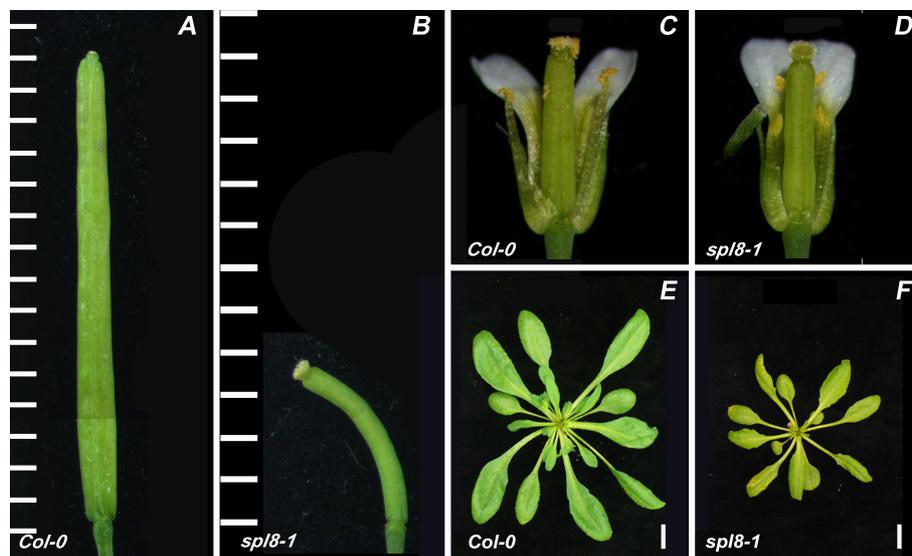
Dado que no observamos ninguna diferencia sustancial en el fenotipo de los dobles mutantes *spl14-101 spl16-101* respecto a los mutantes *spl14-101* y *spl16-101*, y tampoco se observaban defectos importantes en el desarrollo del gineceo que sustentaran la posible relación funcional de SPL14/SPL16 con los genes NGA, decidimos analizar si la expresión de los genes NGA estaba alterada en estos mutantes, por lo que determinamos los niveles de expresión de NGA1, NGA2, NGA3 y NGA4 en plántulas de dos semanas de Col-0, *spl14-101*, *spl16-101* y *spl14-101 spl16-101*. Como se observa en la figura C1.18, la expresión del gen NGA1 no mostraba diferencias significativas cuando comparamos Col-0, *spl14-101*, *spl16-101* y el doble mutante *spl14-101 spl16-101*. Sin embargo, el gen NGA3 no mostraba diferencias entre Col-0 y *spl14-101*, pero sí se observaba un aumento modesto aunque significativo en sus niveles de expresión en *spl16-101* y *spl14-101 spl16-101*. En el caso de los genes NGA2 y NGA4, se observaba una ligera reducción, aunque estadísticamente significativa, de los niveles de expresión en los mutantes *spl14-101*, *spl16-101* y el doble mutante *spl14-101 spl16-101* respecto a los del silvestre. En general, las pequeñas diferencias encontradas en los niveles de expresión de los genes NGA entre el silvestre y los mutantes *spl14* y *spl16* junto con el hecho de que *spl16* no modificara el fenotipo del mutante *spl14* de un modo sustancial ni afectara apreciablemente al desarrollo del gineceo sugerían que, o bien el efecto regulador de estos factores sobre la transcripción de NGA no era muy importante, o bien que la posible redundancia funcional se extendía a más miembros de la familia. Para explorar esta segunda posibilidad decidimos caracterizar mutantes en los otros genes del clado: SPL1, SPL12 y SPL8 (Fig C1.11).



**Figura C1.18: Nivel de expresión de NGA1, NGA2, NGA3 y NGA4 en plántulas Col-0, *spl14-101*, *spl16-101* y *spl14-101 spl16-101*.** Los niveles relativos de expresión de NGA1, NGA2, NGA3 y NGA4 se determinaron en plántulas de dos semanas mediante RT-qPCR, utilizando UBC21 como gen constitutivo de referencia. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar y se han normalizado frente al valor obtenido en Col-0. \*P<0,05; \*\*P<0,01.

3.2.6.- *Análisis de la relación funcional entre SPL8 y NGA.*

Xing et al. (2013) han descrito que el mutante simple *spl8* presenta un gineceo en anthesis con un tamaño ligeramente menor que los de plantas silvestres, por lo que SPL8 nos pareció un gen candidato especialmente interesante (Xing et al. 2013). Tras obtener la línea *spl8-1* (donada por el Dr. Peter Huijser, del Max Planck de Colonia, Alemania) comenzamos su caracterización. Además de lo descrito en la bibliografía, observamos que las hojas de roseta de estos mutantes presentaban bordes serrados y eran de menor tamaño que las silvestres, y que las plantas mostraban un ligero retraso en la transición floral. Los frutos también eran de menor tamaño y producían un cantidad muy reducida de semillas (Fig.C1.19).



**Figura C1.19: Fenotipo de las plantas *spl8-1*.** Fotos a la lupa de frutos completamente elongados en estadio 17-18 (las unidades de la regla son mm) **(A)** Col-0, **(B)** *spl8-1*. Fotos a la lupa de flores en anthesis **(C)** Col-0, **(D)** *spl8-1*. Fotografía a bajo aumento de las rosetas (la barra blanca equivale a 1cm) **(E)** Col-0, **(F)** *spl8-1*.

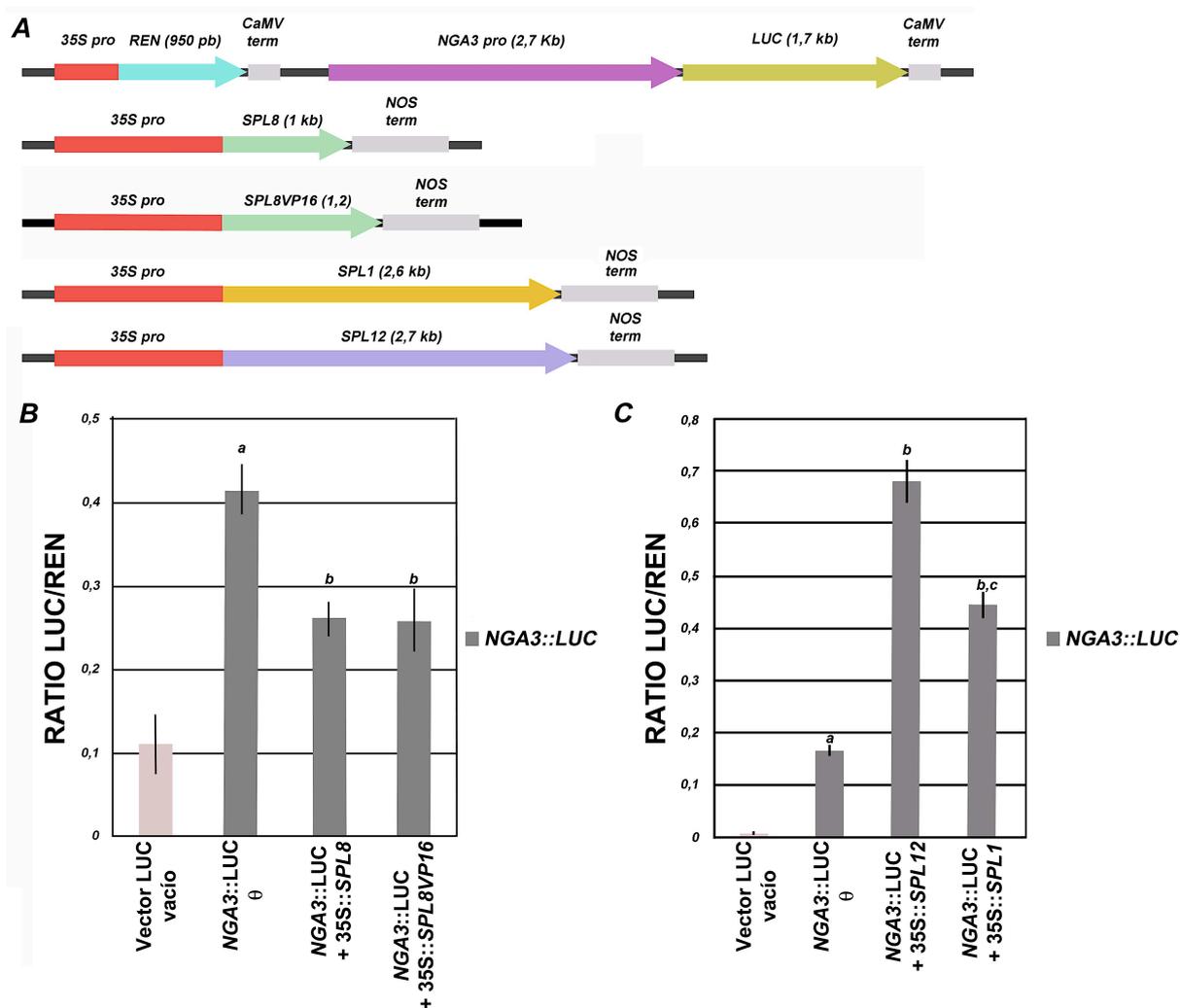
Estos defectos sugerían que en los mutantes *spl8* la expresión de los genes *NGA* podía estar alterada, por lo que decidimos comprobar si SPL8 era capaz de activar al promotor de *NGA3* del mismo modo que lo hacían SPL14 y SPL16, para lo que se realizó un nuevo ensayo de activación transcripcional transitoria del promotor de *NGA3*. En este caso se coinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con la construcción *NGA3::LUC* y con la construcción de la sobreexpresión de *SPL8* (Fig. C1.20.A). Los resultados mostraban que el factor SPL8 no era capaz de activar al promotor de *NGA3* (Fig. C1.20.B). Esto podía deberse a que SPL8 no fuera capaz de unirse al promotor y activarlo o a que SPL8 careciera de un dominio de activación transcripcional y, aunque fuera capaz de unirse, no lo fuera de activar la transcripción del gen *LUC*. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se realizó también el ensayo con una construcción que sobreexpresaba *SPL8* fusionado al dominio de activación viral VP16 (Cress and Triezenberg 1991;

Triezenberg et al. 1988). Al fusionar el dominio de activación VP16 a un factor de transcripción, éste se transforma en un activador dominante de la transcripción (Ng and Yanofsky 2001; Parcy et al. 1998). En este caso, tampoco se detectó activación del reportero, indicando que, probablemente, SPL8 no era capaz de unirse al promotor de *NGA3*, al menos en ausencia de otros factores o cofactores, por lo que no se continuó con la caracterización de su posible papel como regulador de los genes *NGA* (Fig. C1.20.B).

### 3.2.7.- Análisis de la relación funcional entre los factores SPL1, SPL12 y NGA.

En el árbol filogenético de la familia *SPL* se observa que los parálogos más próximos a *SPL14* y *SPL16* son *SPL1* y *SPL12*, por lo que también incluimos en los ensayos de activación transitoria del reportero *NGA3::LUC* las construcciones de sobreexpresión de *SPL1* y de *SPL12* (Fig. C1.20.A). En este caso, los resultados del ensayo mostraron que tanto la proteína *SPL1* como la proteína *SPL12* activaban de forma significativa la expresión del gen *LUC* y por tanto indicaban que *SPL1* y *SPL12* eran capaces de unirse al promotor de *NGA3* y activarlo de un modo similar a *SPL14* y *SPL16* (Fig.C1.20.C).

Los experimentos de activación transitoria de la expresión de *NGA3::LUC* sugerían que *SPL1*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16* eran posibles activadores transcripcionales de los genes *NGA* y por tanto cabía esperar que ejercieran esta función redundantemente. Para comprobar esta hipótesis sin tener que generar un cuádruple mutante *spl1 spl12 spl14 spl16* se empleó una estrategia de silenciamiento múltiple en plantas transgénicas utilizando la tecnología de los microRNAs artificiales (*amiR-target*), que en teoría son capaces de dirigir simultáneamente la degradación selectiva y específica de los mRNAs seleccionados (Schwab et al. 2006). Para estos experimentos, se diseñó un amiRNA cuyas dianas fueran los genes *SPL1* y *SPL12* para expresarlo en el doble mutante *spl14-101 spl16-101* generado previamente.



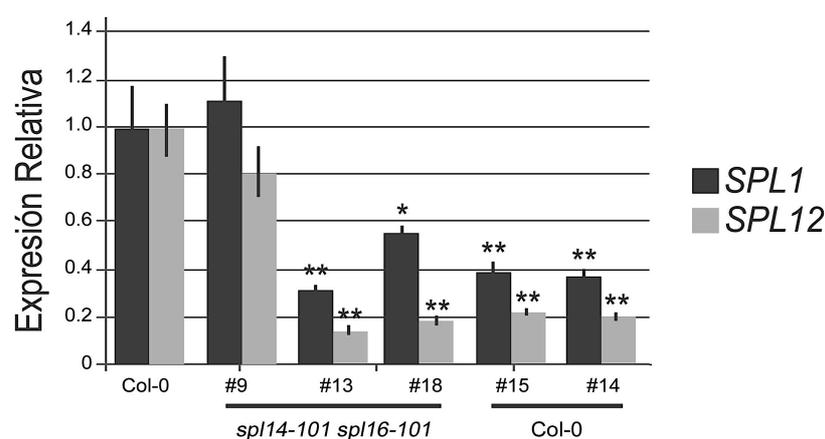
**Figura C1.20: (A) Esquemas de las construcciones utilizadas en los ensayos de activación de la LUCIFERASA.** En la construcción reportera *NGA3::LUC* se fusionó el promotor de *NGA3* (en violeta) al gen de la *LUCIFERASA* (en amarillo), estas construcciones llevan como control interno el gen de la *RENILLA* (en azul cielo) flanqueado por el promotor 35S (en rojo) y el terminador CaMV (en gris). En las construcciones efectoras las CDS de los genes *SPL8*, *SPL8:VP16*, *SPL1* y *SPL12* (en verde claro, amarillo y lila respectivamente) se clonaron bajo el control del promotor 35S (en rojo), y el terminador del gen *NOS* (en gris). **(B) Activación transitoria del promotor *NGA3* por las proteínas *SPL8*, *SPL8VP16*, *SPL12* y *SPL1*.** Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con las combinaciones de plásmidos indicadas en las gráficas. Transcurridos tres días, se cuantificó en un luminómetro la señal emitida por la proteína LUC y por la *RENILLA* (control interno) y se representó el ratio LUC/REN. Como controles negativos se utilizaron hojas infiltradas con el vector vacío o sólo con la construcción reportera. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. Las letras encima de barras indican una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t de Student <0,05 a partir de (a) los valores obtenidos cuando infiltramos los reporteros solos respecto el vector LUC vacío; (b) los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3::LUC* + el efector correspondiente respecto al *NGA3::LUC* solo; (c) los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3::LUC* + *SPL12* respecto los valores obtenidos cuando infiltramos *NGA3::LUC* + *SPL1*.

El primer paso en el diseño de los microRNAs artificiales fue obtener una secuencia consenso, complementaria a alguna región del mRNA conservada entre *SPL1* y *SPL12*. Para ello, se empleó el programa *Web MicroRNA Designer* (<http://wmd.weigelword.org>). Al introducir la secuencia de *SPL1* y *SPL12* en la herramienta *Designer*, el programa proporciona diferentes secuencias de 21pb que pueden funcionar como microRNA artificial ordenadas por ciertos parámetros de calidad, que son: la composición de la

secuencia y el grado de inestabilidad en el extremo 5', el número de posiciones desapareadas al hibridarse con el gen diana, la energía libre de hibridación (los valores observados en la mayoría de miRNAs endógenos se sitúan entre -35 y -38 kcal/mol; por lo que no se considerarán amiRNAs, aquellos que se unan a sus dianas con energías mayores que -30 kcal/mol) y el número de genes diferentes al gen diana que muestran cinco o menos desapareamientos al hibridarse con el amiRNA.

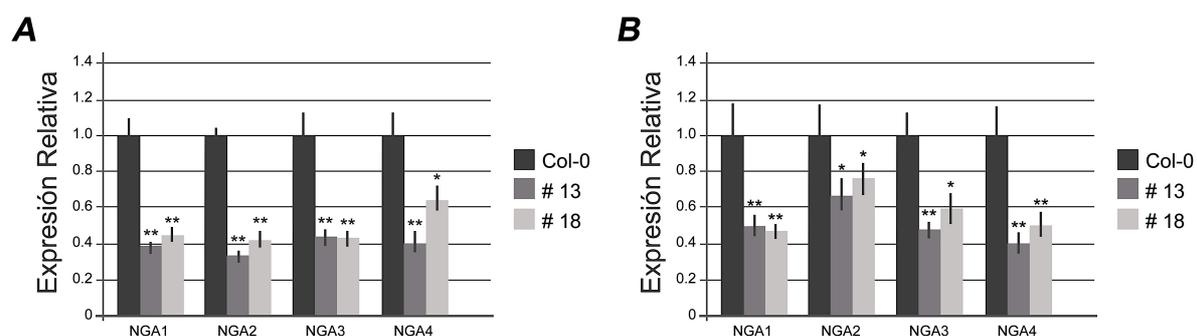
En este caso, el programa nos proporcionó varias secuencias posibles para el microRNA artificial y se eligió la secuencia TACAAAGTAACCTTATGCCAG que, de acuerdo con los criterios mencionados, era el amiRNA potencialmente mejor. Mediante PCRs seriadas se sustituyó el microRNA de la horquilla del miR319a presente en el plásmido RS300 por el microRNA específico para los genes *SPL1/SPL12* (Schwab et al. 2006) y se transformaron tanto plantas silvestres Col-0 para observar el posible efecto específico de la inactivación de *SPL12* y *SPL1*, como plantas del doble mutante *spl14-101 spl16-101*. En el caso de la transformación sobre plantas silvestres Col-0, se obtuvieron 20 líneas independientes, en las cuales el fenotipo observado en la T1 no difería del de las plantas Col-0. En el caso de la transformación sobre plantas *spl14-101 spl16-101* se obtuvieron 25 líneas independientes de las cuales en torno al 25% mostraron fenotipos anómalos.

Se estimó la eficiencia de inactivación del microRNA determinando los niveles de expresión de *SPL1* y *SPL12* en plántulas de dos semanas de Col-0, tres líneas transformadas sobre el doble mutante *spl14-101 spl16-101* (#9, #13 y #18) y dos líneas transformadas sobre el Col-0 (#14 y #15) escogidas aleatoriamente, y observamos que las líneas #13, #18, #14 y #15 presentaban una reducción de aproximadamente el 60% para *SPL1* y del 80% para *SPL12* (Fig. C1.21).



**Figura C1.21: Nivel de expresión de *SPL1* y *SPL12* en plántulas de 3 líneas independientes de amiR-*SPL1/12* en fondo *spl14-101 spl16-101* y 2 líneas independientes de amiR-*SPL1/12* en fondo Col-0.** Los niveles relativos de expresión de *SPL1* y *SPL12* se determinaron en plántulas de dos semanas mediante RT-qPCR, utilizando *UBQ10* como gen constitutivo de referencia. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar y se han normalizado frente al valor obtenido en Col-0. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Puesto que en el caso de la transformación sobre plantas Col-0 no observamos ninguna característica diferente a las plantas silvestres, decidimos centrarnos en las dos líneas transformadas sobre el doble mutante *spl14-101 spl16-101* y que mostraron una eficiencia de inactivación significativa (#13 y #18). En primer lugar, decidimos analizar si la expresión de los genes *NGA* estaba alterada en estas líneas, por lo que determinamos los niveles de expresión de *NGA1*, *NGA2*, *NGA3* y *NGA4* en plántulas Col-0 de dos semanas y en las líneas #13 y #18 *amiR-SPL1/12 spl14-101 spl16-101*. Como se observa en la figura C1.22, la expresión de los genes *NGA1*, *NGA2*, *NGA3* y *NGA4* se reduce en torno a un 60% en ambas líneas, a excepción del *NGA4* en la línea #18 que solo se reduce un 40%. También decidimos comparar los niveles de los genes *NGA* en las inflorescencias de las plantas Col-0, y en las líneas *amiR-SPL1/12 spl14-101 spl16-101* #13 y #18, y observamos que los niveles de *NGA1*, *NGA3* y *NGA4* se reducían en torno a un 50% y los de *NGA2* en torno a un 40% en ambas líneas respecto al los niveles en Col-0, indicando que el efecto regulador de los SPLs sobre *NGA* es significativo.



**Figura C1.22: Nivel de expresión de *NGA1*, *NGA2*, *NGA3* y *NGA4* en (A) plántulas y (B) inflorescencias de Col-0 y las líneas #13 y #18 del *amiRNA anti SPL1 SPL12* sobre *spl14-101 spl16-101*.** Los niveles relativos de expresión de *NGA1*, *NGA2*, *NGA3* y *NGA4* se determinaron mediante RT-qPCR, utilizando *UBC21* como gen constitutivo de referencia. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar y se han normalizado frente al valor obtenido en Col-0. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Tras estudiar los niveles de expresión de los genes *NGA*, decidimos caracterizar en la T2 las plantas de la línea #18, cuyo fenotipo era más evidente. Las plantas de la línea #18 presentaban unas rosetas con hojas de menor tamaño, peciolo más cortos y con bordes frecuentemente curvados hacia el envés de la hoja (Fig.C1.23.A), defectos que también se observaban en las hojas caulinares (Fig.C1.23.B). Al observar en detalle las inflorescencias observamos defectos en la morfología de la flor. Por ejemplo, la posición relativa de los sépalos y los pétalos se encontraba alterada y observamos que frecuentemente no ocupaban posiciones alternas. También detectamos un crecimiento irregular de algunos de los órganos, especialmente de los sépalos (Fig.C1.23.C). En algunos casos, los sépalos no se separaban correctamente unos de otros, lo que provocaba que "encapsularan" al resto de los órganos florales, alterando su crecimiento

y haciendo que pétalos, anteras y carpelos crecieran deformados (Fig.C1.23.E). Cuando esto no ocurría, el gineceo se desarrollaba con una morfología similar a la silvestre, y no se observaba ningún defecto evidente en estadio de antesis (Fig.C1.23.D). Sin embargo, si que observábamos que en la parte apical del fruto totalmente elongado las valvas adoptaban una forma más abultada que daba al ovario un aspecto rectangular; además, la zona de dehiscencia aparecía más marcada que en el silvestre (Fig.C1.23.F-H) y los ginóforos eran ligeramente más alargados (Fig.C1.23.I).



**Figura C1.23: Fenotipo de las plantas *amiRNA antiSPL1 spl12* en fondo *spl14-101 spl16-101*, línea 18 (A) Fotografía a bajo aumento de la roseta. (B) Fotografía a bajo aumento de las hojas caulinares. (C) Fotos a la lupa de una flor en estadio 15-16. (D) Fotos a la lupa de un gineceo en estadio 14-15 (la barra blanca equivale a 1mm). (E) Fotos a la lupa de una flor en estadio 15-16 donde se muestra el mayor crecimiento de los sépalos que encapsulan al resto de órganos florales y alteran el crecimiento del gineceo (la barra blanca equivale a 1mm). (F) Fotos a la lupa de frutos completamente elongados en estadio 17 (las unidades de la regla son mm). Detalle de las regiones (G) apical, (H) medial, y (I) basal, del fruto totalmente elongado (la barra blanca equivale a 1mm). **Fenotipo de las plantas *Col-0*.** (J) Fotos a la lupa de una flor en estadio 13 (la barra blanca equivale a 1mm). (K) Fotos a la lupa de frutos completamente elongados en estadio 17 (las unidades de la regla son mm). Detalle de las regiones (L) apical, (M) medial y (N) basal, del fruto totalmente elongado (la barra blanca equivale a 1mm).**

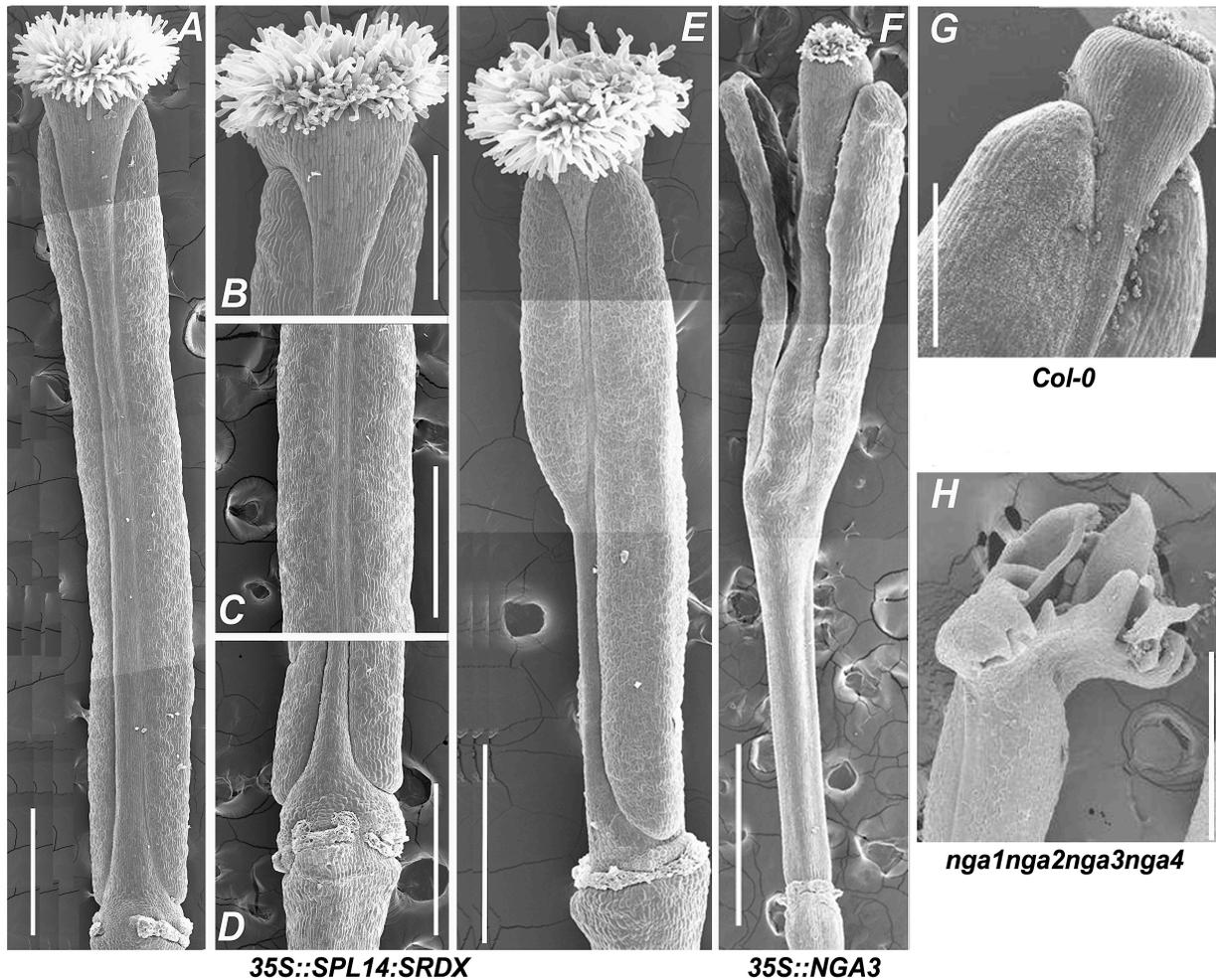
### 3.2.8.- Obtención de un alelo dominante negativo para *SPL14*.

Alternativamente a la estrategia de silenciamiento por amiRNA-*SPL1/12*, se decidió intentar generar un alelo dominante negativo de *SPL14* mediante la expresión constitutiva de una proteína quimérica *SPL14:SRDX* (Fig. C1.24). El dominio *SRDX* es un péptido de 12 aminoácidos (LDLDLELRGFA) que constituye un dominio de represión fuerte altamente conservado en los factores de transcripción ERF (Ethylene-Responsive element-binding factor) y TFIIIA (Hiratsu et al. 2003). Este dominio, fusionado a un factor de transcripción, lo convierte en un represor transcripcional fuerte, de modo que su sobreexpresión provoca la represión dominante de todos sus genes diana, aunque existan otros factores de transcripción de función activadora actuando sobre dichos genes. Esta aproximación permite, por lo tanto, observar fenotipos relacionados con la alteración de la función del gen bajo estudio pasando por alto los problemas de redundancia génica (Hiratsu et al. 2003). Esta estrategia ya ha sido utilizada satisfactoriamente con otros genes en los que se ha visto redundancia génica como son algunos genes de la familia TCPs. Por ejemplo, Koyama et al. en 2007 describieron que las líneas *35S::TCP3:SRDX* presentan un fenotipo muy similar al observado en mutantes múltiples para los genes redundantes *TCP2/TCP3/TCP4/TCP10/TCP24*, o en mutantes *jaw-D* (Koyama et al. 2007; Koyama et al. 2010; Palatnik et al. 2003; Schommer et al. 2008), en los que la sobreexpresión del miRNA319, cuyas dianas son los genes *TCP* mencionados anteriormente, causa el silenciamiento simultáneo de estos.



**Figura C1.24: Esquema de la construcción utilizada para generar plantas transgénicas de *Arabidopsis* con la sobreexpresión del gen *SPL14:SRDX*.** Se representa el promotor 35S (en rojo), la secuencia codificante de *SPL14* (en azul) y el terminador del gen *NOS* (en gris).

En este caso, se generaron 30 líneas transgénicas de las cuales la mayoría mostraron un fenotipo similar. En estas líneas T1 de las plantas *35S::SPL14:SRDX* se observaron defectos morfológicos en el gineceo, que presentaba unas partes apicales más engrosadas, replum ancho y unas valvas en ocasiones asimétricas en comparación con las plantas silvestres (Fig. C1.25. A-E, G). Las plantas *35S::NGA3* se caracterizan por presentar gineceos con partes apicales engrosadas y replum ancho (Fig. C1.25.F), por lo que estos resultados eran sorprendentes, ya que si *SPL14* es capaz de unirse y regular positivamente a *NGA3* tal y como habíamos observado en los ensayos de luciferasa (Fig. C1.3), cabría esperar que el fenotipo de las líneas *35S::SPL14:SDRX* fuera similar al observado en los mutantes *nga* (Fig. C1.25.H).



**Figura C1.25: Fenotipo de carpelo de plantas 35S::*SPL14*:*SRDX*.** Fotografía al microscopio electrónico de barrido (SEM) del (A) gineceo de las líneas T1 35S::*SPL14*:*SRDX* (600µm). Se muestran detalles de la parte (B) apical (400µm), (C) medial (600µm) y (D) basal del carpelo (600µm). Fotografía al microscopio electrónico de barrido (SEM) de (E) otro gineceo de las líneas T1 35S::*SPL14*:*SRDX* (600µm), y del (F) Gineceo de 35S::*NGA3* (1mm). Se muestran detalles de la parte apical de un gineceo (G) Col-0 (500µm) (Tomada de Navarrete-Gómez, 2011) y (H) mutante *nga1 nga2 nga3 nga4* (Tomada de Navarrete-Gómez, 2011) (400µm).

Tanto los fenotipos de las líneas amiRSPL1/12 en fondo *spl14-101 spl16-101*, como los observados en las plantas 35S::*SPL14*:*SRDX* parecían apoyar la hipótesis de la posible redundancia funcional de los genes *SPL* estudiados. Además, algunas de las alteraciones en el desarrollo observadas tanto en unas líneas como en otras, especialmente los defectos en la morfología de los frutos, sugerían que la regulación de *NGA* podría estar afectada en las mismas, lo cual reforzaba el interés por proseguir este estudio. Por esta razón, decidimos generar un cuádruple mutante *spl1 spl12 spl14 spl16*, para continuar este trabajo con una línea mutante estable. En el momento de redactar esta memoria, la generación del mutante múltiple está todavía en proceso.

### **4.- Análisis funcional de la relación entre los genes *TCP* del clado CIN-like y los genes *NGA*.**

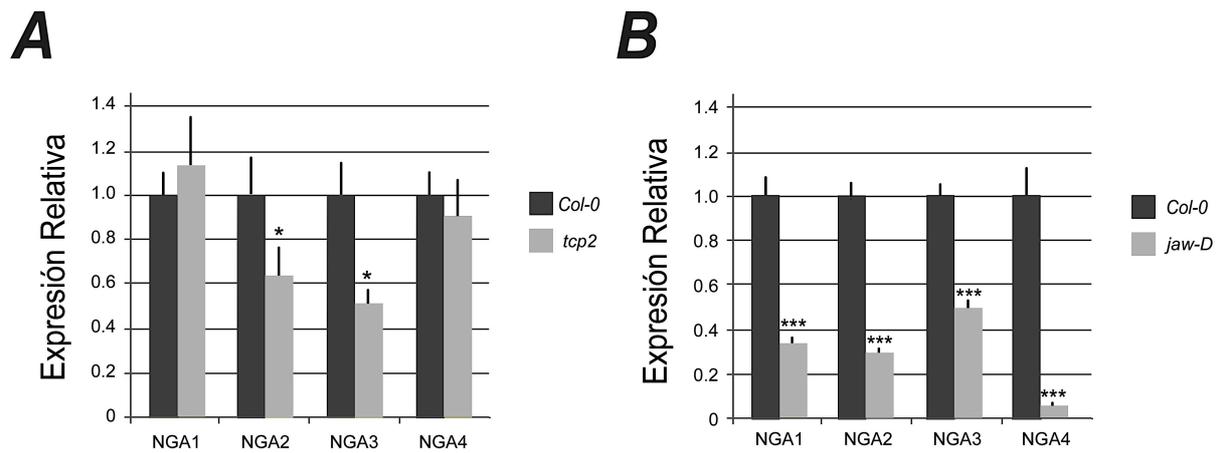
Como se ha descrito en el apartado 2 de este capítulo, identificamos dos miembros de la familia TCP, TCP2 y TCP3, como posibles reguladores de la expresión de los genes *NGA*. Cabe destacar que la pérdida de función de los genes *TCP* pertenecientes al clado CIN-like, en el que se incluyen *TCP2* y *TCP3*, causa principalmente defectos en la morfología de las hojas. Las hojas de los mutantes simples *tcp2*, *tcp4* y *tcp10* son más anchas y ligeramente más serradas que el silvestre (Schommer et al. 2008) y cuando se combinan estas mutaciones la severidad del fenotipo aumenta, tal y como se observa en los mutantes múltiples para los genes redundantes *TCP2/TCP3/TCP4/TCP10/TCP24* o los mutantes *jaw-D*, que sobreexpresan miR319, un microRNA que dirige la degradación de los transcritos de estos cinco genes *TCP* (Koyama et al. 2007; Koyama et al. 2010; Palatnik et al. 2003; Schommer et al. 2008). Los fenotipos de pérdida de función de los genes TCP CIN-like se parecen en parte al observado en los mutantes cuádruples *nga*, donde las hojas son también más anchas y más serradas que en el silvestre (Alvarez et al. 2009; Trigueros et al. 2009).

#### 4.1.-Análisis de la expresión de los genes *NGA* en fondos mutantes *tcp*.

##### 4.1.1.-Análisis del nivel de expresión de los genes *NGA* en fondos mutantes *tcp*.

Para validar la relevancia funcional de la interacción observada entre los genes *TCP2* y *TCP3* y el promotor de *NGA3* en *Arabidopsis*, y también comprobar si ésta se extendía a los otros genes *NGA*, se determinaron los niveles de expresión de los cuatro genes *NGA* en plántulas *tcp2-1* y Col-0. Para ello, se analizaron los niveles de mRNA correspondientes mediante RT-qPCR. En *tcp2-1*, los niveles de mRNA de *NGA2* y *NGA3* eran significativamente menores que en el silvestre, reduciéndose aproximadamente a la mitad, mientras que los niveles de transcrito de *NGA1* y *NGA4* no cambiaban (Fig. C1.26.A).

Dado que existe un alto grado de redundancia génica entre los genes CIN-like en *Arabidopsis*, se determinaron también los niveles de expresión de los cuatro genes *NGA* en plántulas *jaw-D*, el mutante que sobreexpresa el miR319 (Koyama et al. 2010; Palatnik et al. 2003; Schommer et al. 2014). Este experimento mostró que los niveles de expresión de los transcritos de todos los genes *NGA* eran significativamente menores con respecto al silvestre en los mutantes *jaw-D* (Fig. C1.26.B).

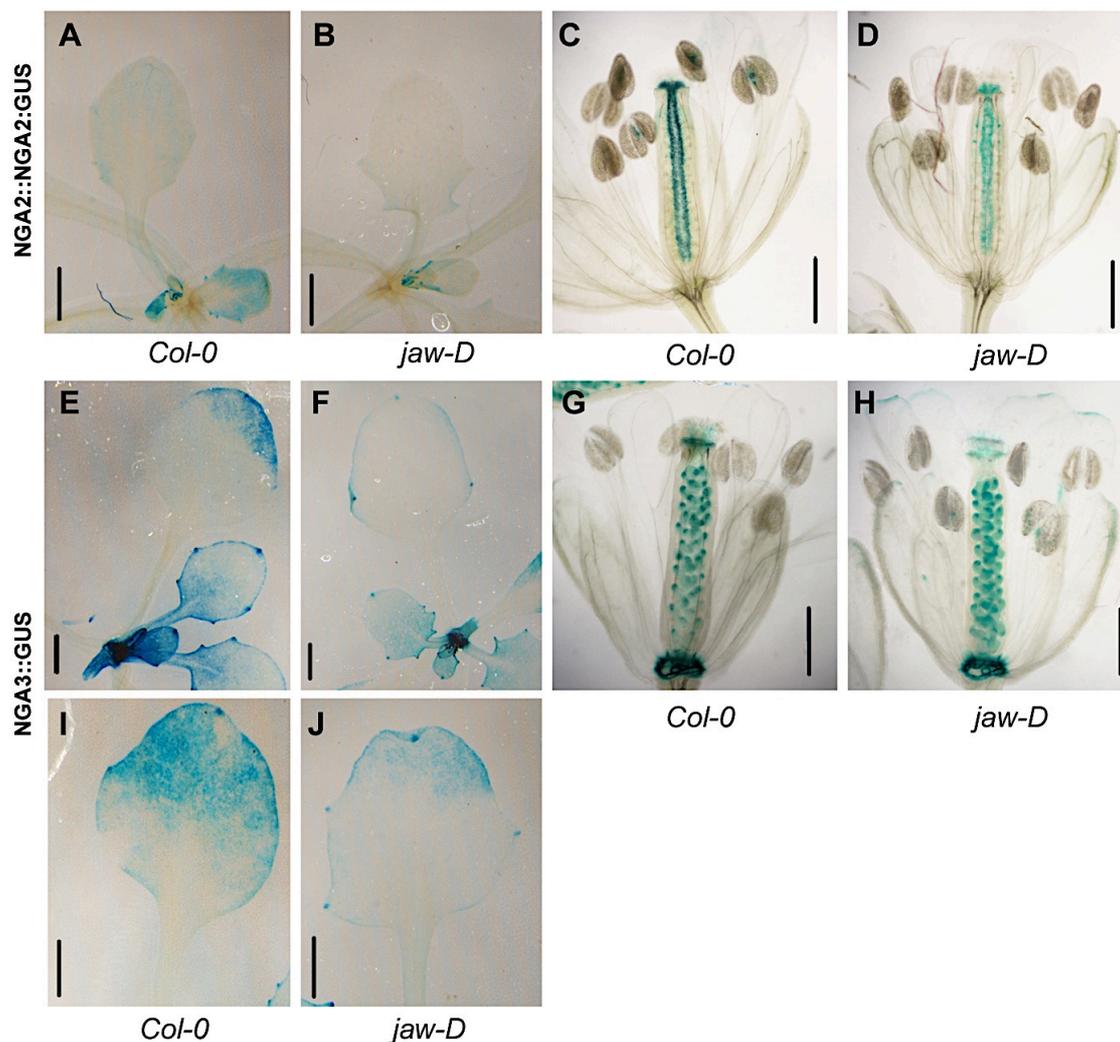


**Figura C1.26: Nivel de expresión de *NGA1*, *NGA2*, *NGA3* y *NGA4* en plántulas (A) *Col-0* y *tcp2-1*; y (B) *Col-0* y *jaw-D*.** Los niveles relativos de expresión de *NGA1*, *NGA2*, *NGA3* y *NGA4* se determinaron en plántulas de dos semanas mediante RT-qPCR, utilizando *UBC21* como gen constitutivo de referencia y se han normalizado frente al valor obtenido en *Col-0*. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Estos resultados parecían indicar que los genes *TCP* de la subfamilia CIN-like se requieren probablemente para la regulación de los genes *NGA* de una manera redundante.

#### 4.1.2.-Análisis del patrón de expresión de los genes *NGA* en fondo *jaw-D*.

A continuación se analizó si se producía algún cambio en el patrón de expresión de las líneas reporteras *NGA2::NGA2:GUS* y *NGA3::GUS* en fondo *jaw-D*. En ambos casos se observó que las líneas reporteras correspondientes mostraban patrones de expresión similares en el fondo silvestre y en *jaw-D*, aunque los niveles de expresión eran menores en el caso de *jaw-D* (Fig. C1.27). Estos resultados concuerdan con lo observado en las RT-qPCRs y sugieren que los genes *TCP* son necesarios para mantener la expresión de los genes *NGA* en un nivel óptimo pero no tanto para establecer su patrón de expresión espacial.



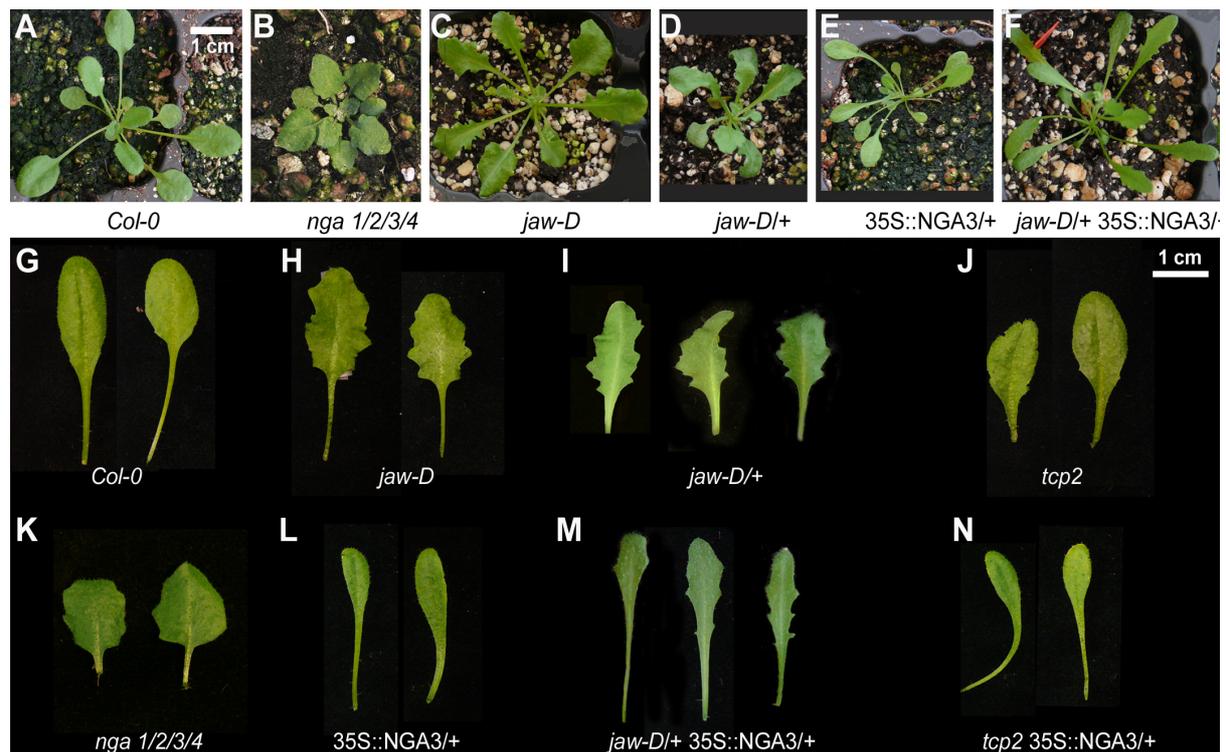
**Figura C1.27: Patrón de expresión de *NGA2* y *NGA3* en fondo *jaw-D*.** Detección histoquímica de actividad *NGA2*::*GUS* dirigida por el promotor de *NGA2* en plántulas de 12 días después de la germinación de (A) *Col-0* y (B) *jaw-D*; y en gineceo en estadio 14 de plantas (C) *Col-0* y (D) *jaw-D*. Detección histoquímica de actividad *GUS* dirigida por el promotor de *NGA3* en plántulas (E) *Col-0* y (F) *jaw-D*; en gineceo en estadio 14 de plantas (G) *Col-0* y (H) *jaw-D*, y la segunda hoja de roseta de (I) *Col-0* y (J) *jaw-D*.

#### 4.2.- Análisis genético de la relación entre los genes *NGA*, *TCP2* y *TCP3*.

Puesto que los genes *NGA* parecían estar regulados positivamente por *TCP2* y *TCP3* y probablemente también por otros factores CIN-like, y tanto los mutantes *cin*-like como los *nga* presentan defectos similares en el desarrollo de la hoja, parecía posible que los fenotipos de *tcp2* y *tcp3* se debieran a los niveles reducidos de la expresión de *NGA* en estos mutantes. Si esto fuera cierto, la sobreexpresión de los genes *NGA* en estos fondos mutantes debía complementar los fenotipos observados en los mutantes *tcp*.

Para validar genéticamente esta hipótesis se generaron distintas combinaciones genéticas. En el laboratorio disponíamos de las líneas *tcp2-1* y *jaw-D* por lo que, en

primer lugar, observamos que ocurría en la combinación *35S::NGA3 tcp2*. Las plantas que sobreexpresan *NGA3* se caracterizan por presentar unas hojas de roseta estrechas, alargadas y de margen liso (Fig. C1.28.L), mientras que las hojas del mutante *tcp2* son más anchas y ligeramente más serradas que las silvestres (Fig. C1.28.G, J). Si la hipótesis planteada fuera correcta cabría esperar que el fenotipo de sobreexpresión de *NGA3* fuera capaz de complementar el fenotipo mutante *tcp2*. Una vez generadas las plantas *35S::NGA3 tcp2*, observamos que presentaban un fenotipo indistinguible del de plantas *35S::NGA3* (Fig. C1.28.N, L), apoyando nuestra hipótesis.



**Figura C1.28: Fenotipos de los diferentes mutantes y combinaciones generadas. (A-F)** Rosetas de (A) plantas Col-0, (B) cuádruple mutante *nga1 nga2 nga3 nga4*, (C) mutante homocigoto *jaw-D*, (D), mutante heterocigoto *jaw-D* (E) hemizigoto *35S::NGA3*, (F) una planta F1 derivada del cruce de la *jaw-D* y *35S::NGA3*, y por lo tanto heterocigoto para *jaw-D* y hemizigoto para *35S::NGA3*. **(G-N)** Hojas de plantas de diferentes genotipos en equivalente estadio de desarrollo: (G) de tipo Col-0. (H) mutante homocigoto *jaw-D*, (I) mutante heterocigoto *jaw-D*, (J) mutante *tcp2-1*, (K) cuádruple mutante *nga1 nga2 nga3 nga4*, (L) hemizigoto *35S::NGA3*, (M) heterocigoto para *jaw-D* y hemizigoto *35S::NGA3*, (N) hemizigoto *35S::NGA3 tcp2*. La barra de escala equivale a 1 cm.

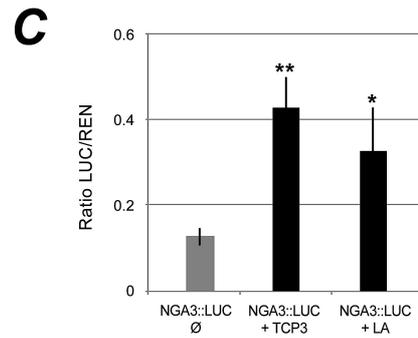
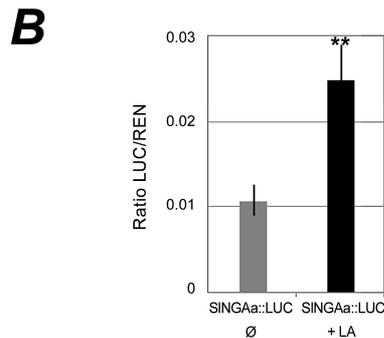
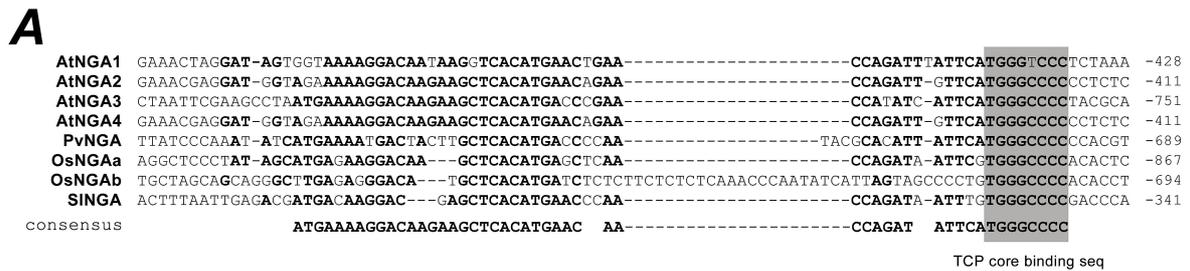
Así mismo, también estudiamos qué efecto producía la sobreexpresión de *NGA3* en el fondo *jaw-D*, donde ya habíamos observado mediante qRT-PCR que la expresión de todos los genes *NGA* se reducía fuertemente. En esta combinación, heterocigota tanto para *jaw-D* como para *35S::NGA3*, las hojas de roseta eran mucho más estrechas en comparación con las *jaw-D* heterocigotas (Fig. C1.28. M, I, L), lo que indicaba que *35S::NGA3* era capaz de suprimir significativamente el crecimiento lateral producido por la pérdida de función *TCP*. Además el fenotipo de hoja serrada típico de los mutantes

*jaw-D* también se reducía en la combinación *35S::NGA3 jaw-D* (Fig. C1.28. M, I, H), aunque no completamente, puesto que todavía era más pronunciado que en el Col-0 o en las líneas *35S::NGA3* (Fig. C1.28. M, G, L). Estos datos parecen indicar que los factores TCP parecen regular el crecimiento y morfología de la hoja, al menos en parte, a través de la regulación de los genes *NGA*.

### 4.3.- Estudio de la conservación de la interacción TCP/NGA en otras especies.

Se ha mostrado que los genes *TCP CIN*-like controlan la morfología de la hoja en varias especies incluyendo el tomate, el arroz o las leguminosas (Ori et al. 2007; Yang et al. 2013; Zhou et al. 2013). La conservación de la función de *NGA* en las angiospermas no ha sido estudiada tan extensamente, aunque se ha demostrado que, al menos en eudicotiledóneas, los factores *NGA* tienen un papel esencial y conservado en el desarrollo del estilo y el estigma. Por otra parte, las flores de *Nicotiana benthamiana* con una actividad reducida de *NGA* muestran un desarrollo alterado de sépalos y pétalos, lo que sugiere que el papel de *NGA* en la expansión de los órganos laterales también está conservado (Fourquin and Ferrandiz 2014). Con el fin de confirmar si la interacción observada entre los factores *TCP CIN*-like y los promotores de los genes *NGA* está conservada otras especies, se compararon las regiones promotoras de ortólogos de *NGA* de *Arabidopsis*, arroz, tomate y haba. Se encontró que la secuencia mas conservada de 53 pb de los promotores *NGA* de *Arabidopsis* también estaba presente en los ortólogos de otras especies, e incluía el sitio de unión putativo de los factores *TCP* (Fig. C1.29 A), sugiriendo así que los genes *NGA* podrían ser regulados por factores *TCP* también en estas especies.

Para validar esta hipótesis, se utilizó de nuevo el sistema *LUC/REN* para probar si *LANCEOLATE* (*LA*), el ortólogo de tomate de *AtTCP3* (Ori et al. 2007), era capaz de activar al promotor de *SINGAa* (el ortólogo de tomate de *AtNGA3*). Para ello se clonó un fragmento de aprox. 2 kb aguas arriba del ATG del gen *SINGAa* en el vector *pGREEN 800-Luc* (*SINGAa::LUC*) y se coinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con el reportero *SINGAa::LUC* y con la construcción de sobreexpresión de *LA*. Los datos obtenidos mostraron un aumento significativo de la actividad *LUC* en respuesta a la coexpresión con *LA*, lo que indicaba que *LA* era capaz de activar al promotor *SINGAa in planta* (Fig. C1.29 B,C). Asimismo, también se coinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con *AtNGA3::LUC* y *35S::LA*, observándose en este caso que *LA* podría activar también el promotor de *NGA3* de *Arabidopsis* de un modo similar al que lo hace el factor endógeno *TCP3*.



**Figura C1.29: (A) Alineamiento del fragmento de 53 pb conservado en el promotor *AtNGA3* utilizado en el ensayo de híbrido simple de levadura con los promotores de los otros genes *NGA* de *Arabidopsis* y de diferentes especies.** Se muestra una secuencia consenso de unión de TCP (en sombreado) y las bases más conservadas (en negrita). Los números de la derecha corresponden a la posición relativa de la última base a la codón de inicio del gen correspondiente. Los identificadores de los genes incluidos son los siguientes: *AtNGA1* (At2g46870), *AtNGA2* (At3g61970), *AtNGA3* (At1g01030), *AtNGA4* (At4g01500), *PvNGA* (PHAVU\_010G120900g), *OsNGAa* (LOC\_Os03g02900), *OsNGAb* (LOC\_Os10g39190), *SINGAa* (LOC101249569). **(B) Activación transitoria del promotor *SINGAa* por LA y (C) del promotor *AtNGA3* de *Arabidopsis* por las proteínas TCP3 y LA.** Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con las combinaciones de plásmidos indicadas en las gráficas. Transcurridos tres días, se cuantificó la señal emitida por la proteína LUC y por la REN (control interno) y se representó el ratio LUC/REN. Como controles negativos se utilizaron hojas infiltradas con el vector vacío o sólo con la construcción reportera. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Estos resultados apoyan la hipótesis de la conservación de la regulación de *NGA* por los factores TCP CIN-like en especies alejadas.



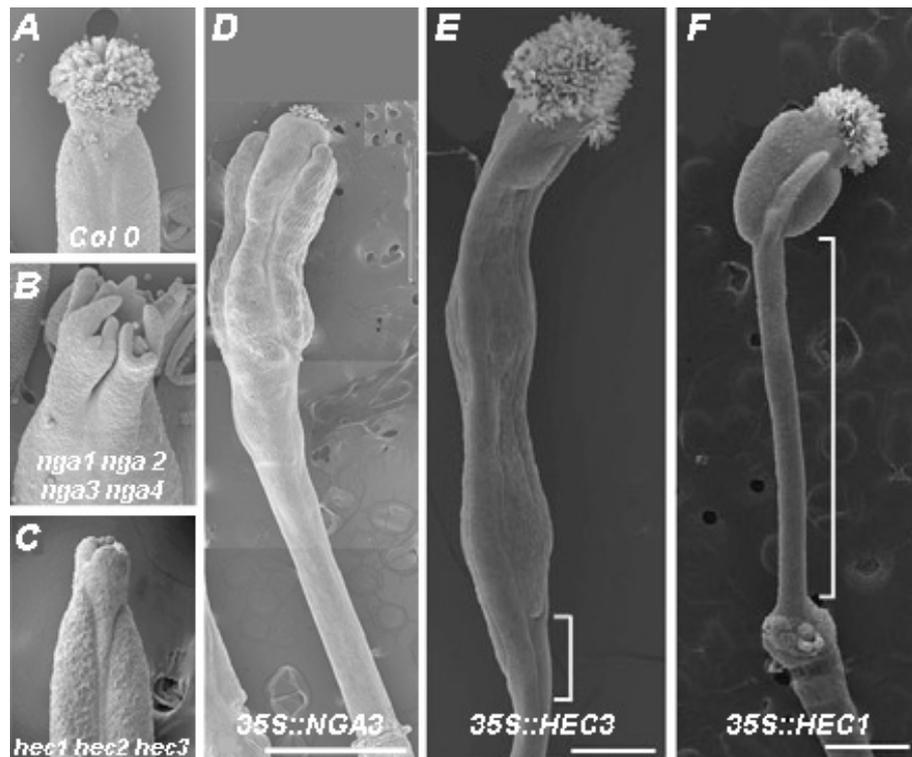
## **CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DE LA RELACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES *NGATHA* Y OTROS FACTORES bHLH IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LA PARTE APICAL DEL GINECEO DE *Arabidopsis thaliana*.**

Los genes *NGATHA* (*NGA*) son esenciales en la formación de los tejidos apicales del gineceo (Alvarez et al. 2009; Trigueros et al. 2009) y comparten parte de su función con varios factores bHLH. Entre ellos destacan los genes *HECATE* (*HEC*), que son esenciales para la formación del estigma, el septum y el tracto de transmisión (Gremski et al. 2007), pero también otros genes de la familia, como son *SPATULA* (*SPT*) e *INDEHISCENT* (*IND*) (Girin et al. 2011), todos ellos descritos previamente en la introducción.

Se ha observado que tanto los mutantes simples y dobles *nga*, como los mutantes *hec3* y *hec1 hec3* tienen reducida su fertilidad, y muestran defectos sutiles en la parte apical del gineceo. Estos defectos son muy acusados en los cuádruples mutantes *nga*, en los que desaparecen por completo el estilo y el estigma, y en el triple mutante *hec1 hec2 hec3*, que carece por completo de estigma (Fig.C2.1.A-C).

También encontramos semejanzas en las líneas de sobreexpresión de *NGA* y *HEC*. En la línea de sobreexpresión *35S::NGA3*, los frutos presentan una reducción del ovario y un alargamiento del ginóforo, con un tamaño que es aproximadamente la mitad del tamaño del fruto. Además, las valvas son más cortas, el replum es más ancho y en zig-zag, y el estilo es más redondeado y ancho (Trigueros et al. 2009). De manera similar, las líneas de sobreexpresión *35S:HEC1* y *35S:HEC3* también presentan carpelos con el estilo y el estigma aumentados, ovarios reducidos y unos ginóforos alargados (Fig.C2.1.D-F) (Gremski et al. 2007).

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral es investigar la relación funcional entre los genes *NGA* y otros factores bHLH implicados en el desarrollo de la parte apical del gineceo de *Arabidopsis thaliana*. Con este fin, y dadas las similitudes del fenotipo causado tanto por la ganancia como por la pérdida de función de los genes *NGA* y *HEC*, en primer lugar abordamos la caracterización de la relación funcional entre ellos.



**Figura C2.1: Fotografías al microscopio electrónico de barrido (SEM) de frutos de (A) Col-0 (300µm), (B) mutante *nga1 nga2 nga3 nga4* (400µm) (tomada de Trigueros et al., 2009), (C) triple mutante *hec1 hec2 hec3* (200µm) (tomada de Schuster et al., 2015), (D) *35S::NGA3* (1mm) (tomada de Trigueros et al., 2009), (E) *35S::HEC3* (400µm) (tomada de Gremski et al., 2007), (F) *35S::HEC1* (400µm) (tomada de Gremski et al., 2007).**

### 1.- Estudio de la interacción genética entre *NGA* y *HEC*.

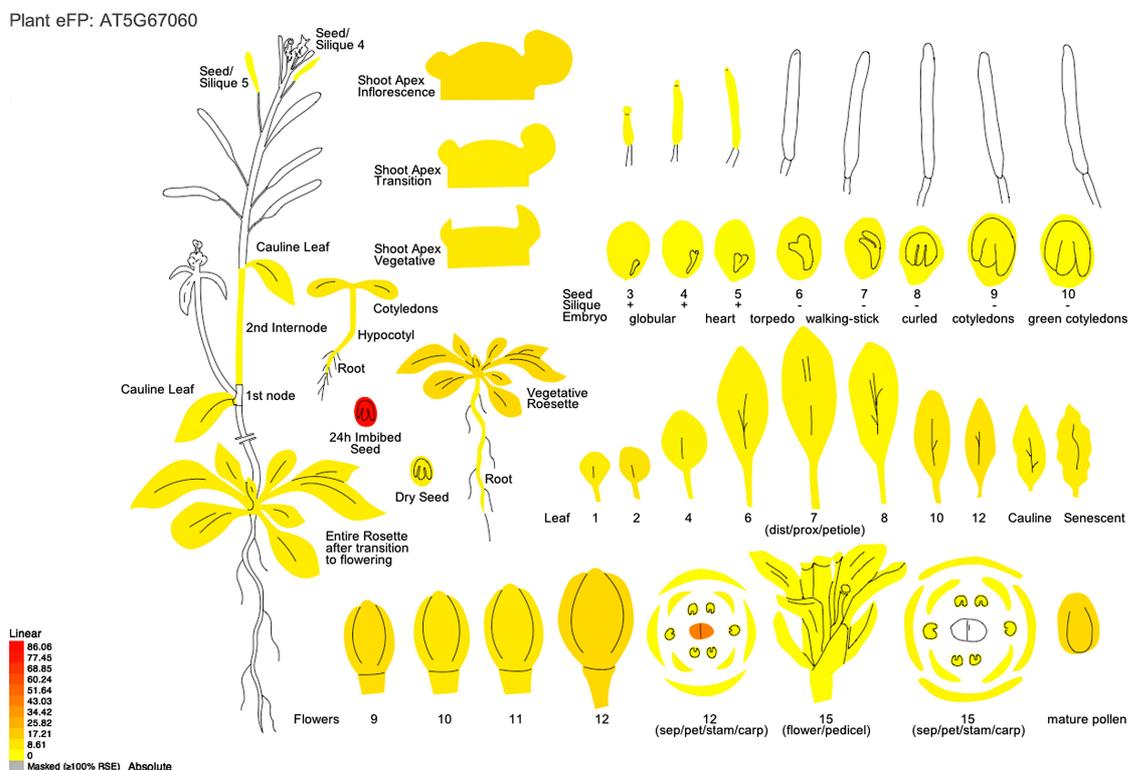
El hecho de que parte de los defectos morfológicos de los mutantes cuádruples *nga* también se observaran en los mutantes triples *hec* podría explicarse si la función *NGA* fuera necesaria para activar la expresión de *HEC*. Para confirmar o descartar esta hipótesis se analizó el patrón de expresión de los genes *HEC* en fondos con actividad *NGA* alterada y, en paralelo, se generaron plantas que sobreexpresaban *NGA3* en fondo mutante *hec*.

#### 1.1.- Análisis de la expresión de *HEC* en fondos con actividad *NGA* alterada.

Si *NGA* regulara la expresión de *HEC*, cabría esperar que ésta estuviera alterada en función de la presencia o ausencia de *NGA*. Por ello, se comparó el patrón de expresión de las líneas reporteras *HEC1p::HEC1:GUS*, *HEC2p::GUS* y *HEC3p::GUS* en fondo silvestre, *35S::NGA3* y mutantes múltiples *nga*. Las líneas reporteras *HEC1p::HEC1:GUS*, *HEC2p::GUS* y *HEC3p::GUS* utilizadas en estos ensayos son las descritas por Gremski et al. (2007). Estas líneas comprenden una región promotora de alrededor de 3000 pb antes del codón de inicio de la traducción y reproducen parcialmente el patrón espacial de expresión de los genes *HEC* determinado por hibridación *in situ* de los

correspondientes mRNAs (Gremski et al. 2007). En concreto, mientras que *HEC2p::GUS* reproduce el patrón de expresión de *HEC2* con bastante fidelidad, *HEC1p::HEC1:GUS* reproduce la expresión en estigma y septum, pero no en funículo, y *HEC3p::GUS* reproduce la expresión en funículo pero no en septum. Por tanto, tal y como se menciona en la publicación en la que se describen, es probable que no contengan todos los elementos necesarios para la regulación correcta de los genes *HEC* (al menos *HEC1* y *HEC3*), aunque sí los más relevantes para su expresión en los dominios solapantes con la expresión de los genes *NGA*, por lo que se consideró que dichas líneas eran suficientes para nuestro análisis y no se generaron líneas reporteras adicionales.

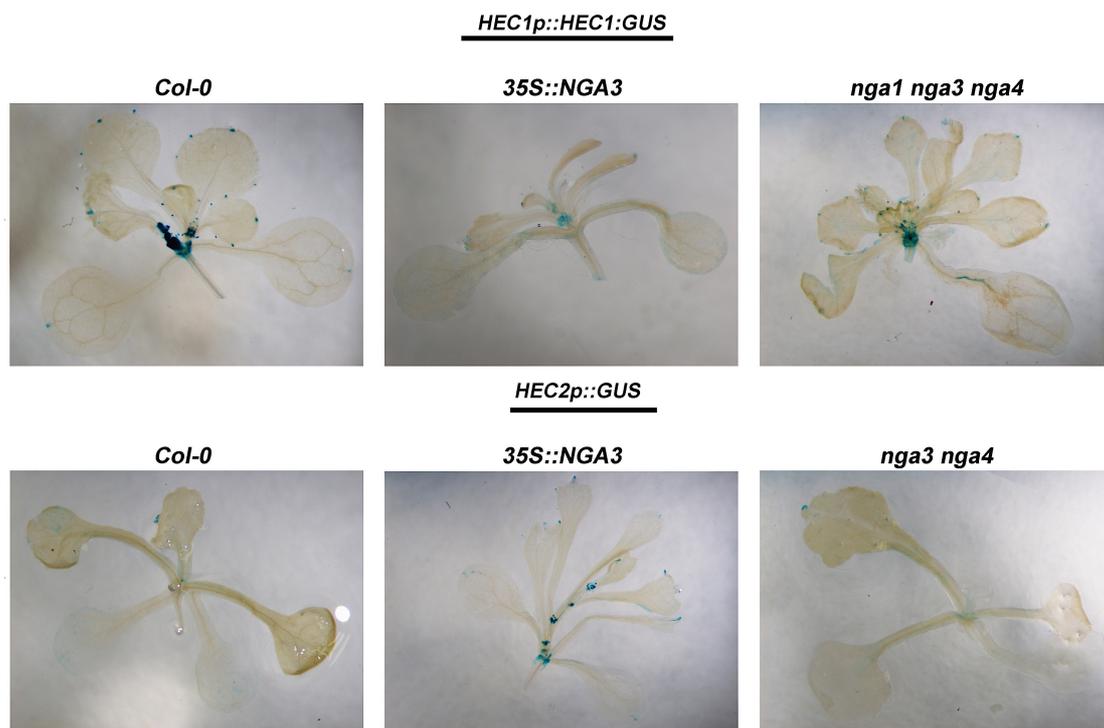
En primer lugar, y aunque en Gremski et al (2007). no se describe el patrón de expresión de *HEC* en tejidos vegetativos, en la base de datos *Bio-Array Resource* (BAR) (Schmid et al. 2005; Winter et al. 2007), que almacena datos de expresión derivados de análisis transcriptómicos con micromatrices de DNA de múltiples experimentos, se indica que *HEC1* se expresa en todos los tejidos de la planta (Fig. C2.2), y aunque la base de datos no proporciona información acerca de *HEC2* o *HEC3*, decidimos observar también el patrón de expresión de *GUS* en plantas de 13 días después de la germinación de las líneas *HEC1p::HEC1:GUS* y *HEC2p::GUS*.



**Figura C2.2: Patrón de expresión de *HEC1* descrito en la base de datos BAR, a partir de micromatrices de DNA.** El código de intensidades de color indica el nivel relativo, en escala logarítmica, de la expresión de *HEC1* a lo largo del desarrollo de diferentes órganos. Los colores cálidos indican niveles de expresión superiores a la media de todos los tejidos, mientras que los colores fríos indican niveles de expresión inferiores a la media.

## CAPÍTULO 2

En las líneas *HEC1p::HEC1:GUS* en fondo silvestre observamos que la expresión se localizaba fundamentalmente en los hidatodos del cotiledón y las hojas. En las líneas *HEC2p::GUS* en fondo silvestre el patrón de expresión era similar, aunque más débil y algo más difuso (Fig. C2.3). En las rosetas vegetativas en los fondos tanto mutantes, como de sobreexpresión de *NGA*, con ambas construcciones no se observaron cambios significativos en la distribución espacial de la expresión.

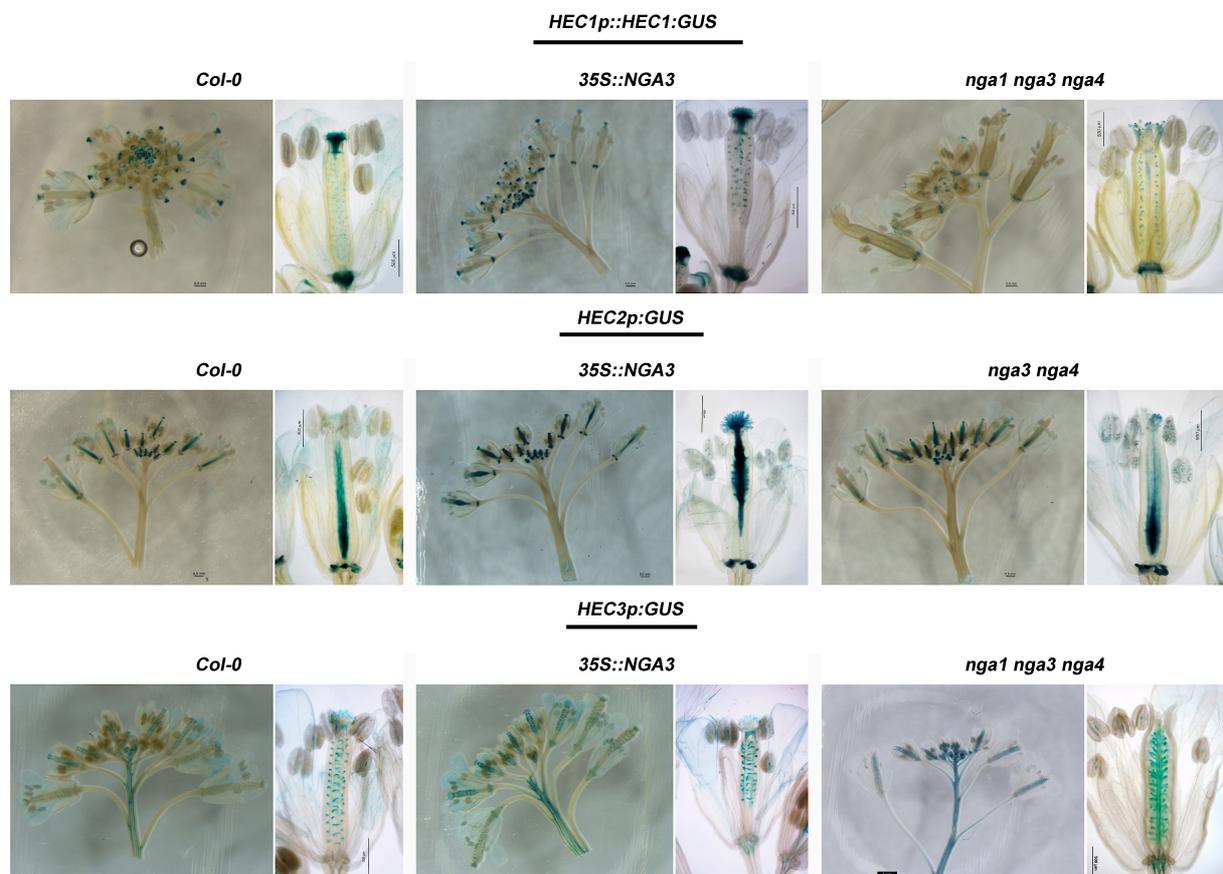


**Figura C2.3:** Comparación del patrón de expresión de *HEC1p::HEC1:GUS* y *HEC2p::GUS* en fondo silvestre, *35S::NGA3* y mutante *nga* en plántas de 13 días después de la germinación. En todos los casos, el transgén reportero está en heterocigosis.

En inflorescencias observamos que la señal se detectaba en flores de todos los estadios de desarrollo. En flores en anthesis, la expresión de *HEC1p::HEC1:GUS* en fondo silvestre se observó en la zona apical del gineceo, en concreto en el estigma y en el tracto de transmisión que ocupa la parte central del estilo, en los óvulos, y en la parte basal del gineceo, en la zona de unión de éste y el receptáculo de la flor (Fig. C2.4). La señal observada en *HEC2p::GUS* se detectó principalmente en el estigma, en el tracto de transmisión que transcurre a lo largo de toda la parte central del ovario y, al igual que para *HEC1*, en la base de la flor (Fig. C2.4). En la línea *HEC3p::GUS* en fondo silvestre se observó señal en el estigma, en la ramificación de los haces vasculares del estilo, los funículos de los óvulos y el centro de las anteras (Fig. C2.4).

Cuando se detectó la actividad GUS conferida por estas construcciones tanto en fondos mutantes como de sobreexpresión de *NGA* no se observaron cambios significativos en su

distribución espacial: tanto en inflorescencias como en flor en antesis, el patrón de expresión de los genes *HEC* era similar en fondos silvestres, *35S::NGA3* y mutantes *nga*. Las únicas diferencias evidentes se observaban en la zona apical de los gineceos de los mutantes *nga*, donde la expresión de los tres genes *HEC* (especialmente *HEC1* y *HEC3*) estaba muy reducida, quizás debido a que en estos mutantes no se desarrolla ni el el estilo y ni el estigma. Por otro lado, aunque no observamos otros cambios significativos en el patrón espacial de expresión de los tres genes *HEC*, en todos los casos la intensidad de la señal GUS era mucho menor en fondos mutantes *nga* y mayor en fondo *35S::NGA3* en comparación con el fondo silvestre (Fig. C2.4).

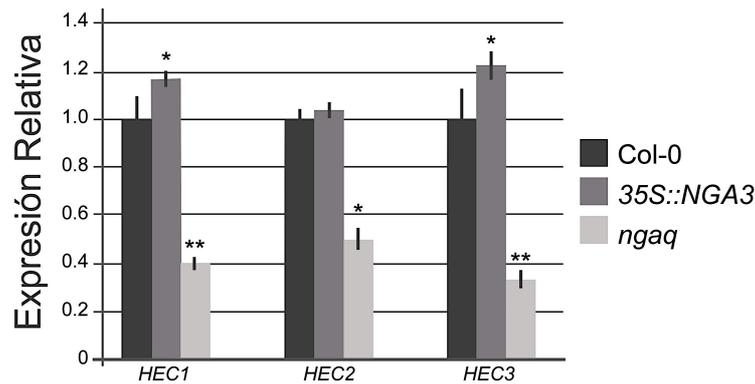


**Figura C2.4:** Comparación del patrón de expresión de *HEC1p::HEC1:GUS*, *HEC2p::GUS* y *HEC3p::GUS* en fondo silvestre, *35S::NGA3* y mutantes *nga*; en inflorescencia y flor en antesis. En todos los casos, el transgén reportero está en heterocigosis.

El hecho de que la expresión espacial de los genes *HEC* no cambiara significativamente en las líneas *35S::NGA3* parecía estar en contra de la hipótesis de que el fenotipo de sobreexpresión de *NGA3* pudiera estar mediado por la expresión ectópica de *HEC*. Sin embargo, la variación en la intensidad de la señal sugería que los genes *NGA* son necesarios para mantener los niveles de expresión de *HEC*, aunque no tanto para establecer su patrón de expresión espacial. Para confirmar esta hipótesis, determinamos

los niveles de expresión de *HEC1*, *HEC2* y *HEC3* en inflorescencias de plantas Col-0, *35S::NGA3* y el cuádruple mutante *nga*.

Tal y como se observa en la figura C2.5, la expresión de los genes *HEC* se encontraba alterada en los diferentes fondos *NGA*: en el cuadrúple mutante *nga* los niveles de *HEC* se reducían en torno a un 60%, mientras que en el fondo de sobreexpresión de *NGA3* los niveles de *HEC1* y *HEC3* se encontraban aumentados en torno a un 20%.

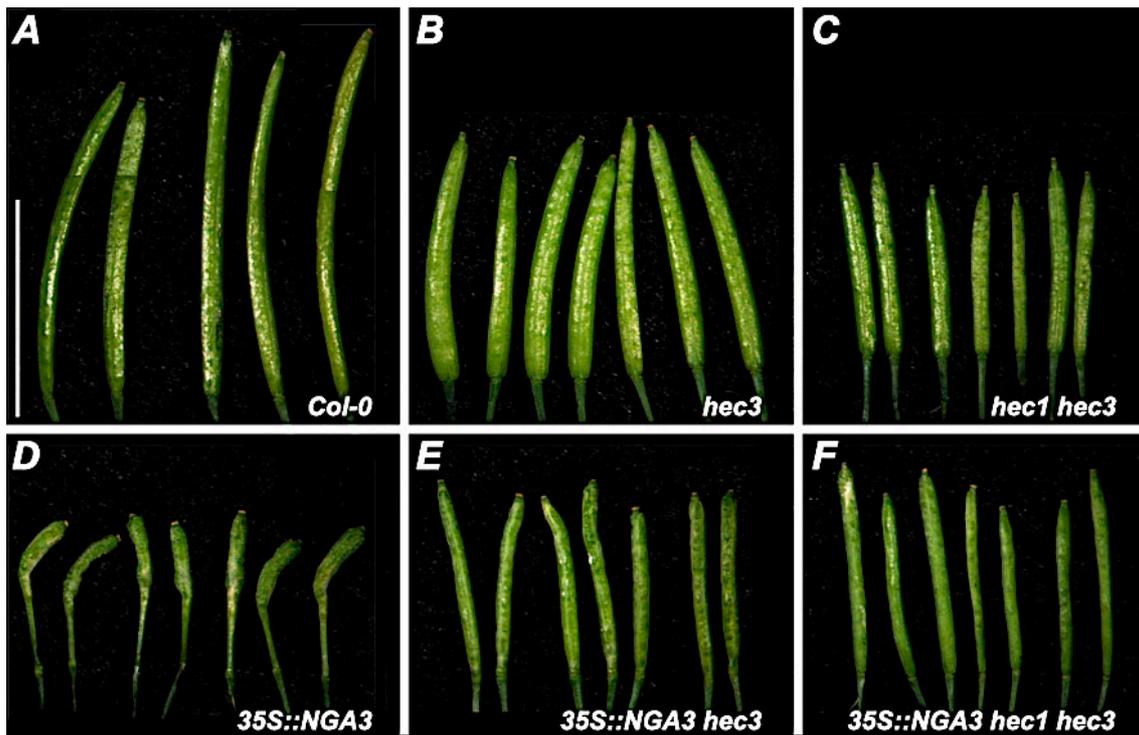


**Figura C2.5: Nivel de expresión de *HEC1*, *HEC2* y *HEC3* en inflorescencias Col-0, *35S::NGA3* y cuádruple mutante *nga*.** Los niveles relativos de expresión de *HEC1*, *HEC2* y *HEC3* se determinaron mediante RT-qPCR, utilizando *TIP-41* como gen constitutivo de referencia. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar y se han normalizado frente al valor obtenido en Col-0. \*P<0,05; \*\*P<0,01.

### 1.2.- Caracterización fenotípica de las plantas *35S::NGA3 hec3* y *35S::NGA3 hec1 hec3*.

Si el fenotipo de sobreexpresión de *NGA3* estuviera mediado, al menos en parte, por la activación de la expresión de *HEC*, dicho fenotipo debería atenuarse en fondos mutantes *hec*. Puesto que no disponíamos de alelos mutantes *hec2*, se generaron las combinaciones *35S::NGA3 hec3* y *35S::NGA3 hec1 hec3*. Se estudiaron únicamente estas combinaciones porque las plantas mutantes *hec1* no muestran alteraciones evidentes en el desarrollo de los frutos, mientras que, en cambio, las plantas mutantes *hec3* sí presentan una reducción de la fertilidad, aún más acusada en el doble mutante *hec1 hec3*, que únicamente produce un 17% de semillas de las producidas por el silvestre. Además de la reducción en el número de semillas, los frutos de los mutantes *hec1 hec3* tienen una distribución de semillas sesgada hacia la mitad apical del carpelo y una longitud significativamente menor que la de los frutos silvestres (Gremski et al. 2007).

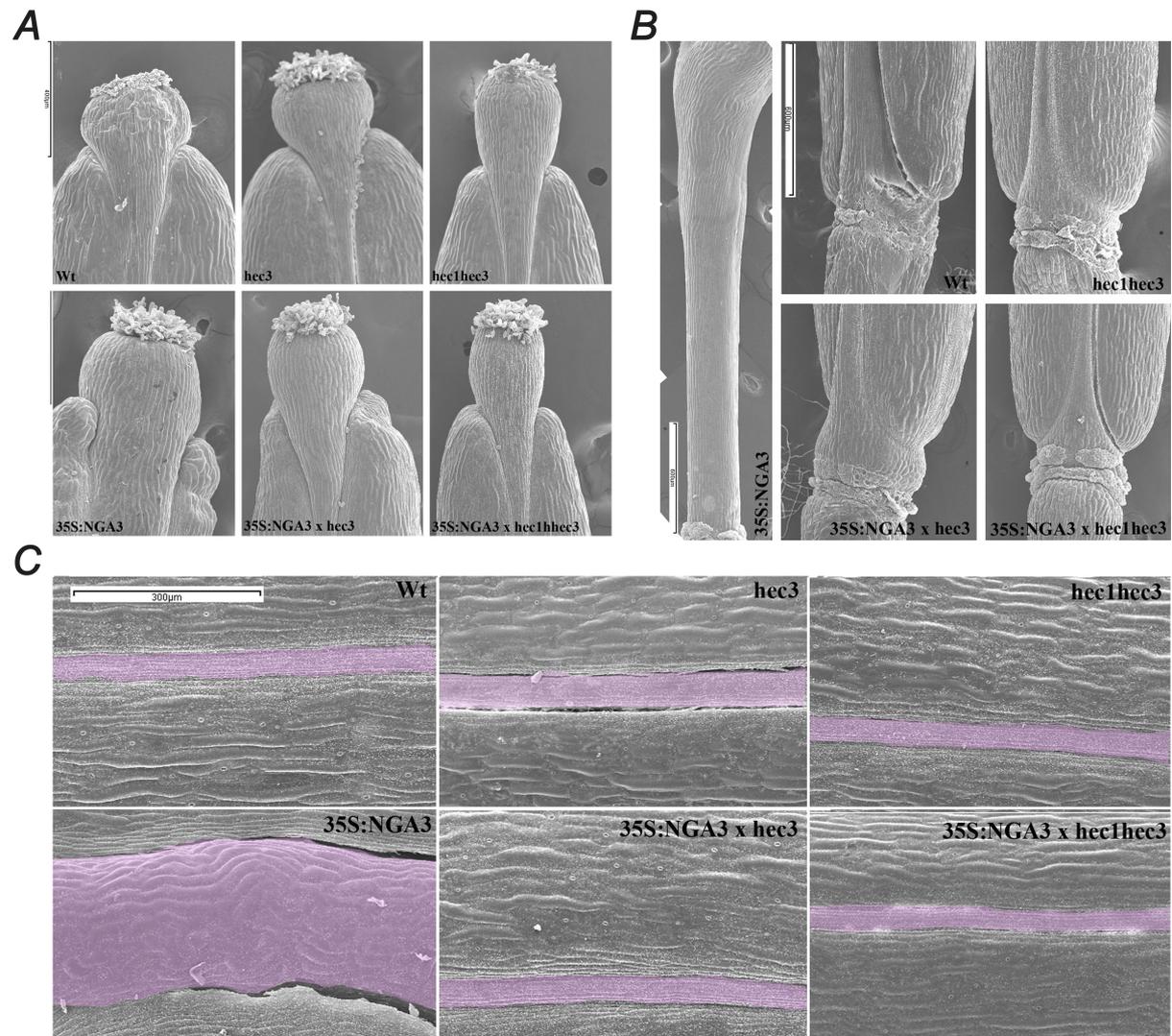
Puesto que el fenotipo causado por alteraciones en la función de *NGA* o *HEC* es muy evidente durante el desarrollo del fruto, en primer lugar comparamos la morfología de los frutos de los parentales y de las combinaciones generadas (Fig. C2.6).



**Figura C2.6: Fenotipos de sobreexpresión de *NGA3* en fondo *hec3* y *hec1 hec3*.** Fotos a la lupa de frutos totalmente elongados de (A) *Col-0*, (B) *hec3*, (C) *hec1 hec3*, (D) *35S::NGA3*, (E) *35S::NGA3 hec3* y (F) *35S::NGA3 hec1 hec3*. La barra blanca equivale a 1 cm y todos los paneles están a la misma escala.

Los frutos de la línea silvestre eran alargados, siendo su media de longitud de 16 mm, aplanados y con un ginóforo corto que medía menos de 1 mm de longitud (Fig.C2.6.A). En la línea *35S::NGA3*, los frutos presentaban un tamaño muy reducido respecto al silvestre, con una media de longitud de 8 mm. Además, la mayor parte de su longitud la ocupaba el ginóforo, que medía en torno a 4 ó 5 mm, quedando muy reducido el tamaño del ovario (Fig.C2.6.D). Los frutos de los mutantes *hec3* eran alargados, pero no tanto como los frutos silvestres, siendo la media de longitud de 12 mm. El ovario no era tan aplanado como el silvestre y aparecía más ancho; el ginóforo era similar al del silvestre, midiendo menos de 1 mm (Fig.C2.6.B). Los frutos de los dobles mutantes *hec1 hec3*, al igual que los mutantes *hec3*, también eran alargados, aunque más pequeños, siendo su media de longitud de 9 mm, de forma más abombada y con un ginóforo similar al del silvestre (Fig.C2.6.C). En la línea *35S::NGA3 hec3* los frutos eran más similares a los del parental *hec3* que a los de *35S::NGA3*, teniendo una forma alargada, con una longitud en torno a 10 mm, la parte apical algo deformada y ligeramente curvada hacia un lado, y un ginóforo más largo que en el silvestre pero mucho menos que en las líneas *35S::NGA3* (Fig.C2.6.E, A, B, D). Por último, la línea *35S::NGA3 hec1 hec3* presentaba frutos alargados a simple vista indistinguibles de los de los mutantes *hec1 hec3*, medían también en torno a 10 mm, los ovarios eran estrechos y lisos, su parte apical no

presentaba ninguna deformidad, y además tenían ginóforos reducidos (Fig.C2.6.D, A, C, D).



**Figura C2.7: Detalle de los defectos observados en los frutos Col-0, *hec3*, *hec1 hec3*, *35S::NGA3*, *35S::NGA3 hec3* y *35S::NGA3 hec1 hec3*. Fotografía al microscopio electrónico de barrido del (A) estigma y estilo (B) ginóforo y (C) el replum (coloreado en rosa).**

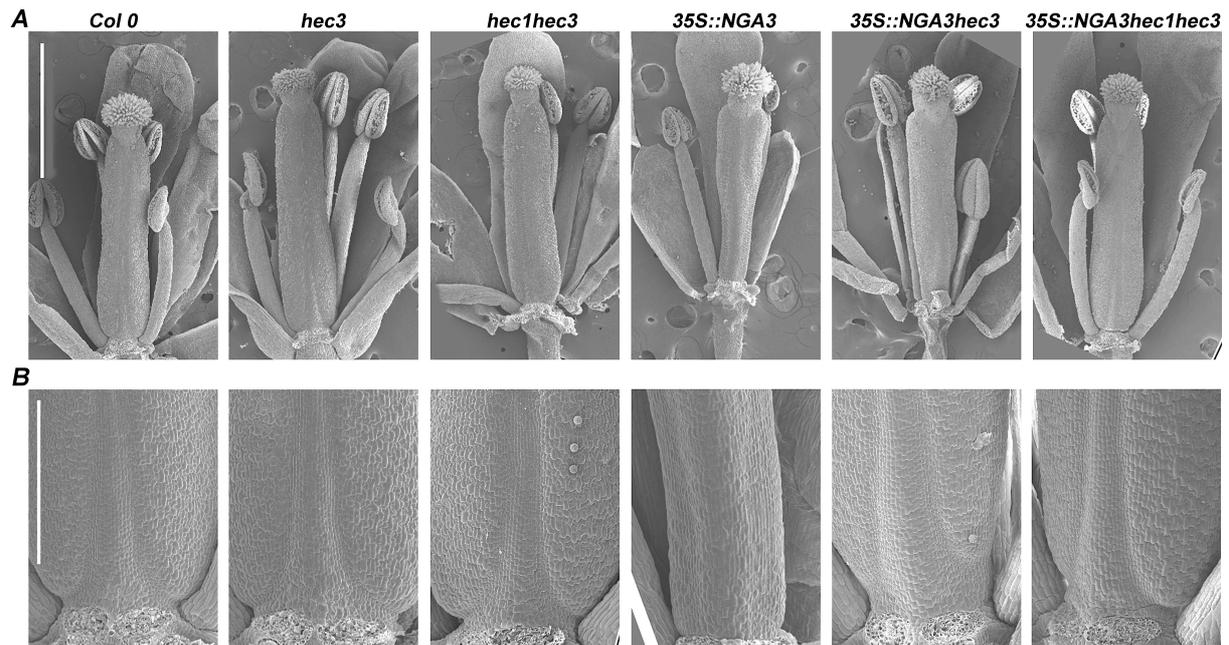
A continuación, empleamos la microscopía electrónica de barrido para analizar con detalle las diferencias morfológicas entre frutos maduros de los distintos genotipos. No se observaron diferencias en los tipos celulares presentes en las zonas apicales del fruto (estilo y estigma) cuando se compararon las líneas parentales *35S::NGA3*, *hec3* y *hec1 hec3* con el silvestre. Sin embargo, sí que se observaron diferencias en la morfología de los distintos dominios que conformaban. Así, el estilo de los frutos de la línea de sobreexpresión de *NGA3* era de mayor tamaño y de forma más redondeada que el estilo del silvestre, y además la demarcación entre estilo y replum estaba menos definida que en el silvestre (Fig. C2. 7.A). En la línea mutante *hec3*, el estilo no difería significativamente del silvestre, pero en el caso del doble mutante *hec1 hec3* el estilo era

más alargado y el estigma estaba ligeramente reducido. En cuanto a las combinaciones generadas, el ápice de los frutos de la línea *35S::NGA3 hec3* presentaba un fenotipo intermedio entre el de los parentales: el estilo era redondeado y ligeramente más grande que el del mutante *hec3* y la zona de unión entre el estilo y el replum era más alargada y ancha, aunque no tanto como en la línea *35S::NGA3*. Por último, el estilo de los frutos *35S::NGA3 hec1 hec3* era similar al del doble mutante *hec1 hec3*: alargado, con la zona de unión entre el estilo y el replum bien definida y con un estigma reducido, al igual que en el mutante *hec1 hec3*.

En la zona media del ovario, el replum de los frutos de las plantas silvestres es estrecho y consta de células estrechas y alargadas orientadas paralelamente al eje longitudinal del fruto. En las líneas *35S::NGA3* el replum aparecía muy ancho y contenía más capas de células gruesas y alargadas que se disponían en zig-zag, (Fig. C2.7 C). El replum de los frutos de la línea mutante *hec3* o del doble mutante *hec1 hec3* era similar al de las líneas silvestres, estrecho y con células alargadas. Los replum de los frutos *35S::NGA3 hec3* y *35S::NGA3 hec1 hec3* eran, en ambos casos, estrechos y con células estrechas y alargadas, no presentando diferencias respecto a los replum de la línea silvestre o de los mutantes *hec3* o *hec1 hec3*.

El ginóforo de los frutos de la línea *35S::NGA3*, tal y como se ha mencionado antes, ocupaba prácticamente el 50% de su longitud, y a diferencia del silvestre, que presenta células redondeadas, desarrollaba células muy alargadas. En los frutos de los mutantes *hec3* y dobles mutantes *hec1 hec3* los ginóforos no se diferenciaban del silvestre, presentando células redondeadas y de menor tamaño que en los frutos *35S::NGA3* (Fig. C2.7 B). Como ya se había observado al comparar los frutos de los distintos genotipos en la lupa, el tamaño de los ginóforos de los frutos *35S::NGA3 hec3* era ligeramente mayor y sus células algo más alargadas que en los silvestres pero mucho más cortos que en los frutos *35S::NGA3*. Por último, en los frutos *35S::NGA3 hec1 hec3* el ginóforo no mostraba diferencias respecto al de la línea silvestre.

Dado que todos los tejidos que están presentes en un fruto desarrollado están ya definidos en el estadio de antesis, decidimos comprobar si las alteraciones observadas en la morfología de los frutos eran ya apreciables en este estadio o dependían del desarrollo post-fertilización del fruto. Para ello, del mismo modo que con los frutos, observamos gineceos en antesis en el microscopio electrónico de barrido. En general, las mismas observaciones que para los frutos maduros se aprecian en este estadio (Fig. C2.8.A).



**Figura C2.8: Detalle de los defectos observados en flores en antesis de *hec3*, *hec1 hec3*, *35S::NGA3*, *35S::NGA3 hec3* y *35S::NGA3 hec1 hec3*.** Fotografía al microscopio electrónico de barrido de **(A)** flores en antesis de *Col-0*, *hec3*, *hec1 hec3*, *35S::NGA3*, *35S::NGA3 hec3* y *35S::NGA3 hec1 hec3* (barra=1mm). **(B)** los tipos celulares presentes en los ginóforos de *Col-0*, *hec3*, *hec1 hec3*, *35S::NGA3*, *35S::NGA3 hec3* y *35S::NGA3 hec1 hec3* (barra=300μm).

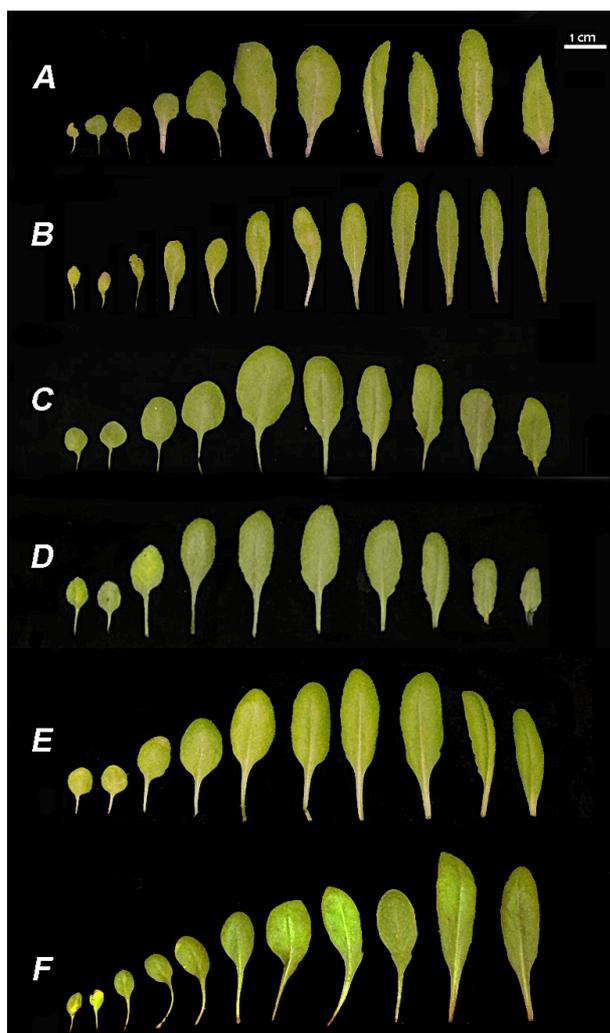
En particular, el ginóforo de los gineceos *35S::NGA3* ya era muy alargado en el estadio de antesis, estando compuesto de células alargadas y presentando estomas. En los mutantes *hec3* y dobles mutantes *hec1 hec3*, los ginóforos no se diferenciaban del silvestre, y por tanto, presentaban células más redondeadas y de menor tamaño que en *35S::NGA3*. El tamaño del ginóforo en *35S::NGA3 hec3* era mayor y con células ligeramente más alargadas que en el caso del silvestre, pero mucho menor que en los gineceos *35S::NGA3*. Por último, en los gineceos *35S::NGA3 hec1 hec3*, el ginóforo no mostraba diferencias respecto al de la línea silvestre o al de *hec1 hec3* (Fig. C2.8 B).

La caracterización morfológica de los gineceos y frutos *35S::NGA3 hec3* y *35S::NGA3 hec1 hec3* nos permite concluir que las mutaciones *hec* suprimen el efecto de la sobreexpresión de *NGA3* en el desarrollo de estos órganos, es decir, que las alteraciones en el desarrollo del gineceo y el fruto producidas por la sobreexpresión de *NGA3* dependen de la presencia de la función HEC, principalmente HEC3.

Como ya se ha descrito, además de su función en la morfogénesis del gineceo, los genes *NGA* tienen un papel importante en la formación de las hojas, y sus mutaciones afectan a la morfología de éstas. Por otro lado, aunque no se ha descrito que los genes *HEC* participen en el desarrollo de las hojas, sí que se expresan en éstas, tal y como hemos descrito previamente (Fig. C2.2 y C2.3). Por ello, y dado que las hojas de la líneas *35S::NGA3* presentaban una morfología característica y muy distinta a la de las plantas

silvestres (Trigueros et al. 2009), incluimos en esta caracterización fenotípica el estudio de la morfología de las hojas de roseta de las combinaciones *35S::NGA3 hec3* y *35S::NGA3 hec1 hec3*.

Las hojas de roseta de la línea *35S::NGA3* (Fig.C2.9.B) eran más pequeñas, estrechas y alargadas que las del ecotipo silvestre (Fig.C2.9. A) y en ocasiones estaban curvadas, presentando además un margen de hoja muy liso y poca diferenciación entre el peciolo y la lámina, mientras que las hojas de los mutantes *hec3* y *hec1 hec3* (Fig.C2.9. C, E) eran más redondeadas y similares a las silvestres. Las hojas de roseta de las plantas *35S::NGA3 hec3* y *35S::NGA3 hec1 hec3* (Fig.C2.9. D, F) presentaban hojas más redondeadas que las *35S::NGA3*, con un peciolo bien definido y margen ligeramente aserrado, similares a las silvestres o las de mutantes *hec3* y *hec1 hec3* por lo que es posible concluir que las mutaciones *hec1 hec3* suprimen el fenotipo de sobreexpresión de *NGA3* también en el desarrollo de la hoja.



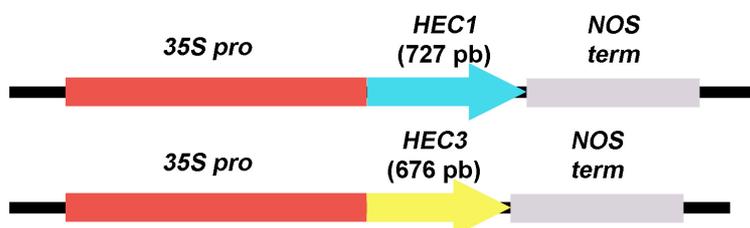
**Figura C2.9: Morfología de las hojas de la roseta de la línea *35S::NGA3* en fondo *hec3* y *hec1hec3*.** Fotografía a bajo aumento de las hojas de la roseta de una planta individual de 22 días puestas en orden de las líneas: **(A)** Col-0, **(B)** *35S::NGA3*, **(C)** *hec3*, **(D)** *35S::NGA3hec3*, **(E)** *hec1hec3* y **(F)** *35S::NGA3hec1hec3*.

Con todos estos resultados podemos concluir que el fenotipo de *35S::NGA3* se suprime parcialmente en el fondo mutante *hec3* y prácticamente por completo en el fondo mutante *hec1 hec3*. Estos resultados indican que el fenotipo de sobreexpresión de *NGA3* depende de la presencia de *HEC* y es compatible con la hipótesis de que los factores *NGA* regulen positivamente a los genes *HEC*. Sin embargo, los estudios de expresión de *HEC* en fondos de ganancia o pérdida de función *NGA*, en los que mostramos que la sobreexpresión de *NGA3* no activaba de manera generalizada y ectópica la expresión de los genes *HEC*, sino que tan solo parecía afectar moderadamente a sus niveles, parecían estar en desacuerdo con la misma, aunque cabía la posibilidad de que el efecto cuantitativo sobre la expresión de *HEC* fuera suficiente para producir, al menos en parte, los efectos fenotípicos derivados de la sobreexpresión de *NGA3*.

Para resolver esta aparente paradoja y evaluar la posible relevancia de los niveles de expresión de *HEC* en el fenotipo producido por la ganancia o pérdida de función de *NGA*, decidimos comprobar el efecto de la sobreexpresión de *HEC* en un fondo mutante *nga*. En el caso de que la regulación de los niveles de *HEC* por *NGA* fuera relevante, el fenotipo de sobreexpresión de *HEC* no debería verse alterado significativamente por la pérdida de función de *NGA*.

### 1.3.-Generación de combinaciones genéticas entre *35S::HEC* y los mutantes *nga*.

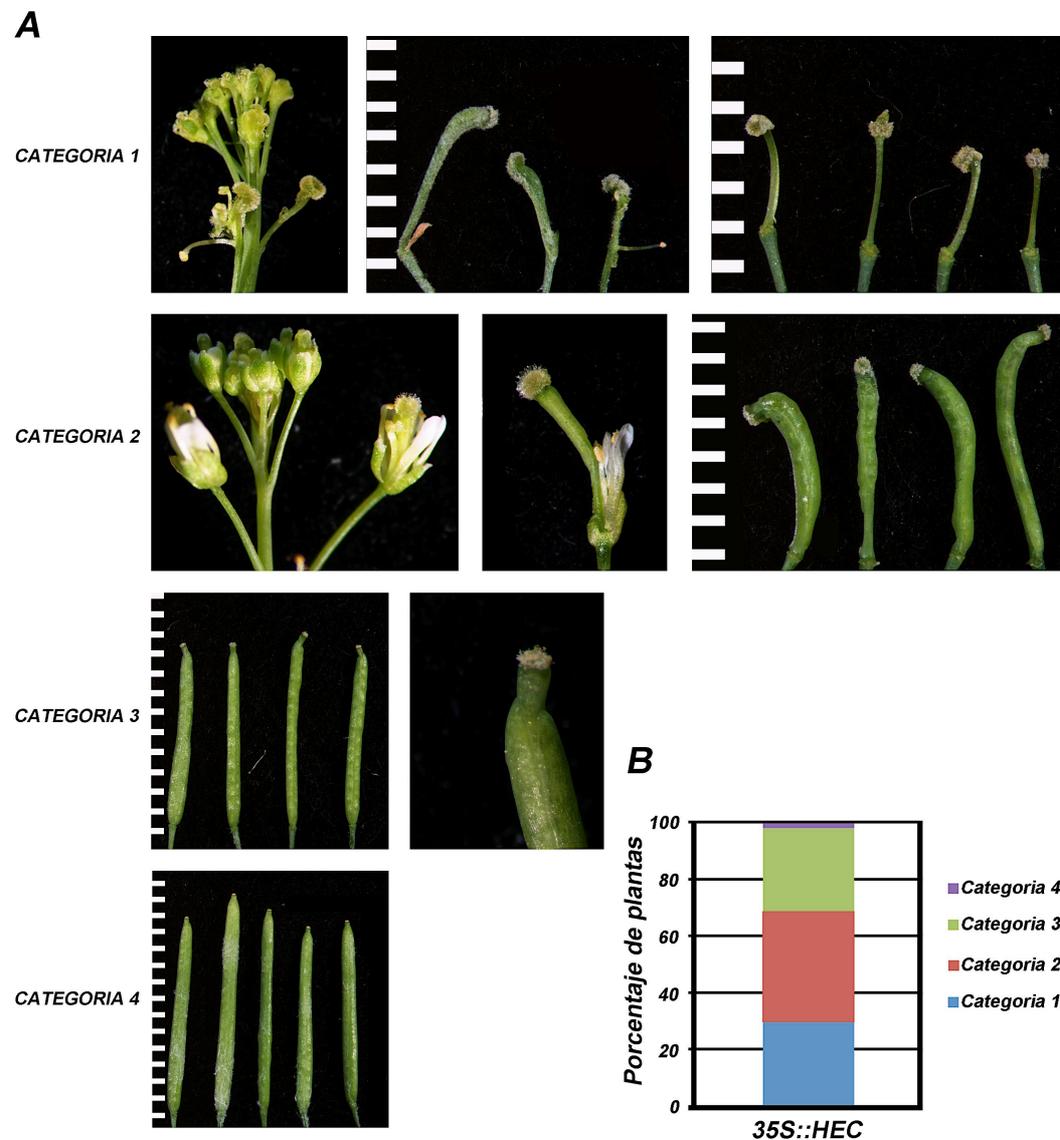
Ya que no disponíamos de las líneas de sobreexpresión de *HEC* y que los defectos descritos en la literatura indicaban que tenían una fertilidad muy reducida (Gremski et al. 2007), se generaron líneas de sobreexpresión de *HEC1* y *HEC3* (Fig. C2.10) y se transformaron en paralelo plantas silvestres y *nga2 nga3 nga4* para comparar el efecto de la sobreexpresión de *HEC* en transformantes primarias en los dos fondos .



**Figura C2.10: Esquema de la construcción utilizada para generar plantas transgénicas de *Arabidopsis* con la sobreexpresión de los genes *HEC1* y *HEC3*.** Se representa el promotor *35S* (en rojo), la secuencia codificante de *HEC1* y *HEC3* (en azul turquesa y amarillo respectivamente) y el terminador del gen *NOS* (en gris).

Se obtuvieron 54 líneas transgénicas primarias para *35S::HEC1* y 67 líneas transgénicas para *35S::HEC3*. Estas líneas transgénicas (121 en total) mostraron unos fenotipos

similares independientemente de la construcción utilizada, por lo que realizamos un análisis de categorías fenotípicas conjunto (Fig. C2.11. A y B).



**Figura C2.11: Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de HECATE. (A)** Fotografías a la lupa de inflorescencias y frutos de líneas transgénicas *35S::HEC1* y *35S::HEC3* agrupadas en las diferentes categorías (las unidades de la regla son mm). **(B)** Representación del porcentaje de plantas obtenido en cada categoría fenotípica encontrada en las líneas *35S::HEC*.

La categoría 1, la de fenotipo más severo, comprendía aproximadamente el 30% de las líneas. En las plantas de este grupo las flores apenas se desarrollaban y los frutos presentaban un fenotipo similar a los mutantes *pin* o *ett* (Sessions and Zambryski 1995), con ovarios reducidos o inexistentes, parte apical hiperdesarrollada con proliferación de tejido estigmático y ginóforos largos (Fig. C2.11.A).

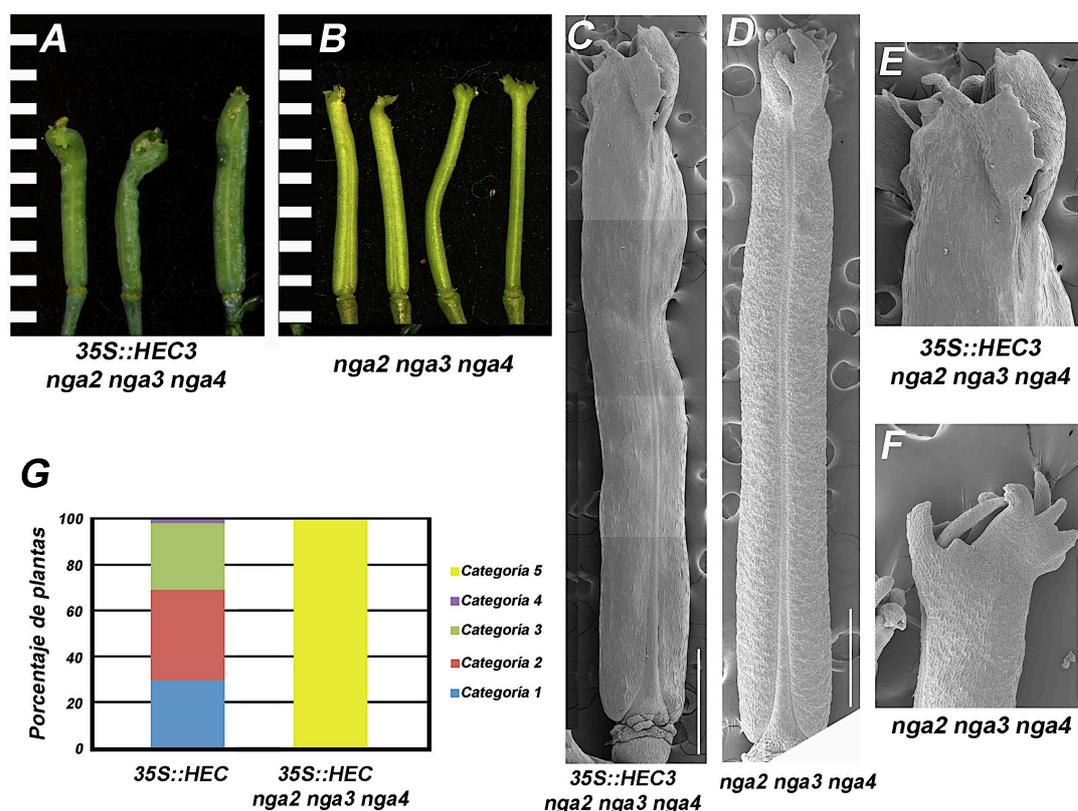
Las plantas pertenecientes a la categoría 2 (un 38%) presentaban frutos pequeños con mayor cantidad de tejido estigmático, y desarrollo de tejido típico de margen de valva en

posiciones ectópicas dentro de la valva, y también frutos con el ginóforo algo alargado (Fig. C2.11.A).

La categoría 3 tenía frutos con defectos sutiles en la parte apical, más estrechos en esta zona y con el estilo inclinado, y un tamaño del fruto ligeramente menor que el de los frutos Col-0. El 30% de las plantas presentaban este fenotipo (Fig. C2.11.A).

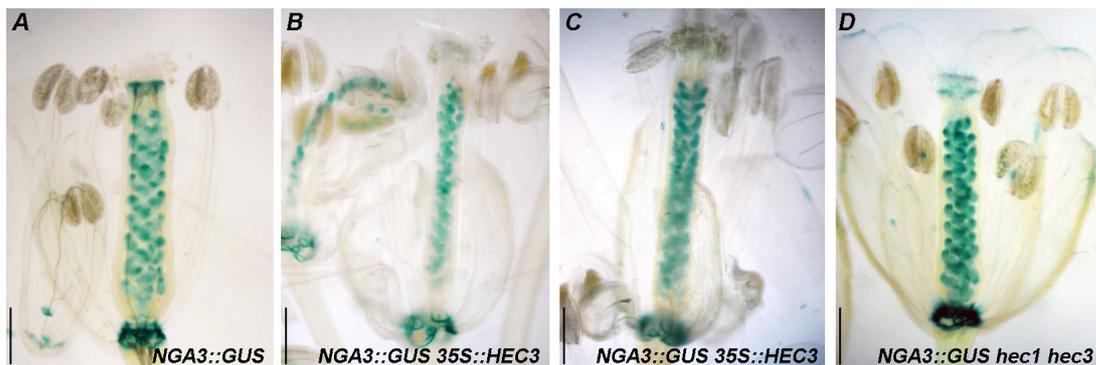
El 2% de las plantas presentaban un fenotipo similar al silvestre y se incluyeron en la categoría 4 (Fig. C2.11.A).

Para sobreexpresar *HEC* en fondo mutante *nga* transformamos triples mutantes *nga2 nga3 nga4*, ya que presentan defectos en el desarrollo del gineceo muy similares a los del cuádruple mutante pero, a diferencia de éstos, que son completamente infértiles, son capaces de producir un número pequeño de semillas. En este caso, obtuvimos 39 líneas transgénicas para *35S::HEC1* y 26 líneas transgénicas para *35S::HEC3*. Estas líneas transgénicas (65 en total) mostraron un fenotipo similar al del mutante triple *nga*, con una parte apical del fruto muy afectada, sin desarrollo de estilo y estigma, y unos frutos de pequeño tamaño. En ningún caso se observaron los efectos fenotípicos característicos de la sobreexpresión de *HEC* en fondo silvestre (Fig.C2.12).



**Figura C2.12: Caracterización fenotípica de las líneas *35S::HEC3 nga2 nga3 nga4*.** Fotografía a la lupa de frutos totalmente elongados (A) *35S::HEC3 nga2 nga3 nga4* (B) *nga2 nga3 nga4*. (Las unidades de la regla son mm). Fotografías al microscopio electrónico de barrido de: un fruto (C) *35S::HEC3 nga2 nga3 nga4* (D) *nga2 nga3 nga4*; la zona apical del fruto (E) *35S::HEC3 nga2 nga3 nga4* (F) *nga2 nga3 nga4*. Se observa que la zona apical del estilo presenta defectos en la fusión además de una pérdida total del tejido estigmático. (G) Representación del porcentaje de plantas obtenidas en cada categoría fenotípica encontrada en las líneas *35S::HEC* y *35S::HEC nga2 nga3 nga4*.

Para comprobar si la expresión de los genes *NGA* podía estar regulada por los genes *HEC*, introdujimos la construcción reportera *NGA3::GUS* (Trigueros et al. 2009) en fondos con la actividad *HEC* alterada (Fig. C2.13). En este caso se observó que el patrón de expresión de *NGA3* en fondos *35S::HEC3* y *hec1 hec3* no cambiaba significativamente respecto al patrón silvestre, detectándose señal en la parte apical de los gineceos y en los óvulos y en la base de las flores en antesis. Así, los resultados de este experimento parecían indicar que *NGA3* (y posiblemente el resto de los genes *NGA*, que comparten patrones de expresión muy similares) no estaría regulado por *HEC*.



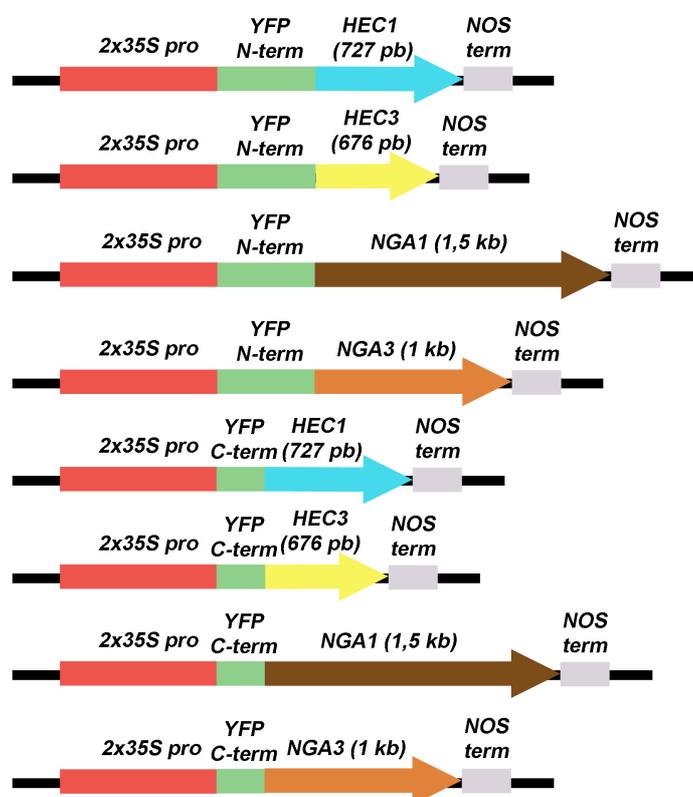
**Figura C2.13: Patrón de expresión de *NGA3* en fondo *Col-0*, *35S::HEC3* y *hec1 hec3*.** Detección histoquímica de la actividad *GUS* dirigida por el promotor de *NGA3* en gineceos en estadio 14 de (A) plantas silvestres, (B) y (C) plantas pertenecientes a la categoría fenotípica 2 de *35S::HEC3* que presentan un estilo y estigma algo más engrosados, un ginóforo ligeramente más alargado que las flores *Col-0*, así como un crecimiento reducido y en algunos casos amorfo de los sépalos; y (D) *hec1 hec3*. En todos los casos la señal se detecta en óvulos y la parte apical del gineceo.

De estos dos últimos experimentos podemos concluir que la actividad de *HEC* parece requerir de la presencia de *NGA*, aunque *HEC* no regule a los genes *NGA* transcripcionalmente, con lo que tendríamos una situación análoga a la observada en el estudio de la actividad de *NGA* y su relación con los genes *HEC*.

#### 1.4.- Posibles mecanismos alternativos de interacción entre *NGA* y *HEC*.

En conjunto, todos los resultados mostrados hasta el momento indicaban que podíamos descartar la hipótesis inicial de que la interacción entre *NGA* y *HEC* se diera dentro de una ruta jerárquica de regulación transcripcional, más bien indicando que probablemente ambos factores se necesitaran conjuntamente para realizar sus funciones. La hipótesis más sencilla que podría explicar este mecanismo sería que *HEC* y *NGA* fueran capaces de interactuar físicamente para realizar una actividad conjunta en forma de complejo proteico.

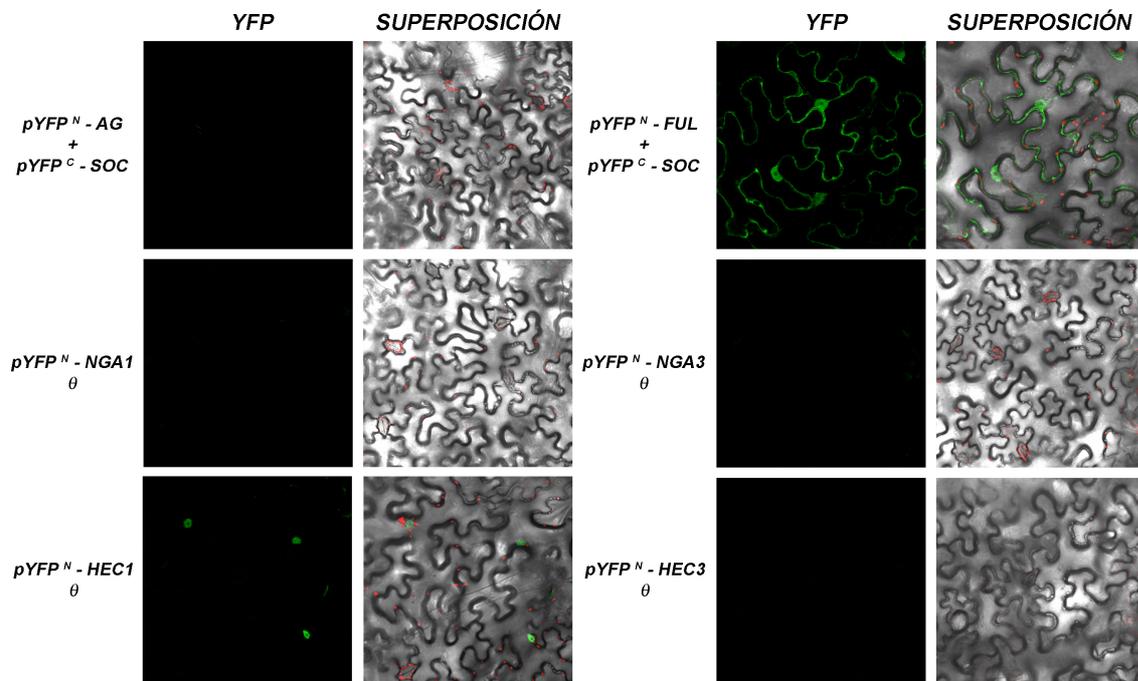
Así, en primer lugar testamos si ambas proteínas eran capaces de interactuar. Se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína *in vivo* mediante complementación fluorescente bimolecular (BiFC). Para este ensayo se clonaron las regiones codificantes completas de los genes *HEC* y *NGA* para generar una fusión traduccional en la región C-terminal de cada mitad de la proteína YFP (Belda-Palazon et al. 2012). (Fig. C2.14). Para mantener el número de ensayos en una dimensión manejable decidimos incluir sólo los genes *HEC1* y *HEC3*, los mismos utilizados en los ensayos genéticos, y *NGA1* y *NGA3*, como representantes de cada una de las dos parejas de genes que conforman la subfamilia *NGA* en *Arabidopsis*, porque sus mutaciones de pérdida de función causan los efectos fenotípicos más severos (Alvarez et al. 2009; Trigueros et al. 2009).



**Fig C2.14: Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar la interacción de la proteínas NGA1, NGA3, HEC1 y HEC3 mediante ensayos de BiFC.** En las construcciones se fusionaron las regiones codificantes de *NGA1*, *NGA3*, *HEC1* y *HEC3* a los dominios C-terminal y N-terminal de la proteína YFP. Se representa el promotor 35S (en rojo), los dominios C-terminal y N-terminal de la proteína YFP (en verde claro), las CDSs de los genes *NGA1*, *NGA3*, *HEC1* y *HEC3* (en azul turquesa, amarillo, marrón y naranja respectivamente) y el terminador del gen NOS (en gris).

Con estas construcciones se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* y tras 3 días fueron observadas al microscopio confocal. También se utilizaron los mismos controles descritos en el capítulo 1: la interacción FUL-SOC1 como control positivo, los factores AG y SOC1 como control negativo y las fusiones de la mitad YFP<sup>N</sup> con todos los factores bajo

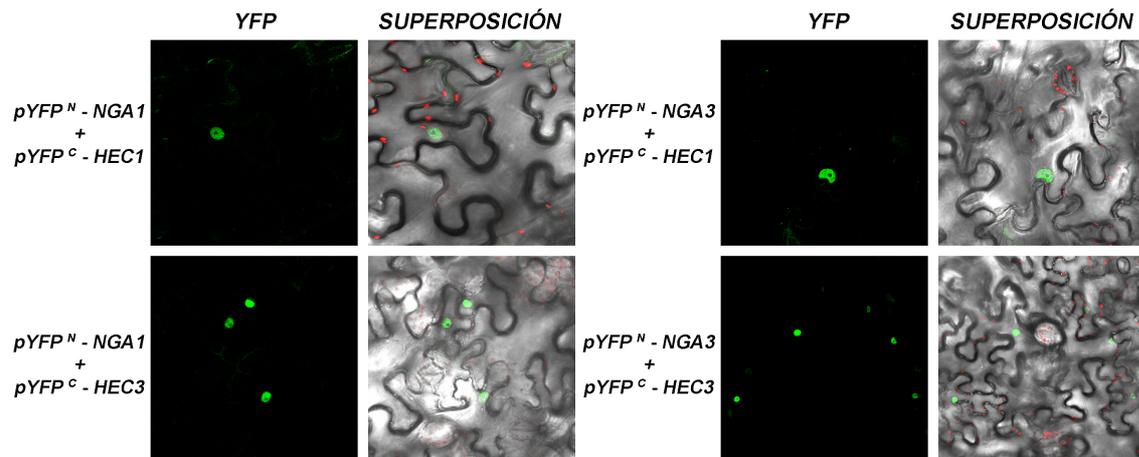
estudio (*NGA1*, *NGA3*, *HEC1* y *HEC3*) para comprobar si en algún caso confería autofluorescencia y así podía resultar en falsos positivos (Fig. C2.15).



**Figura C2.15: Controles utilizados para el estudio de las posibles interacciones entre *NGA1*, *NGA3*, *HEC1* Y *HEC3*.** Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda.

Los controles positivos y negativos dieron el resultado esperado, pero, sin embargo, la construcción  $pYFP^N-HEC1$ , al ser agroinfiltrada por sí sola, producía señal fluorescente, por lo que no pudo utilizarse en los ensayos. Por ese motivo a la hora de estudiar las interacciones entre *HEC1* y el resto de factores, lo hicimos utilizando siempre la mitad  $YFP^C-HEC1$ , para eliminar en la mayor medida posible los falsos positivos.

A continuación se realizaron los ensayos para detectar las posibles interacciones entre:  $YFP^C-HEC1/YFP^N-NGA1$ ,  $YFP^C-HEC1/YFP^N-NGA3$ ,  $YFP^C-HEC3/YFP^N-NGA1$  y  $YFP^C-HEC3/YFP^N-NGA3$ . Todos los ensayos realizados dieron resultados positivos, indicando que es muy probable que los heterodímeros NGA-HEC se formen *in vivo* (Fig. C2.16). Estos resultados se confirmaron mediante un ensayo independiente de doble híbrido en levadura realizado por la Dra. Mónica Colombo en nuestro laboratorio (no mostrado).



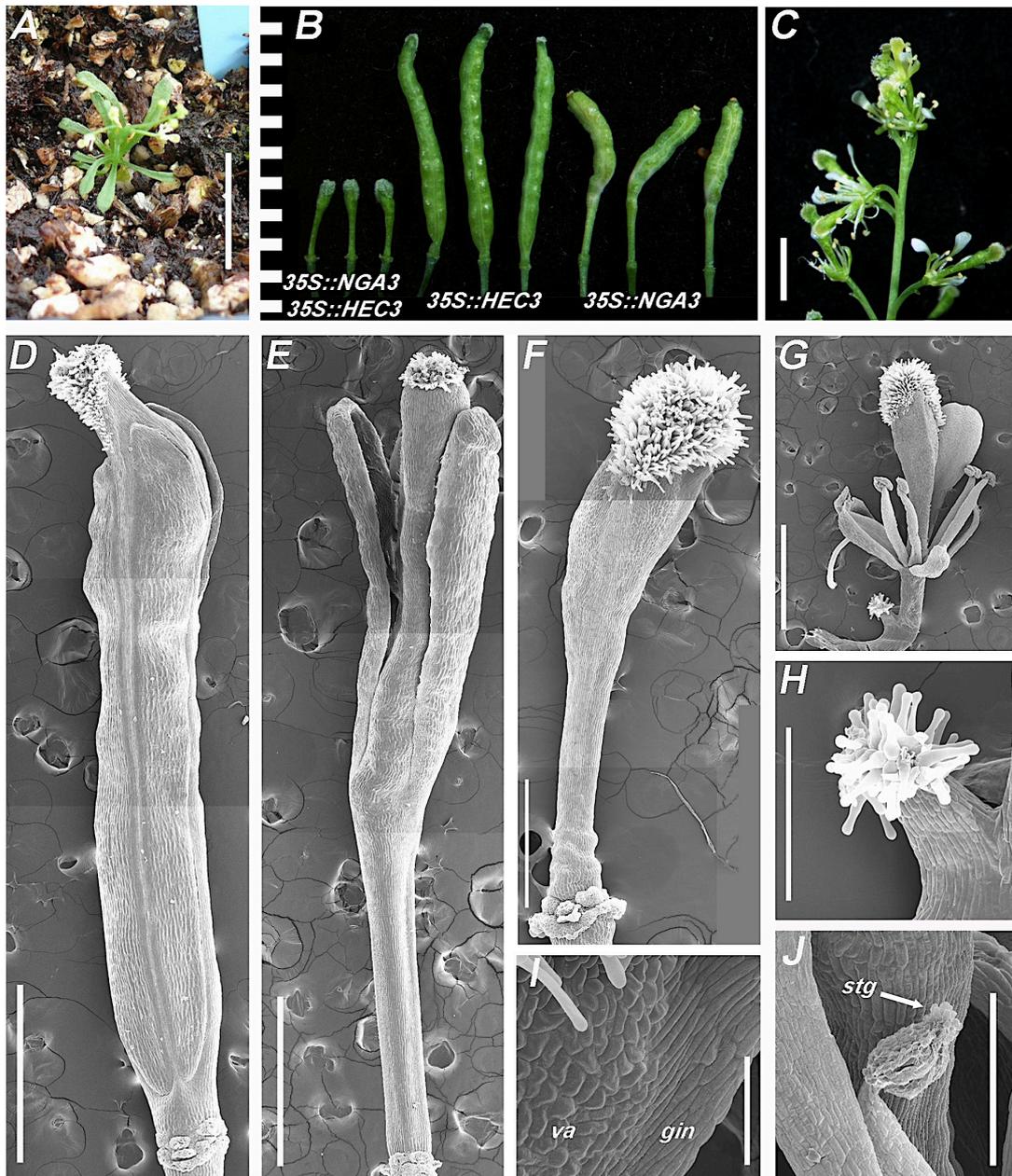
**Figura C2.16: Estudio de la interacción proteína-proteína entre NGA1, NGA3, HEC1 Y HEC3.** Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda. Se muestran únicamente los resultados en una dirección.

El requerimiento recíproco y obligado de NGA y HEC para realizar al menos parte de sus funciones y la formación de heterodímeros NGA-HEC observada en los ensayos de BiFC sugerían que ambos factores podían estar actuando de forma conjunta formando parte de un complejo proteico biológicamente activo. Si esta hipótesis fuese correcta, podríamos esperar que la sobreexpresión simultánea de ambos genes diera lugar a fenotipos fuertemente sinérgicos.

Puesto que las líneas que sobreexpresan *HEC* tienen una fertilidad muy reducida, se transformaron plantas *35S::NGA3* tanto con la construcción *35S::HEC1* como con la *35S::HEC3* descritas anteriormente. Sorprendentemente, no se recuperaron transformantes primarios, lo que podía deberse a algún fallo en el experimento realizado o explicarse por un posible efecto letal en el embrión de la doble sobreexpresión de *HEC* y *NGA3*. Como alternativa, generamos una línea sobreexpresora doble mediante cruce genético de la línea *35S::NGA3* (Fig. C2.17 A, E) con una línea *35S::HEC3* de fenotipo poco severo (categoría 2) (Fig. C2.17 A, D).

Las semillas recuperadas de estos cruces fueron capaces de germinar y producir plantas adultas que presentaban alteraciones en su desarrollo mucho más severas que las de los parentales. Estas plantas eran de un tamaño muy reducido, con rosetas que presentaban hojas estrechas y alargadas. Las flores de estas líneas se asemejaban a las de las líneas *35S::HEC* que clasificamos en la categoría fenotípica 1, es decir, la más severa, formando frecuentemente tejido estigmático ectópico en los extremos distales de estambres, pétalos y sépalos, que además eran de tamaño reducido y aparecían en número variable dentro de cada flor (Fig. C2.17 B, C, G y H). El gineceo se caracterizaba por presentar unos ovarios reducidos y estériles, una parte apical ensanchada que

carecía por completo de células estilares y estaba prácticamente cubierta por papilas estigmáticas, valvas muy reducidas o ausentes, apareciendo únicamente islotes de células típicas de valva en la posición inmediatamente inferior al estigma y que debería de ocupar el estilo, y un ginóforo alargado (Fig. C2.17. A, B, C, F, I y J).



**Figura C2.17: Caracterización fenotípica de la línea 35S::NGA3 35S::HEC3.** (A) Fotografía a la lupa de la planta 35S::NGA3 35S::HEC3 (1cm). (B) Fotografía a la lupa de los frutos 35S::NGA3 35S::HEC3, 35S::HEC3 y 35S::NGA3 (Las unidades de la regla son mm). (C) Fotografía a la lupa de la inflorescencia de las plantas 35S::NGA3 35S::HEC3 (2 mm). Fotografía al microscopio electrónico de barrido de (D) un fruto 35S::HEC3 (1 mm), (E) un fruto 35S::NGA3 (1mm), (F) un fruto 35S::NGA3 35S::HEC3 (600 μm), (G) una flor 35S::NGA3 35S::HEC3 (1 mm), (H) detalle de las protuberancias que aparecen en los pedicelos de las flores 35S::NGA3 35S::HEC3 y que presentan tejido estigmático ectópico (300 μm), (I) detalle de los tipos celulares típicos de valva y ginóforo presentes en la posición inmediatamente inferior al estigma y que debería de ocupar el estilo de los frutos 35S::NGA3 35S::HEC3 (va=valva, gin=ginóforo) (100 μm), (J) detalle de tejido estigmático ectópico de la parte apical de un estambre de una flor 35S::NGA3 35S::HEC3 (stg=estigma) (1 mm).

Así, pudimos concluir que la sobreexpresión simultánea de *NGA3* y *HEC3* tenía un efecto sinérgico en el desarrollo, produciendo alteraciones fenotípicas más severas que las causadas por las sobreexpresiones de cada gen por separado y en las que destacaba la formación ectópica de estigma.

Los resultados descritos hasta el momento sugieren que los factores *NGA* y *HEC* parecen actuar formando parte de un complejo proteico para posiblemente regular dianas comunes, y, entre otras funciones, dirigir la formación del estigma.

### **2.- Estudio de la relación del complejo NGA-HEC con otros bHLH implicados en el desarrollo de la parte apical del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.**

*INDEHISCENT (IND)* y *SPATULA (SPT)* codifican factores de transcripción de tipo bHLH, cuya función ha sido relacionada con diferentes aspectos del desarrollo de los tejidos reproductivos femeninos. *IND*, un parálogo muy cercano de los genes *HEC*, es un regulador clave para el desarrollo de las capas de separación y lignificación en el margen de valva, lo que hace que los frutos maduros de los mutantes *ind* no sean capaces de abrirse al final de su desarrollo (Liljegren et al. 2004); además, los gineceos *ind* presentan defectos muy sutiles en el desarrollo de las papilas estigmáticas (Girin et al. 2011) Por otra parte, *SPT* tiene un papel fundamental en el desarrollo del gineceo. Los mutantes *spt* presentan defectos en los tejidos marginales del carpelo, en concreto el estigma, el estilo y el septum (Alvarez and Smyth 1998; Heisler et al. 2001), que se desarrollan de un modo incompleto, y también en el tracto de transmisión, que no se forma en absoluto. Los dobles mutantes *ind spt* presentan defectos más severos, con unos gineceos que carecen por completo de estigma y tienen el estilo generalmente dividido en la zona medial, aunque presenta los tipos celulares estriados característicos de este tejido. Además, en el ovario, el septum no se forma (Fig. C2.18.A).

La expresión ectópica de *IND* bajo el control del promotor 35S da lugar a la formación de sépalos y estambres con tejido estigmático en sus ápices y gineceos estériles con ausencia de valvas, un fenotipo similar al de las líneas de sobreexpresión de *HEC* con defectos más severos (Fig. C2.18.D). Sin embargo, la sobreexpresión de *SPT* no produce defectos evidentes en el desarrollo floral, ni se observa tampoco formación de tejido estigmático ectópico. La falta de efecto fenotípico de sobreexpresión de *SPT* sugiere que este factor requiere de la presencia de otra(s) proteína(s) que no están presentes fuera de su dominio normal de expresión para realizar sus funciones. Girin et al. (2011) demostraron que las proteínas *SPT* e *IND* son capaces de interactuar en ensayos de doble híbrido de levadura, proponiendo un modelo en el que la formación de este dímero sería necesaria para su función en la regulación de la distribución de auxinas en el

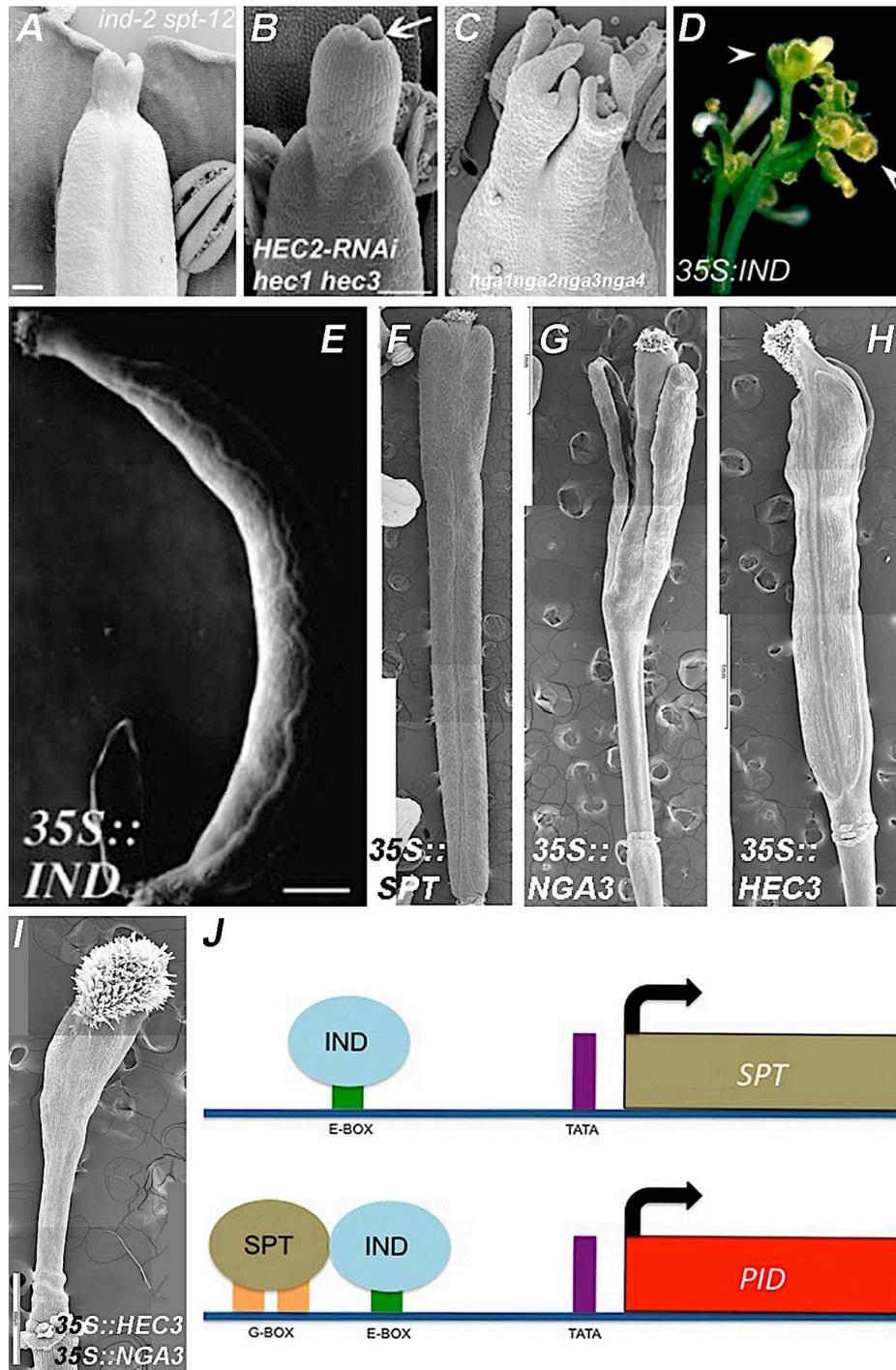
carpelo de *Arabidopsis*. En este modelo postulan que *IND* es capaz de activar la expresión de *SPT* y juntos, ambos factores son capaces de interactuar y de regular a *PINOID* (*PID*) y *WAG2*, kinasas implicadas en la regulación del transporte polar de auxinas (Fig. C2.18.I) (Girin et al. 2011).

Diversas evidencias relacionan funcionalmente a *HEC* y *NGA* con *IND* y *SPT*. En primer lugar, los mutantes múltiples *hec* también presentan defectos en el estigma, estilo, septum y tracto de transmisión (Gremski et al. 2007) (Fig. C2.18.B) muy similares a los observados en los dobles mutantes *ind spt*. Además, los mutantes *nga* también presentan defectos en la parte apical del gineceo, careciendo por completo de estigma y estilo (Trigueros et al. 2009) (Fig. C2.18.C).

También, como hemos mostrado anteriormente en esta tesis doctoral, los factores *HEC* y *NGA* son capaces de interactuar físicamente y esta interacción parece ser esencial para su función. Por otro lado, los fenotipos de sobreexpresión de *HEC*, *IND* y *NGA* también presentan similitudes. En la línea de sobreexpresión *35S::IND* de fenotipo intermedio, los frutos presentan unas valvas reducidas, un crecimiento en zig-zag del replum y un estilo más elongado (Liljegren et al. 2004) (Fig. C2.18.E). Este fenotipo recuerda a lo observado en las líneas de sobreexpresión de *HEC*, lo que no es de extrañar porque son proteínas con alta similitud de secuencia, y también es parecido al fenotipo de sobreexpresión de *NGA3*, ambos descritos previamente (Fig. C2.18.G,H).

Además, los fenotipos más severos de las líneas de sobreexpresión de *NGA3* y *HEC* recuerdan a los más extremos producidos por la sobreexpresión de *IND* (Girin et al. 2011) y a los de pérdida de función del transportador de flujo de salida de auxinas *PIN1* o de *PID*, kinasa que controla la localización polar de *PIN1*, así como a los fenotipos de las plantas tratadas con *NPA* para bloquear el transporte polar de auxinas (Okada et al. 1991).

Todo ello sugiere la existencia de una posible relación funcional entre *NGA*, *HEC*, *IND* y *SPT* en la regulación de las vías de señalización de auxinas y de la diferenciación de los tejidos apicales del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.



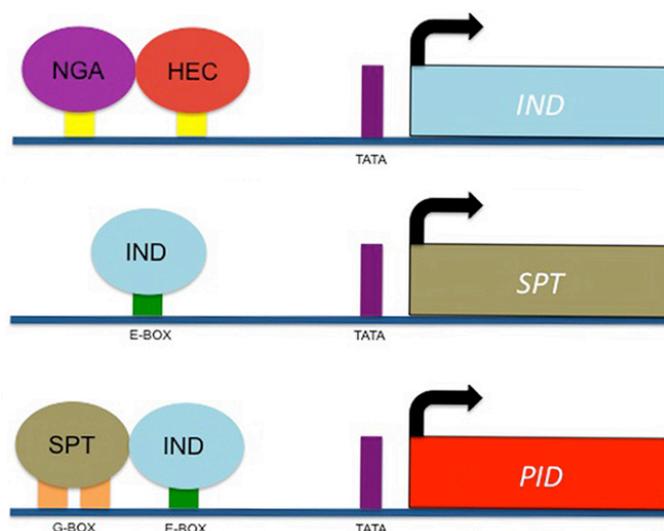
**Figura C2. 18: Detalle de los defectos observados en la parte apical de los frutos de las líneas (A) *ind-2 spt-12* (tomada de Girin et al., 2011), (B) *HEC2-RNAi hec1 hec3* (tomada de Gremski et al., 2007), (C) *nga1 nga2 nga3 nga4* (tomada de Trigueros et al., 2009), y (D) *35S::IND* (fenotipo severo, tomada de Girin et al., 2011). Fotografía al microscopio electrónico de barrido de frutos de (E) *35S::IND* (fenotipo intermedio, tomada de Liljegren et al., 2004) (F) *35S::SPT* (tomada de Navarrete-Gómez, 2011), (G) *35S::NGA3* y (H) *35S::HEC3*, (I) *35S::NGA3 35S::HEC3*. (J) Representación del modelo de Girin et al., 2011. En el esquema se representa la unión de IND al promotor de *SPT* y la unión de IND y *SPT* como dímero a los promotores de sus dianas, en este ejemplo, *PID*. Las *G-Boxes* se representan en naranja, las *E-Boxes* se representan en marrón, las *TATA-Boxes* que marcan el inicio de la transcripción se representa en morado, la CDS de *SPT* se muestra en verde y la CDS de *PID* se muestra en rojo.**



**Figura C2.19: Defectos observados en frutos completamente elongados de las líneas (A) *35S::NGA3* (B) *35S::NGA3 ind-2*, (C) *35S::NGA3 spt-2*. Fotografía a microscopio electrónico de barrido en frutos completamente elongados (D) *35S::NGA3*. (E) *35S::NGA3 spt-2* y (F) detalle de la parte apical de los frutos *35S::NGA3 ind-2*. Comparación del patrón de expresión de *SPT::GUS* de gineceos en estadio 17 en (G) fondo silvestre y (H) *35S::NGA3*. Comparación del patrón de expresión de *IND::GUS* de gineceos en estadio 17 en (I) fondo silvestre y (J) fondo *35S::NGA3*. (imágenes tomadas de Navarrete-Gómez, 2011).**

En trabajos previos del laboratorio se analizó el fenotipo de las combinaciones *35S::NGA3 ind* y *35S::NGA3 spt-2* (Navarrete-Gómez 2011). En estas líneas se observaba un rescate parcial del fenotipo de sobreexpresión de *NGA3*. Los frutos *35S::NGA3 ind* y *35S::NGA3 spt* presentaban una longitud de las valvas mayor, y el replum estaba menos afectado, puesto que no presentaba la forma en zig-zag característica de los frutos *35S::NGA3* (Fig. C2.19.A-F). Así mismo, también se analizó si se producía algún cambio en el patrón de expresión de las líneas reporteras *SPT::GUS* e *IND::GUS* en fondo *35S::NGA3*. En los frutos de la línea *SPT::GUS* en fondo *35S::NGA3* se detectó que la señal de la zona de dehiscencia se ensanchaba un poco, además de que se podía apreciar más intensidad en la señal (Fig. C2.19.G,H). En el caso de los frutos de la línea *IND::GUS* en fondo *35S::NGA3* se detectó un cambio muy evidente en la distribución de la señal: mientras que en frutos silvestres la expresión está confinada a la zona de dehiscencia, en frutos *35S::NGA3* la señal se expandía a toda la valva (Fig. C2.19.I,J).

Estos resultados previos, en su conjunto, sugerían que *IND*, y directa o indirectamente también su diana *SPT*, podían estar regulados por el dímero HEC-NGA, y que la activación sucesiva de *IND* y *SPT*, así como la formación del heterodímero correspondiente, permitiría regular las vías de señalización de auxinas en el gineceo y la formación del estigma y otros tejidos apicales (Fig. C2.20). Para validar esta hipótesis llevamos a cabo diferentes ensayos genéticos y moleculares.



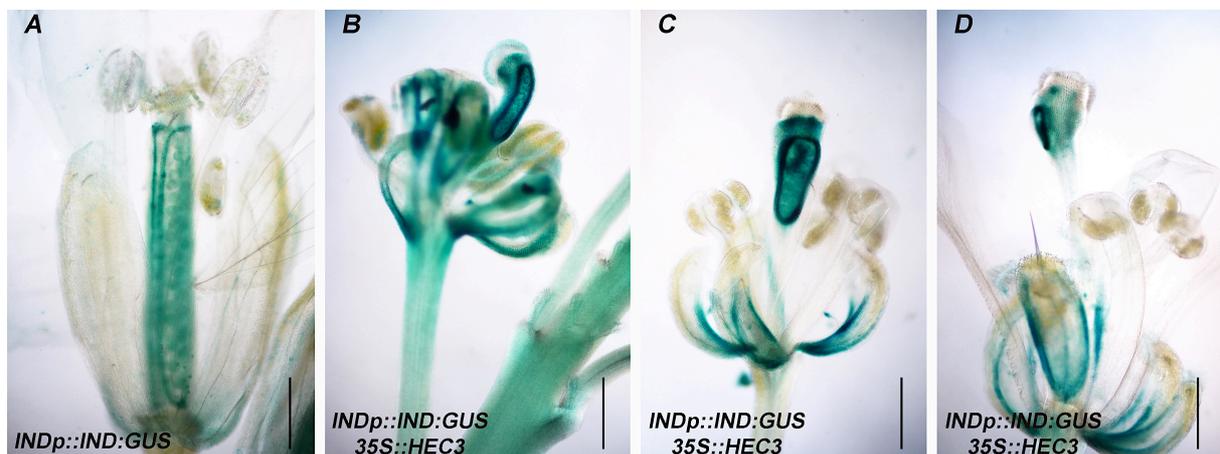
**Figura C2. 20: Modificación propuesta del modelo de Girin et al., (2011).** En el esquema se representa la unión de NGA y HEC al promotor de *IND*; la unión de IND al promotor de *SPT* y la unión de IND y SPT al promotor de sus dianas, *PID* y *WAG2*. Las *G-Boxes* se representan en naranja, las *E-Boxes* se representan en marrón, las *TATA-Boxes* que marcan el inicio de la transcripción se representan en morado, la CDS de *IND* se muestra en azul, la CDS de *SPT* se muestra en verde y la CDS de *PID* se muestra en rojo.

### 2.1.- Análisis de la expresión de *IND* en fondos con actividad *HEC* alterada.

Como hemos dicho anteriormente, el patrón de expresión de *IND::GUS* en fondo silvestre está restringido al margen de valva y, posteriormente, la zona de dehiscencia, mientras que en fondo *35S::NGA3* se expande por toda la valva.

Puesto que las funciones de *NGA* y *HEC* parecen ser interdependientes, quisimos comprobar en primer lugar si *IND* también se expresaba ectópicamente en fondos *35S::HEC*, por lo que generamos la combinación *INDp::IND:GUS 35S::HEC3*.

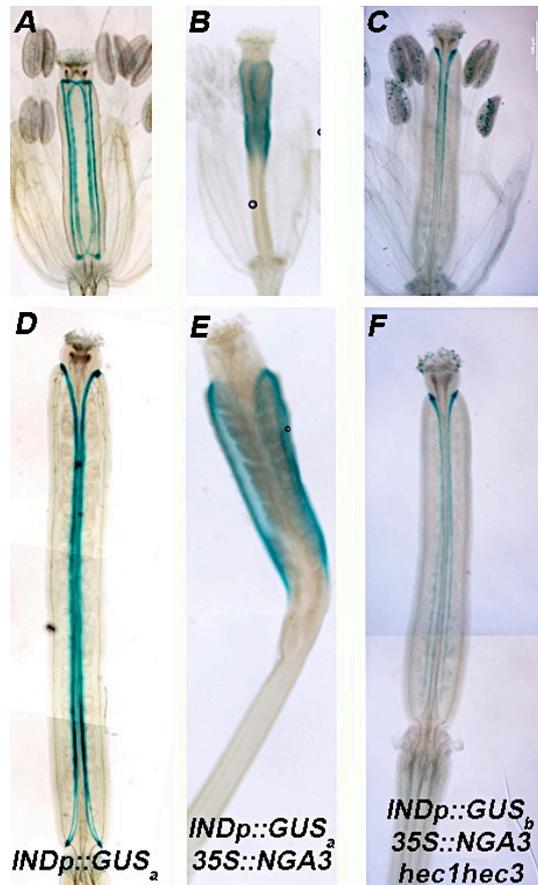
La tinción histoquímica de los frutos de estas líneas reveló que, de la misma manera que ocurría en fondo *35S::NGA3*, en *35S::HEC3* la señal se encontraba expandida a toda la valva y al estilo aunque seguía siendo más intensa en la zona del margen de valva. Además, también se observaba expresión ectópica de *IND* en los márgenes de los sépalos (Fig. C2.21).



**Figura C2.21: Comparación del patrón de expresión de *INDp::IND:GUS* en gineceos de estadio 14 en fondos (A) Col 0 (500µm); (B), (C) y (D) flores pertenecientes a las categorías fenotípicas 1 y 2 de *35S::HEC3* con unos fenotipos muy acusados y que presentan un estilo y estigma engrosados, valvas reducidas e incluso inexistentes y unos ginóforos más alargados que las flores Col-0 (500µm).**

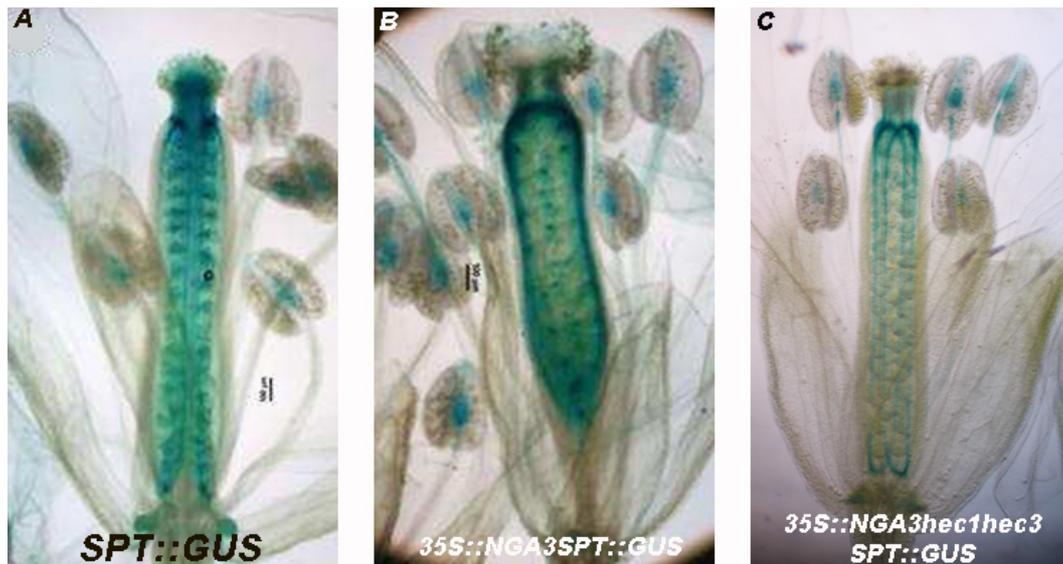
Además, y puesto que las mutaciones *hec* rescataban casi por completo los fenotipos causados por la sobreexpresión de *NGA3*, pretendimos averiguar si *HEC* también era necesario para la activación ectópica de *IND* en las valvas de *35S::NGA3* (Fig. C2.22.A-B, D-E). Para ello se introdujo el reportero de *IND* en el fondo *35S::NGA3 hec1 hec3* y se analizó el patrón de expresión correspondiente, observándose que la actividad *GUS* quedaba restringida al margen de valva como en el fondo silvestre (Fig. C2.22.C, F). Este resultado apoya la hipótesis de que la interacción entre *NGA3* y *HEC*, o al menos su presencia simultánea, es necesaria para la activación de dianas comunes, en este caso *IND*, aunque no permite resolver si *IND* sería una diana directa o indirecta de los factores *NGA3* y *HEC*. Por otro lado, también indica que *NGA* y *HEC* no son necesarios

para la activación de *IND* en el margen de valva, pero sí podemos deducir que es necesaria la presencia de *HEC* y *NGA* para activar la expresión ectópica de *IND*; dado que ésta solo se produce en determinados dominios, como las valvas, podríamos proponer el requerimiento de algún factor adicional presente en éstas.



**Figura C2.22: Comparación del patrón de expresión de *IND::GUS* en fondo silvestre en (A) flores en antesis y (D) fruto completamente elongado, en fondo *35S::NGA3* en (B) flores en antesis y (E) fruto completamente elongado, (imágenes tomadas de Navarrete-Gómez, 2011) y en fondo *35S::NGA3 hec1 hec3* en (C) flores en antesis y (F) fruto completamente elongado. (500µm). (a= corresponde a la línea reportadora GT140 (Liljegren et al., 2004). b= corresponde a la línea *ind-6* en heterocigosis (Wu et al., 2006)).**

Puesto que *IND* es un activador directo de *SPT* (Girin et al. 2011), cabría esperar que su expresión en fondo *35S::NGA3 hec1 hec3* también fuera diferente a la observada en fondo *35S::NGA3*. Para ello se generó la combinación *SPT::GUS 35S::NGA3 hec1 hec3* y se analizó el patrón de expresión de la construcción reportadora. Las líneas *SPT::GUS 35S::NGA3 hec1 hec3* mostraron un patrón de actividad GUS similar al observado en fondo silvestre, restringida al margen de valva, los óvulos y la parte apical del gineceo (aunque en ésta, con menor intensidad que en el silvestre), y suprimiéndose la expresión expandida y más intensa observada en fondo *35S::NGA3* (Fig. C2.23.A, B, C).



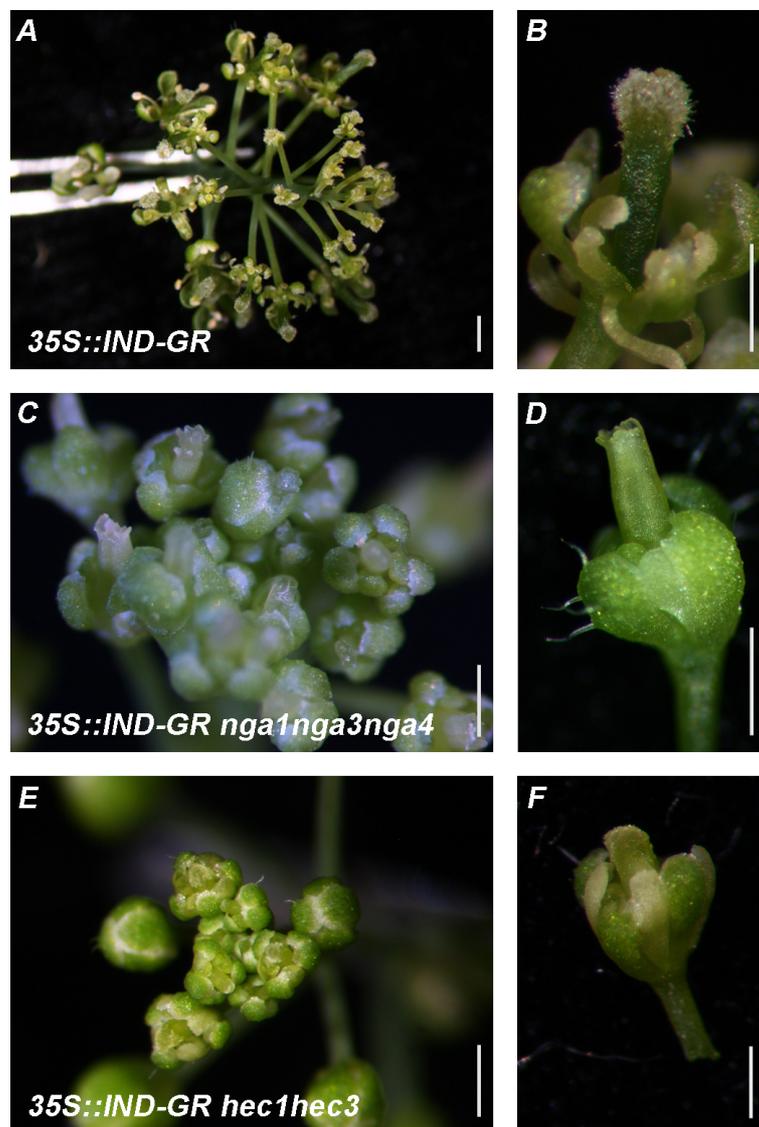
**Figura C2.23: Comparación del patrón de expresión de *SPT::GUS* en flores en anthesis (A) silvestre, (B) *35S::NGA3* (imágenes tomadas de Navarrete-Gómez, 2011) y (C) *35S::NGA3 hec1 hec3*.**

## 2.2.- Caracterización fenotípica del efecto producido por la sobreexpresión de *IND* en fondos mutantes *nga* y *hec*.

Todos estos resultados parecían indicar que *HEC* y *NGA* eran capaces de regular a *IND* y, probablemente de un modo indirecto, también a *SPT*. Además, sugerían que la expresión ectópica de *IND* y *SPT* en fondo *35S::NGA3* mediaba, al menos en parte, su fenotipo, como indicaba la supresión parcial de éste observada en las líneas *35S::NGA3 ind* o *35S::NGA3 spt*. Así, si como parecía, *IND* se encontraba en una posición posterior en la ruta genética, cabría esperar que la sobreexpresión de *IND* en fondos mutantes *nga* o *hec* tuviera efectos fenotípicos similares a los observados en fondos silvestres.

Con el fin comprobar esta hipótesis, generamos las combinaciones genéticas de los mutantes *nga* y *hec* con una línea que sobreexpresaba una proteína de fusión de *IND* con el receptor de glucocorticoide (*GR*), de modo que se podía inducir la localización nuclear de la proteína *IND-GR* mediante tratamiento con dexametasona (Sorefan et al. 2009). Así, generamos las líneas *35S::IND:GR hec1 hec3* y *35S::IND:GR nga1 nga3 nga4*. El tratamiento con dexametasona de las líneas *35S::IND:GR* provoca efectos fenotípicos muy severos, que son muy similares a los obtenidos cuando sobreexpresamos *IND* bajo el control del promotor *35S*. Estas plantas, como hemos dicho anteriormente, se caracterizan por tener gineceos estériles, sin valvas, y cuyas partes apicales están engrosadas y cubiertas ectópicamente de estigma, además de tener sépalos y estambres pequeños y en cuyos extremos distales también aparece tejido estigmático (Fig. C2.24.A,B). Sorprendentemente, al tratar con dexametasona

inflorescencias *35S::IND:GR nga1 nga3 nga4*, los gineceos presentaban un fenotipo similar al de los mutantes *nga1 nga3 nga4*, es decir, con ovarios similares al silvestre pero con la parte apical sin fusionar y donde no se desarrollaba el estilo o el estigma (Fig. C2.24.C,D). Por tanto, el fenotipo de sobreexpresión de *IND* se suprimía parcialmente y no se observaban gineceos con valvas reducidas, ni partes apicales engrosadas con tejido estigmático ectópico, aunque sí afectaba al tamaño de los otros órganos florales. Por otro lado, la inducción de la translocación al núcleo de *IND-GR* en fondo *hec1 hec3* se caracterizaba por causar un fenotipo similar al de las líneas inducidas *35S::IND:GR* aunque con unos fenotipos menos severos, con unas partes apicales engrosadas y cubiertas de menos cantidad de estigma (Fig. C2.24.E,F).



**Figura C2.24: Fenotipos asociados a la línea de sobreexpresión inducible por dexametasona de *IND* en fondo silvestre, *nga1 nga3 nga4* y *hec1 hec3*.** Fotos a la lupa de *35S::IND:GR* en fondo Col-0 de (A) inflorescencia, (B) flor; en fondo *nga1 nga3 nga4* de (C) inflorescencia, (D) flor y en fondo *hec1 hec3* de (E) inflorescencia, (F) flor. Se muestran únicamente los resultados del tratamiento con dexametasona.

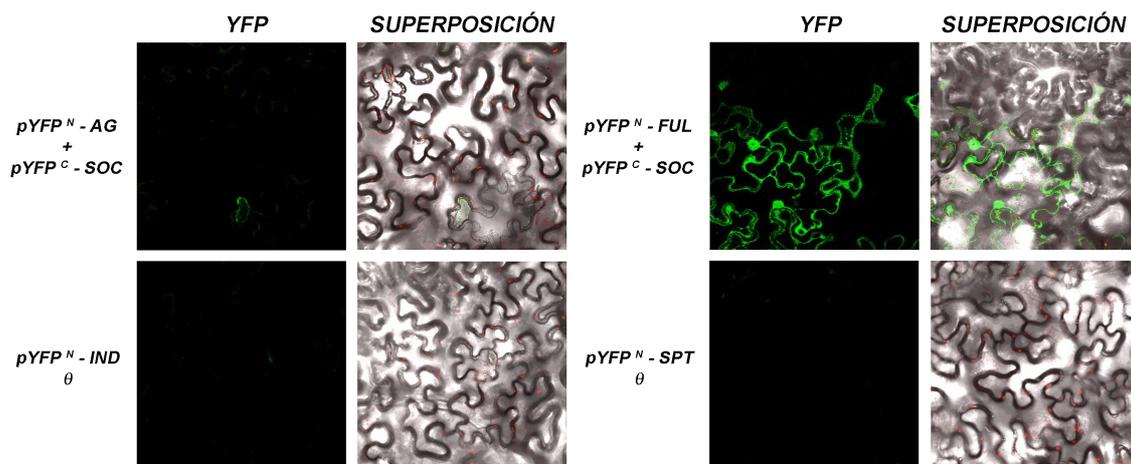
Estos resultados no parecen estar de acuerdo con la hipótesis de que los factores NGA y HEC eran capaces de interactuar para regular a *IND* y que la expresión ectópica de éste dirigiría la formación del estigma (Fig. C2.25.A), ya que, al menos en fondo mutante *nga*, la sobreexpresión de *IND* no produce proliferación de tejido estigmático, indicando que *IND* podría requerir de la presencia de NGA para realizar estas funciones. Así, planteamos una nueva hipótesis basada en el modelo de Girin, pero en el que incluimos un evento de regulación previo: el complejo HEC-NGA sería capaz de regular a *IND*, que, una vez presente, interactuaría a su vez con NGA (o quizá con el complejo HEC-NGA) para formar otro complejo de mayor orden que a su vez activaría a *SPT*. De nuevo, una vez presente, *SPT* se incorporaría al complejo y posiblemente éste sería capaz de regular a las dianas responsables de la formación de células estigmáticas (Fig. C2.25.B). Para explorar esta posibilidad, se realizaron distintos experimentos.



**Figura C2.25: Modelos de acción propuestos para los factores NGA y HEC. (A)** En el modelo se representa que el complejo formado por NGA y HEC es capaz de regular a *IND*; *IND* es capaz de regular a *SPT* y el complejo formado por *IND* y *SPT* es capaz de regular dianas. **(B)** En el modelo se representa que el complejo formado por NGA y HEC es capaz de regular a *IND*; el complejo formado por NGA, HEC e *IND* es capaz de regular a *SPT* y finalmente el complejo formado por NGA, HEC, *IND* y *SPT* es capaz de regular dianas comunes.

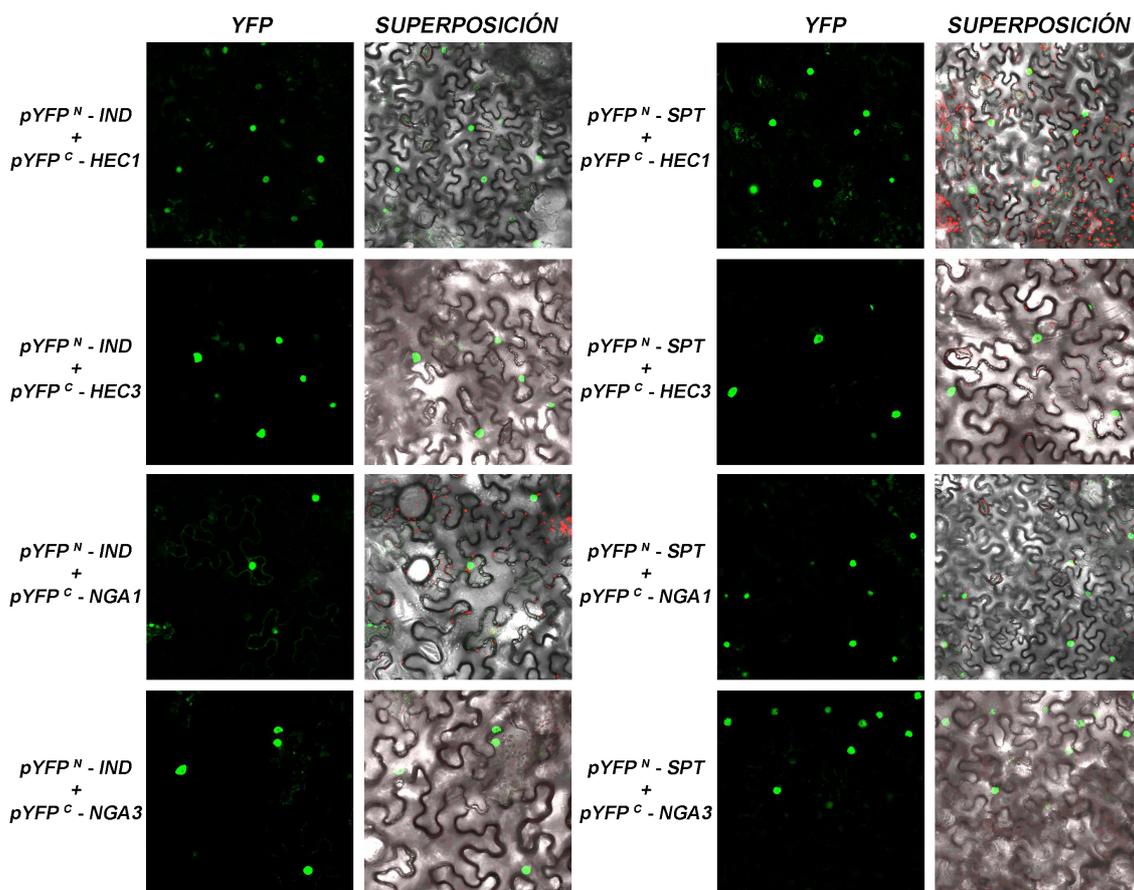
En primer lugar, se analizó la capacidad de los estos factores para interactuar físicamente mediante complementación fluorescente bimolecular (BiFC)

Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* y tras tres días fueron observadas al microscopio confocal. En el experimento se incluyeron los controles habituales: como control positivo la interacción *FUL-SOC*, como control negativo *AG-SOC* (Balanza et al. 2014; de Folter et al. 2005; Immink et al. 2002b) y las fusiones de la mitad YFP<sup>N</sup> con todos los factores estudiados por si solas para descartar falsos positivos (Fig. C2.26).



**Figura C2.26: Controles utilizados en el estudio de la interacción proteína-proteína entre NGA3, IND, SPT Y HEC3.** Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda.

Se detectó señal YFP en todas las interacciones que estudiamos (Fig. C2.27) por lo que estos resultados eran compatibles con la hipótesis de un complejo multimérico funcional (Fig. C2.25.B).



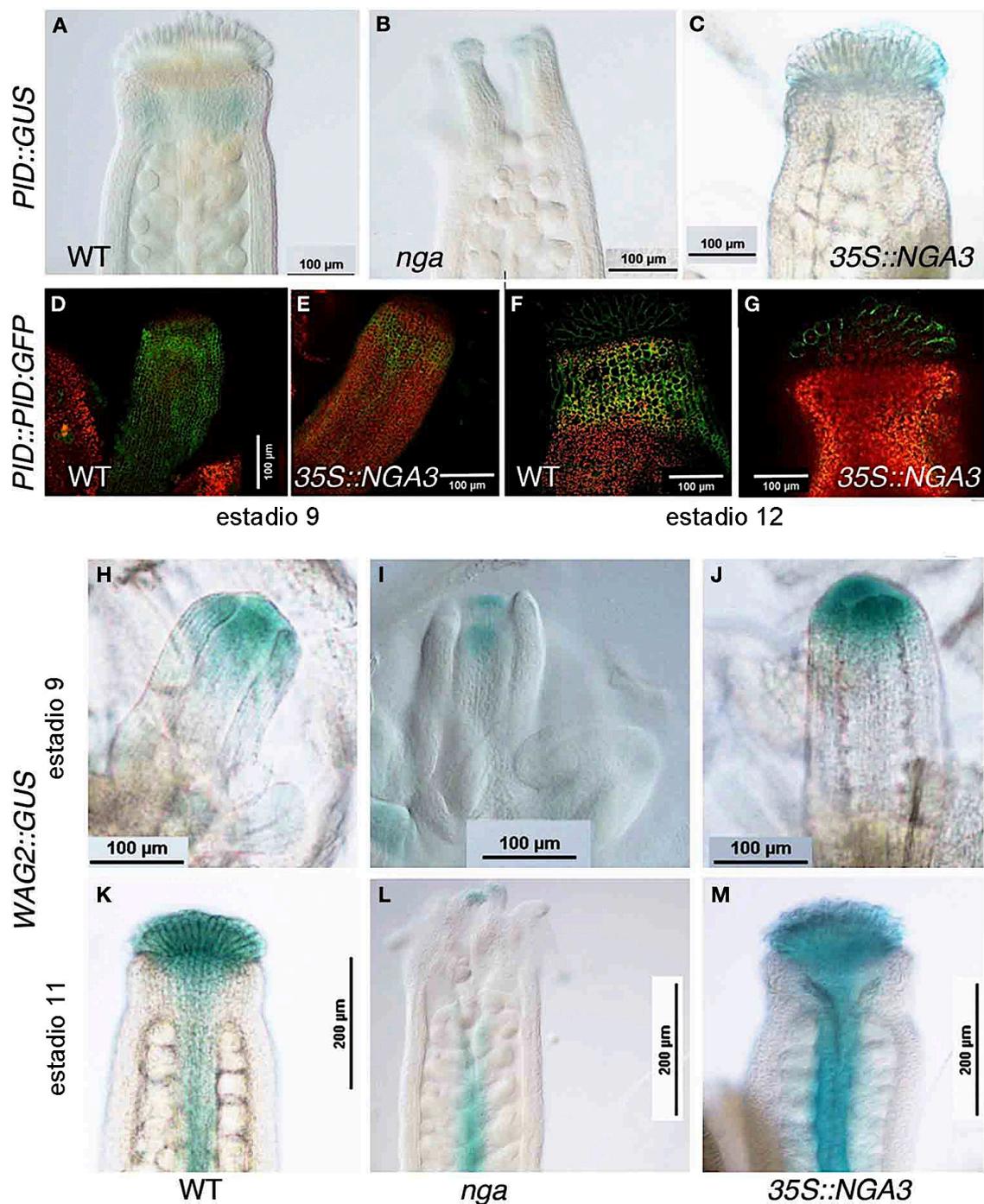
**Figura C2.27: Estudio de la interacción proteína-proteína entre NGA3, IND, SPT Y HEC3.** Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda. Control positivo ( $pYFP^N - FUL + pYFP^C - SOC$ ). Control negativo ( $pYFP^N - AG + pYFP^C - SOC$ ). Se muestran únicamente los resultados en una dirección.

Si la formación del complejo NGA-HEC-IND-SPT fuera necesaria para la regulación de las dianas comunes de estos factores, podría esperarse que la unión de este hipotético complejo a sus promotores diana o su actividad transcripcional sobre dichos promotores estuviera alterada en ausencia de alguno de los componentes del complejo.

Se ha descrito que los factores de transcripción de tipo bHLH (como son IND, SPT y HEC) se unen a elementos en *cis* denominados cajas-E (o E-boxes en inglés) cuya secuencia consenso es CANNTG y, mayoritariamente, a sus variantes denominadas cajas-G (G-boxes, CACGTG) (Toledo-Ortiz et al. 2003). Sorefan et al., (2009) analizaron la unión de IND::GR a diferentes variantes de las E-boxes presentes en los promotores de *PID* y *WAG2*, determinando que IND era capaz de unirse a ambos para regularlos de forma directa.

En primer lugar, determinamos si la expresión de *PID* y *WAG2* también estaba regulada por *NGA* introduciendo líneas reporteras *PID::GUS* y *WAG2::GUS* en fondos silvestre, *35S::NGA3* y mutantes múltiples *nga* (Martinez-Fernandez et al. 2014). En fondo silvestre, la detección histoquímica de la actividad GUS conferida por el reportero *PID::GUS* se localizaba de modo débil en la parte interna del estilo (Fig. C2.28.A); en el fondo *nga*, a pesar de que no se formaba ni estilo ni estigma, la señal se localizaba en las protusiones apicales (Fig. C2.28.B); y en fondo *35S::NGA3* la señal desaparecía del estilo, aunque podía observarse en el estigma (Fig. C2.28.C). Estos patrones sugerían que *PID* podía estar reprimido por *NGA* en el estilo, aunque la poca intensidad de la señal GUS no permitía asegurarlo. Por ello, se observó que ocurría en las líneas *PIDp::PID:GFP* en fondo *35S::NGA3*. Estas líneas mostraban una reducción de la señal GFP con respecto a la señal observada en fondo silvestre (Fig. C2.28.D-G), lo que sugiere que *NGA3* podría prevenir la acumulación de *PID*. La línea reportera *WAG2::GUS* presentaba una señal intensa en la zona apical de gineceos en desarrollo en estadio 9 (Fig. C2.28.H). En los mutantes *nga* la intensidad se observaba mas reducida (Fig. C2.28.I) y aumentada en la línea de sobreexpresión de *NGA3* (Fig. C2.28.J). En gineceos en estadio 11 ocurrían los mismos cambios de intensidad en los diferentes fondos estudiados, pero la expresión se localizaba en el estigma y el tracto de transmisión (Fig. C2.28.K-M).

Estos resultados sugieren que los factores *NGA* podrían regular a *PID* y *WAG2* en direcciones opuestas, reprimiendo a *PID* y activando a *WAG2* (Martinez-Fernandez et al. 2014), de manera similar a lo que describieron Girin et al. (2011) para IND y SPT.

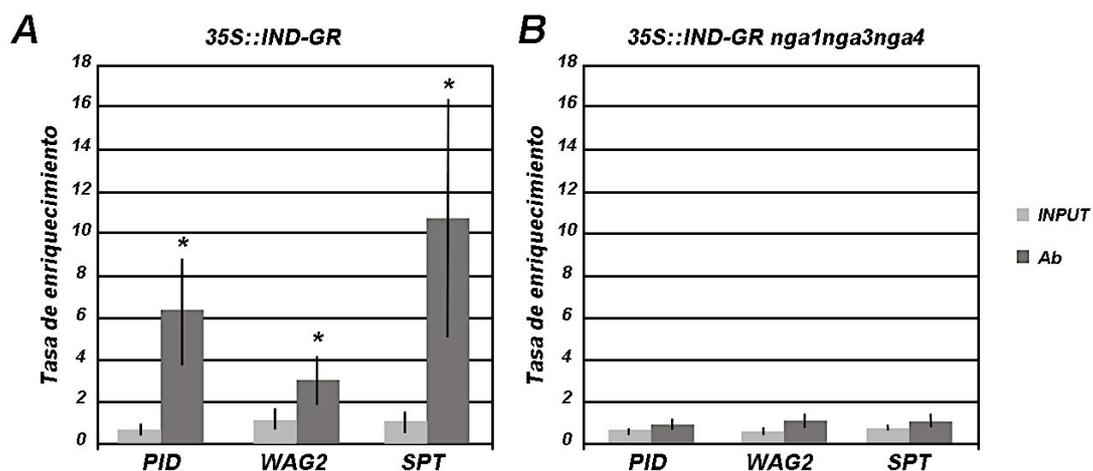


**Figura 2.28 Detección histoquímica de la actividad GUS** dirigida por el promotor de *PID* en gineceos en estadio 12 en fondo (A) silvestre, (B) cuádruple mutante *nga*, (C) *35S::NGA3*. Expresión de *PID::PID:GFP* en gineceos en estadio 9 en fondo (D) silvestre, (E) *35S::NGA3*, y la región apical (estilo/estigma) de gineceos en estadio 12 en fondo (F) silvestre, (G) *35S::NGA3* (Tomadas por Irene Martínez-Fernández y Sofía Sanchís). Detección histoquímica de la actividad GUS dirigida por el promotor de *WAG2* en gineceos en estadios 9 y 11 en fondo (H, K) silvestre, (I, L) cuádruple mutante *nga* y (J, M) *35S::NGA3*.

Puesto que la unión de IND a estos promotores era dependiente de la presencia de SPT (Girin et al. 2011), podíamos estar ante un escenario análogo en el que la presencia de NGA también fuera necesaria para la unión de IND a sus dianas. Para comprobarlo, se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en líneas IND:GR,

utilizando un anticuerpo anti-GR, donde se cuantificó el enriquecimiento de las regiones genómicas de *PID* y *WAG2* a las que se unía IND tras el tratamiento con dexametasona y respecto a cromatina inmunoprecipitada de plantas tratadas con solución control sin dexametasona. También se incluyó como posible diana el promotor de *SPT*, ya que Girin et al (2011) también habían mostrado unión de IND a E-boxes presentes en dicho promotor, aunque, en este caso, dicha unión no era dependiente de *SPT*. El ensayo que llevamos a cabo reproducía las condiciones experimentales descritas previamente (Girin et al. 2011; Sorefan et al. 2009), utilizando paralelamente la línea *35S::IND:GR* que tras la inducción con dexametasona era idéntica fenotípicamente a las líneas *35S::IND*, y la línea *35S::IND:GR nga1 nga3 nga4*, en la que habíamos mostrado que la inducción de IND no era capaz de promover la proliferación de tejido estigmático.

Los resultados del experimento mostraron que en las líneas *35S::IND:GR* tratadas con dexametasona en fondo silvestre, IND se unía a los promotores de *PID*, *WAG2* y *SPT*, obteniendo unos enriquecimientos del orden de 6, 3 y 10 veces respectivamente en relación a las plantas tratadas con solución control. Estos resultados eran similares a los publicados anteriormente (Girin et al. 2011). Sin embargo, en las líneas *35S::IND:GR nga1 nga3 nga4* no observamos enriquecimiento, permitiéndonos concluir que NGA sería necesario para la unión de IND a los promotores de *SPT*, *PID* y *WAG2* (Fig. C2.29), resultado compatible con la hipótesis previamente planteada donde el complejo HEC-NGA sería capaz de activar la expresión de *IND*, que, una vez presente, interaccionaría a su vez con NGA (y posiblemente HEC) para a su vez activar a *SPT*. Una vez presente, *SPT* se incorporaría al complejo y serían capaces de regular a *PID* y *WAG2* (Fig. C2.25.B).

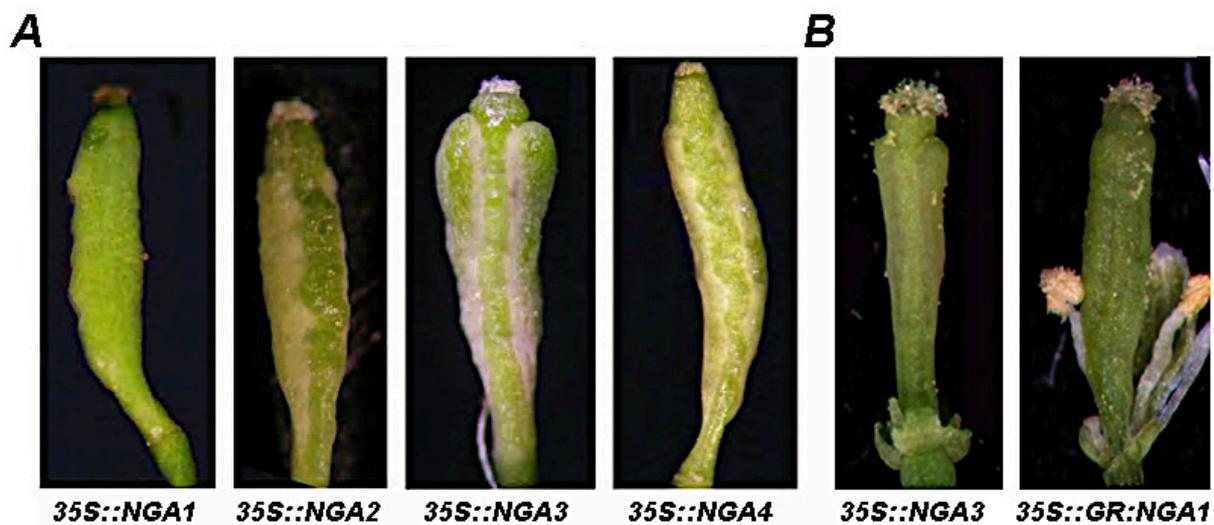


**Figura C2.29: Resultados de los experimentos de ChIP sobre el promotor de *PID*, *WAG2* Y *SPT*.** Resultados de un experimento realizado con cromatina de inflorescencias de líneas (A) *35S::IND-GR* y (B) *35S::IND-GR nga1 nga3 nga4* tratadas con Dexametasona/Mock durante 4h. Se muestran los enriquecimientos obtenidos para cada gen. Las barras gris claro representan el material de partida (INPUT) y las barras gris oscuro los enriquecimientos obtenidos en cada región analizada en las inmunoprecipitaciones (Ab). Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar. \*P<0,05.

## CAPÍTULO 2

Para testar si, de modo recíproco, IND era necesario para la unión de NGA a estos promotores, diseñamos una estrategia experimental similar a la descrita. Para ello, fue necesario generar líneas transgénicas *35S::GR:NGA1*. Se obtuvieron 28 líneas transgénicas primarias. Tras el análisis de segregación del transgén en las correspondientes plantas T2, seleccionamos tres líneas en las que el transgén se había insertado aparentemente en un único locus, y seleccionamos para cada una de ellas plantas homocigotas para el transgén, generando así las líneas #25.12 #17.7 y #28.5. Una vez aisladas las líneas homocigotas *35S::GR:NGA1*, se procedió a analizar con más detalle su fenotipo (Fig. C2.30).

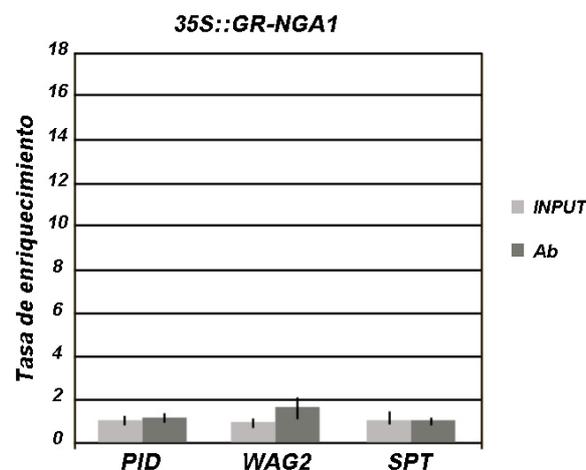
Las líneas transgénicas *35S::GR:NGA1* tratadas con dexametasona mostraron unos fenotipos similares a los observados en las líneas *35S::NGA3*. Esto por un lado indicaba que la fusión *GR:NGA1* era funcional y, por otro, que la sobreexpresión de *NGA3* y *NGA1* producía alteraciones fenotípicas equivalentes, tal y como habían propuesto Trigueros et al (2009), quienes observaron que las líneas transgénicas que expresan *NGA2*, *NGA3*, o *NGA4* bajo el control del promotor 35S de CaMV muestran fenotipos similares a los causados por la expresión ectópica de *NGA3* (Fig. C2.30).



**Figura C2.30: Fenotipos observados en los frutos que sobreexpresan los genes NGA.** (A) Fenotipos de frutos de las diferentes líneas que sobreexpresan uno de los cuatro genes *NGA* bajo el control de una repetición en tándem del promotor 35S (tomada de Trigueros et al., 2009). (B) Fotos a la lupa de frutos jóvenes de *35S::NGA3* y *35S::GR:NGA1*.

Utilizando las líneas *35S::GR:NGA1* seleccionadas, se realizó un nuevo ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) analizando el posible enriquecimiento de los promotores de *SPT*, *PID* y *WAG2* tras la inducción de la traslocación al núcleo de *GR:NGA1* mediante tratamiento con dexametasona. Puesto que se desconoce a qué secuencias se unen los factores NGA, se analizaron las mismas zonas de los promotores incluidos en el ensayo, asumiendo que si IND y NGA dimerizaran, debían unirse en

regiones próximas. El ensayo se llevó a cabo de la misma manera que en el experimento con las líneas *35S::IND:GR* (Girin et al. 2011; Sorefan et al. 2009). Sin embargo, en este experimento no obtuvimos un enriquecimiento significativo, lo que podía explicarse al menos de dos maneras: que NGA no se uniera directamente a los promotores de *SPT*, *PID* y *WAG2*, y su función conjunta con IND estuviera mediada por una interacción más compleja, o bien, que no se uniera en las zonas analizadas o, al hacerlo indirectamente, la unión fuera débil y no pudiéramos detectarla en nuestras condiciones experimentales (Fig. C2.31).



**Figura C2.31: Resultados de los experimentos de ChIP sobre el promotor de *PID*, *WAG2* Y *SPT*.** Resultados de un experimento realizado con cromatina de inflorescencias de línea *35S::GR:NGA1* tratadas con Dexametasona/Mock durante 4h. Se muestran los enriquecimientos obtenidos para cada gen. Las barras gris claro representan el material de partida (INPUT) y las barras gris oscuro los enriquecimientos obtenidos en cada región analizada en las inmunoprecipitaciones (Ab). Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que la unión de IND a algunos de sus promotores diana depende de la presencia de los factores NGA, así como la activación de las rutas que dirigen la formación del estigma. Las interacciones físicas observadas entre NGA, IND, HEC y SPT, junto con el análisis genético realizado, sugieren un mecanismo en el que la formación sucesiva de complejos protéicos en los que participaran estos factores regularían las vías de señalización por auxinas en el gineceo y dirigirían la formación del estigma.



## **DISCUSIÓN**



Esta tesis doctoral está dirigida a obtener una mejor comprensión de la función de los genes *NGATHA* en los procesos de morfogénesis del gineceo de *Arabidopsis thaliana*. Para ello, nuestro objetivo principal ha sido definir con mayor precisión la posición de estos genes en las rutas genéticas que dirigen la formación y el desarrollo del gineceo, tanto mediante la identificación de sus posibles reguladores, como mediante el análisis genético de sus interacciones con otros factores previamente identificados y con los que comparten funciones.

Puesto que en el momento de comenzar este trabajo no se conocían reguladores transcripcionales de los genes *NGATHA*, hemos dedicado el primer capítulo a la identificación y caracterización de algunos posibles candidatos.

Para llevar a cabo esa identificación hemos utilizado unos dominios conservados en los promotores de los 4 genes *NGA* y hemos realizado rastreos de híbrido simple en levadura, gracias a los cuales hemos identificado como posibles reguladores de los genes *NGA* a un factor de transcripción de la familia de los SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL), así como tres miembros de la familia de genes TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, AND PROLIFERATING CELL FACTORS (TCP). Tras la identificación de los reguladores candidatos, hemos llevado a cabo distintos ensayos de activación transitoria de promotores *in vivo* para confirmar la unión de estos posibles reguladores a los promotores de los genes *NGA*. También hemos caracterizado los mutantes y las líneas de sobreexpresión, así como las combinaciones genéticas de los mutantes correspondientes con las líneas reportadoras de *NGA* y con mutantes de pérdida y ganancia de función *NGA* para validar su relación genética.

Además de la identificación de posibles reguladores, nos interesaba profundizar en el análisis de las interacciones genéticas de *NGA* y otros factores clave en la morfogénesis del gineceo.

Como habíamos observado que las líneas de sobreexpresión de *HEC1*, *HEC3* y *NGA3* presentaban fenotipos similares en el fruto (ovarios reducidos, regiones apicales aumentadas y ginóforos largos, fenotipos similares a los de mutantes afectados en la señalización de auxinas), el segundo capítulo de esta tesis doctoral se ha centrado en determinar la relación funcional entre *NGA* y *HEC*. Para investigar esta relación hemos llevado a cabo análisis genéticos combinando los mutantes *nga* o *hec* con las líneas reportadoras correspondientes y entre sí, o con las líneas de sobreexpresión. Por otro lado hemos realizado diferentes ensayos moleculares, mediante los cuales hemos comprobado que ambos factores actúan al mismo nivel, formando parte de un complejo transcripcional con actividad cooperativa.

## DISCUSIÓN

Por otra parte, mediante análisis genéticos y moleculares similares en los que hemos incluido otros genes de la familia bHLH hemos deducido la necesaria participación de NGA en un complejo de mayor orden formado por NGA, HEC y también los factores INDEHISCENT (IND) y SPATULA (SPT), que sería necesario para la correcta señalización de auxinas durante la morfogénesis del gineceo y la formación del estigma en *Arabidopsis thaliana*.

### **1.- Identificación de factores reguladores de los genes *NGATHA*.**

En primer lugar, a fin de identificar posibles reguladores de los genes *NGA* realizamos una comparación de sus promotores para encontrar una región que tuviera relevancia biológica. La comparación de secuencias de los promotores de genes ortólogos entre especies cercanas (*phylogenetic shadowing*) es una potente herramienta para la identificación de regiones potencialmente importantes en la regulación de un gen y se ha utilizado con éxito en numerosos estudios. Por ejemplo, Hong et al., en 2003 utilizaron esta herramienta e identificaron varios elementos reguladores en el segundo intrón del gen homeótico *AG*, donde *a priori* conocían que había sitios de unión para dos activadores directos de *AG*, *LEAFY* (*LFY*) y *WUSCHEL* (*WUS*) (Busch et al. 1999; Lohmann et al. 2001); para ello compararon la secuencia de este intrón en 29 especies de Brasicáceas, encontrando que existían seis regiones con alta similitud de secuencia y que eran funcionalmente importantes para la regulación de *AG* (Hong et al. 2003). En otro trabajo, Yamaguchi et al. (2013) durante un intento de definir los elementos reguladores importantes conservados evolutivamente para la correcta expresión espacio/temporal de *LFY*, compararon el promotor *LFY* en once especies de Brasicáceas, identificando dos regiones muy conservadas que además coincidían con las previamente descritas por Blázquez y Weigel (Blázquez and Weigel 2000). Un estudio más detallado de una de las regiones reveló la presencia de cuatro elementos conservados de respuesta a auxina (*AuxRE*), desvelando así el papel de estas rutas de señalización en la regulación de *LFY* (Yamaguchi et al. 2013). Por último, Castrillo et al., en 2011 también utilizaron esta herramienta para identificar cajas conservadas en los promotores del gen de la *LIPASA* (*LIP1*) de varias especies de Brasicáceas, que luego utilizaron para un rastreo de híbrido simple con una genoteca de factores de transcripción, estrategia similar a la que hemos seguido y que les permitió identificar a un miembro de la familia de los factores HD-ZIP como regulador de *LIP1*.

Mientras que es posible encontrar numerosos ejemplos, como los descritos, en los que la comparación de promotores de genes ortólogos de especies próximas ha sido útil para identificar regiones reguladoras relevantes, no es tan frecuente encontrar ejemplos en los que se haya utilizado este tipo de estrategia en genes co-regulados de una misma

especie, más allá de la identificación de motivos de unión de factores de transcripción que se encuentren sobrerrepresentados, (Gonzalez-Grandio et al. 2013; Immink et al. 2012; Tao et al. 2012). En nuestro caso, dado que se ha propuesto que los genes *NGA* son el resultado de dos duplicaciones génicas relativamente recientes (Blanc et al. 2003; Trigueros et al. 2009) y que sus patrones de expresión eran tan similares, pensamos que podría ser válido adaptar el *phylogenetic shadowing* para identificar regiones reguladoras potencialmente importantes. De hecho, los resultados obtenidos nos han permitido validar su utilidad, incluso cuando comparamos genes corregulados no relacionados entre sí, como son *NGA3* y *STY1*.

Tras reconocer la secuencia más conservada en los cuatro promotores *NGA*, realizamos dos tipos de escrutinios, uno con la secuencia de 270 pb y la genoteca de cDNA completo, y otro con la secuencia de 55 pb y la genoteca de factores de transcripción. El escrutinio con la genoteca de factores de transcripción es en principio el mejor, ya que se ensayan las interacciones por separado y se maximiza la identificación de positivos. Sin embargo, tiene la pega de que no todos los factores de transcripción están representados, ya que se estima que alrededor de 1500 genes en *A. thaliana* codifican factores de transcripción y en la genoteca RR solo están representados 1200 (Castrillo et al. 2011), y por lo tanto, podríamos perder algún positivo interesante. El escrutinio con la genoteca de cDNA completo es más adecuado para ensayos de doble híbrido, pero también se puede utilizar para simple híbrido. En estas genotecas los genes que codifican factores de transcripción tienden a estar poco representados (Castrillo et al. 2011), pero en nuestro caso, la utilizamos porque en ese momento no estaba tan completa la genoteca de factores de transcripción.

#### 1.1.- Los factores del clado II de la familia *SPL* parecen actuar como reguladores de los genes *NGA*.

El único gen identificado en el escrutinio por híbrido simple de la genoteca de cDNA de planta completa que tenía características de ser un regulador transcripcional fue *SPL14*.

*SPL14* había sido caracterizado previamente en un trabajo que lo relacionaba con la respuesta a la Fumonisina B1, una toxina fúngica que induce la muerte celular programada en plantas y animales (Stone et al. 2005). Ningún estudio anterior de la función de los genes *NGA* apoyaba su posible relación con la muerte celular programada o la respuesta a compuestos fúngicos, por lo que en principio no disponíamos de evidencias que indicaran que la regulación de los genes *NGA* por *SPL14* fuera biológicamente relevante. Sin embargo, el trabajo de Stone et al (2005) incluía la

## DISCUSIÓN

caracterización fenotípica del mutante *fbr6*, en el que un T-DNA se encontraba insertado en la región 3'UTR del gen *SPL14* reduciendo sus niveles de mensajero, así como la determinación de su patrón de expresión, siendo ambas compatibles con la posible función de *SPL14* como regulador de *NGA*. Esto, junto con los experimentos que realizamos mostrando que *SPL14* era capaz de activar al promotor de *NGA3* fusionado al reportero LUC en planta, nos llevó a considerarlo como un buen candidato y por ello a profundizar en la caracterización funcional de *SPL14* y su relación con los genes *NGA*.

Debido a que no fue posible conseguir el mutante *fbr6*, alelo posiblemente hipomorfo de *SPL14* descrito en Stone et al. (2005), se buscaron mutantes de inserción de T-DNA en el gen *SPL14* en las colecciones públicas. El mutante caracterizado en esta tesis doctoral, *spl14-101*, presentaba un fenotipo similar al descrito para *fbr6*, aunque menos severo, y no presentaba alteraciones en el desarrollo del gineceo con respecto al silvestre. Este resultado era en cierto modo sorprendente, puesto que esperaríamos que *fbr6*, siendo un alelo posiblemente hipomorfo que solo reducía los niveles de expresión del gen, mostrara un fenotipo menos severo que el del alelo *spl14-101*, cuya inserción estaba en la mitad del gen y debía ser nulo o casi nulo. Esto podría deberse al fondo genético en el que se aisló *fbr6* (Col-6 *gl-1*), que es un poco distinto al fondo Col-0 de *spl14-101* o, alternativamente, también puede deberse a la presencia de otras mutaciones modificadoras en *fbr6* y que no están identificadas. En cualquier caso, el fenotipo de las plantas *spl14-101*, en el que se observan solo pequeñas alteraciones en el desarrollo de las hojas y ninguna en el de la flor o el gineceo, sugería que su papel en estos procesos y en la regulación de *NGA* podría no ser relevante o estar enmascarado por la redundancia funcional de este gen con otros miembros de la familia.

*SPL14* pertenece a la familia de los genes SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL). Los genes *SPL* constituyen una familia de factores de transcripción que desempeñan papeles fundamentales en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Fueron aislados inicialmente en *Antirrhinum majus* por la capacidad que mostraron los factores *AmSBP1* y *AmSBP2* de interaccionar con elementos de la secuencia del promotor del gen de identidad de meristemo floral *SQUAMOSA (SQUA)*, el ortólogo del gen *APETALA1 (AP1)* de *Arabidopsis* en *Antirrhinum* (Klein et al. 1996). Posteriormente se ha establecido que los genes *SPL* se encuentran en todas las plantas, incluyendo las algas verdes unicelulares, musgos, gimnospermas y angiospermas (Cardon et al. 1997; Riese et al. 2007; Arazi et al. 2005).

Los *SPLs* forman una familia de genes con 17 miembros en *Arabidopsis*, 11 de los cuales son dianas de los miRNAs miR156 y miR157 (Rhoades et al. 2002). La familia está definida por una región altamente conservada de 76 aminoácidos llamada el dominio

SBP, que incluye tanto una secuencia señal de localización nuclear como un dominio de unión a DNA específico de plantas.

La organización en exones e intrones de los genes SPLs es variable dentro de la familia, pero el dominio SBP siempre está codificado por el primer y el segundo exón, y la localización del intrón entre esos dos exones está conservada (Guo et al. 2008). El dominio SBP cuenta con un motivo dedo de zinc que tiene dos sitios de unión a  $Zn^{2+}$ : Cys-Cys-His-Cys y Cys-Cys-Cys-His (Yamasaki et al. 2004). En la parte C-terminal del dominio SBP, se localiza la señal de localización nuclear, que solapa parcialmente con el dominio de unión al DNA, en particular con la segunda estructura de unión de  $Zn^{2+}$  (Birkenbihl et al., 2005). Se ha determinado que el dominio SBP es necesario y suficiente para unirse al DNA y que esta unión se produce a través de un motivo cuyo *core* es **GTAC** (Birkenbihl et al. 2005; Cardon et al. 1999; Yamasaki et al. 2006). Trabajos posteriores han determinado con mayor precisión mediante experimentos de SELEX las secuencias a las que se une SPL14 con mayor afinidad, y cuyo consenso es CCGTAC(A/G) (Liang et al. 2008). También, Franco-Zorrilla et al. en 2014 utilizaron matrices de unión de proteínas a secuencias cortas de DNA (Protein Binding microarrays) para determinar las secuencias de unión de SPL1 (un factor SPL con alta similitud de secuencia a SPL14) y de SPL7, obteniendo que ambos reconocen el core GTAC con alta afinidad, y que, en concreto, SPL1 se une preferentemente a la misma secuencia definida previamente para SPL14, CCGTAC (Franco-Zorrilla and Solano 2014). Aunque el motivo CCGTAC no está presente en el fragmento de 270 pb que hemos utilizado como cebo en el escrutinio de híbrido simple, sí que es posible reconocer el core GTAC en el extremo distal de este fragmento, por lo que es posible que la unión de los factores SPL a *NGA3* esté mediada por este motivo.

La familia SPL en *Arabidopsis* inicialmente se dividió en subfamilias en base a la similitud y características generales de su secuencia completa. En este tipo de clasificaciones *SPL1*, *SPL7*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16* forman una subfamilia representada por los miembros con la secuencia más larga; *SPL2*, *SPL6*, *SPL8*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13a*, *SPL13b* y *SPL15* forman una subfamilia representada por los miembros con secuencia de longitud intermedia y *SPL3*, *SPL4* y *SPL5* forman la subfamilia de genes de secuencia más corta (Cardon et al. 1999; Schmid et al. 2005). Sin embargo, estudios posteriores en los que se han realizado estudios filogenéticos más precisos y que incluyen a genes de otras especies han resultado en la reorganización de la familia en nueve clados (Preston and Hileman 2013).

Las filogenias publicadas recientemente están basadas en la similitud de secuencia del dominio SBP y coinciden en que *SPL1*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16* forman parte de un clado muy bien soportado (Clado II), y que probablemente son el resultado de tres

## DISCUSIÓN

duplicaciones específicas de brasicáceas, una que dio lugar al ancestro de *SPL1/SPL12* y el de *SPL14/SPL16* y otras dos más recientes que los subdivide, de manera similar a lo que se ha propuesto para explicar el origen de los cuatro genes *NGA* (Trigueros et al. 2009), mientras que *SPL7* se encontraría en el clado I, más alejado (Chen et al. 2010; Preston and Hileman 2013).

La similitud de los cuatro genes del clado II sugiere que éstos podrían tener funciones redundantes. Nuestros experimentos de activación transitoria del promotor de *NGA3* en *Nicotiana* mostraron que los cuatro factores SPL tenían efectos similares sobre el promotor de *NGA3*, apoyando esta idea. Cuando caracterizamos el fenotipo de las plantas que portaban el alelo mutante *spl16-101* no observamos alteraciones evidentes en el desarrollo, lo cual no era demasiado sorprendente si, en efecto, *SPL16* y *SPL14* fueran redundantes. Sin embargo, tampoco observamos diferencias significativas respecto a los mutantes simples en el doble mutante *spl14 spl16*, algo que ya es más sorprendente si los dos genes tienen funciones equivalentes.

Podemos proponer dos explicaciones alternativas a esta observación. En primer lugar, es posible que sus funciones no sean demasiado relevantes en el desarrollo y que por ello su pérdida de función no cause alteraciones significativas, o bien que su función solo sea importante en determinadas condiciones de crecimiento. Esto estaría de acuerdo con la falta de fenotipo de las líneas de sobreexpresión de *SPL14*, caracterizadas en esta tesis doctoral, que tampoco presentaban ninguna diferencia evidente con respecto al silvestre, aunque esto también podría deberse a que en estas líneas los niveles de expresión del transgén no fueran suficientes para causar un efecto fenotípico, o a que *SPL14* necesite cofactores solo presentes en su dominio de expresión. Otra posible explicación alternativa es que la redundancia funcional de *SPL14* y *SPL16* sea extensible a los otros genes pertenecientes al clado, *SPL1* y *SPL12*, y que por tanto haga falta el cuádruple mutante para observar alguna alteración. Esta última posibilidad no parecía *a priori* la más probable, ya que normalmente cuando varios genes están muy relacionados entre sí y son funcionalmente redundantes, la redundancia no es completa y se observan efectos graduales conforme se combinan en cada vez mayor orden las mutaciones correspondientes de pérdida de función, tal y como ocurre con los mutantes *nga* (Trigueros et al. 2009) o los mutantes en la familia *shi/sty* (Kuusk et al. 2006). Aún así, decidimos abordar esta cuestión empleando dos estrategias alternativas y más rápidas que la generación de un cuádruple mutante:

En primer lugar se diseñó un amiRNA que tuviera como dianas a *SPL1* y *SPL12* y se transformaron tanto plantas Col-0 como los dobles mutantes *spl14-101 spl16-101*. Las transgénicas en fondo silvestre no se distinguían de las plantas no transformadas, en cambio algunas de las líneas transgénicas sobre el doble mutante *spl14-101 spl16-101*

presentaban unos frutos con unas regiones apicales engrosadas, con presencia de tejido típico de margen de valva en posiciones ectópicas dentro de la valva y con ginóforos más largos, un fenotipo que recordaba en parte al producido por la sobreexpresión de *NGA*. Podemos sacar dos conclusiones de estos resultados: por un lado, parecen apoyar la idea de que los cuatro genes *SPL* del clado II actuarían de un modo completamente redundante, ya que la reducción de la expresión de *SPL1* y de *SPL12* solo tendría efecto en el fondo *spl14 spl16*; por otro, que estos factores *SPL* podrían regular a los genes *NGA* a nivel transcripcional activando su expresión, tal y como se deduce de los análisis de expresión o su fenotipo en hoja, pero que podrían también interferir con la función *NGA* a otros niveles aún no caracterizados, ya que su pérdida de función fenocopia en cierta medida el efecto de la sobreexpresión de *NGA* en el desarrollo del gineceo.

En segundo lugar, se sobreexpresó una proteína quimérica en planta en la que se fusionó el dominio represor SRDX al factor *SPL14*. Como hemos dicho anteriormente, este dominio, fusionado a un factor de transcripción, le confiere un papel como represor transcripcional fuerte, de modo que su sobreexpresión provoca la represión de todos sus genes diana de forma dominante, y en teoría contrarrestando el posible efecto sobre éstas de otros factores de transcripción que estuvieran funcionando como activadores. Esta aproximación permite, por lo tanto, observar fenotipos relacionados con la alteración de la función del gen bajo estudio pasando por alto los problemas de redundancia génica con otros genes relacionados, siempre que estos actúen como activadores transcripcionales (Hiratsu et al. 2003). Cuando se fusiona el dominio de represión SRDX a un factor activador, el fenotipo esperable es similar al de su pérdida de función (Hiratsu et al. 2003), mientras que si lo fusionas a un factor represor, el fenotipo observado es similar al de su sobreexpresión (Matsui et al. 2008). En nuestro caso, si los factores *SPL* estuvieran activando a los genes *NGA*, tal y como podríamos predecir a partir de los ensayos de Luciferasa, cabría esperar que el fenotipo de esas líneas fuera similar al de los mutantes *nga*, pero sorprendentemente, los gineceos de las líneas 35S::*SPL14:SRDX* presentaban unas partes apicales más engrosadas, replum ancho y unas valvas más asimétricas en comparación con los pistilos de las plantas silvestres, nuevamente fenotipos similares a los observados en la sobreexpresión de *NGA* y que también recuerdan a mutantes en el transporte de auxinas *pin* y *pid*.

Así, tanto la reducción de la función de los genes *SPL* del clado II como la presencia del alelo *SPL14-SRDX* fenocopiaba en cierta medida la sobreexpresión de los genes *NGA*, algo que no concordaba con lo observado en los ensayos de Luciferasa, ni con los análisis de expresión, de los cuales podía inferirse que los factores *SPL* estudiados activaban transcripcionalmente a los genes *NGA*. Para intentar explicar esta aparente paradoja, podemos inspeccionar la secuencia de los factores *SPL* en cuestión. En Stone

## DISCUSIÓN

et al., (2005) se describe que la secuencia de SPL14 presenta tres posibles motivos EAR (LXLX), dominios que se han descrito como dominios transcripcionales de represión en multitud de factores de transcripción de plantas (Hiratsu et al. 2002; Ohta et al. 2001; Tiwari et al. 2004); por otro lado, también presenta cinco motivos LLXXL cuya función se ha descrito que media interacciones entre dominios de transactivación y coactivadores (Chen et al. 1999; Heery et al. 1997). Así, no sería de extrañar que SPL14 y posiblemente los SPLs miembros del subclado que presentan diferentes repeticiones del motivo, pudieran actuar como activadores o como represores dependiendo de su contexto. Se ha descrito en la literatura que hay factores que son capaces de activar o reprimir la expresión génica de sus dianas en función de sus interactores, como por ejemplo *bri-1-EMS-SUPPRESSOR1* (BES1) y *BRASSINAZOLE RESISTANT1* (BZR1) (Sun et al. 2010; Yu et al. 2011). BZR1 es capaz de formar heterodímeros con los factores PIF y coactivar a los genes diana de estos factores (Bernardo-Garcia et al. 2014; Oh et al. 2012), mientras que cuando forma homodímeros junto con BES1, ambos factores son capaces de unirse a TOPLESS (TPL) y actuar como represores transcripcionales (Oh et al. 2014; Ryu et al. 2014; Yu et al. 2011). Otro ejemplo podría ser el factor de transcripción *PERIANTHIA* (PAN) que primeramente se había descrito como activador directo de la expresión de *AGAMOUS* (AG) en el cuarto verticilo de la flor, ocupado por los carpelos (Wynn et al. 2014); sin embargo, estos mismos autores observaron que PAN, mediante su interacción física con *SEUSS* (SEU), también actuaba como represor de AG en el primer verticilo de la flor, ocupado por los sépalos, mostrando así que un determinado factor transcripcional puede regular de distinta manera a las mismas dianas dependiendo de sus interactores moleculares.

En este contexto, cabe destacar que los factores SPL1, SPL12, SPL14 y SPL16, además del dominio SBP, presentan una extensión en la parte C-terminal de su secuencia con tres repeticiones de ankirina que son de gran importancia para la interacción proteína-proteína con otros factores (Kropat et al. 2005; Stone et al. 2005). Estas repeticiones de ankirina podrían ser claves para explicar la regulación de *NGA* mediada por los SPLs, ya que es posible que SPL14 y los otros miembros del clado, SPL1, SPL12 y SPL16, puedan actuar junto con cofactores que se unirían por las repeticiones de ankirina y regulen de manera diferencial (activando o reprimiendo) a los genes *NGA*.

Tras concluir que los genes pertenecientes al clado II\* de los SPLs, SPL1, SPL12, SPL14 y SPL16, son capaces de regular a *NGA* sería muy interesante generar el cuadruple mutante *spl1 spl12 spl14 spl16* y determinar los niveles y los patrones de expresión de los cuatro genes *NGA* tanto en hojas como en inflorescencias para confirmar o descartar las hipótesis planteadas. A más largo plazo, y si se confirma la acción dual de los factores SPL del clado II sobre la regulación de los genes *NGA*, sería interesante

identificar sus posibles interactores para investigar en más profundidad los mecanismos moleculares implicados.

### 1.2.- Los genes *NGA* están regulados por factores de la familia TCP de tipo CIN-like.

El segundo escrutinio de híbrido simple de levadura, esta vez con el fragmento de 55 pb más conservado como cebo y frente a la genoteca RR de factores de transcripción, identificó a tres miembros de la familia TCP (TCP1, TCP2 y TCP3) como posibles reguladores de los genes *NGA*. De ellos, solo TCP2 y TCP3, pero no TCP1, eran capaces de activar la transcripción del gen reportero LUC fusionado al promotor de *NGA3* en planta. En una publicación previa se había mostrado que en líneas donde se inducía la expresión de una proteína de fusión TCP3:SRDX (por tanto convirtiendo a TCP3 en un represor transcripcional) los niveles de expresión de los genes *NGA3* y *NGA4* se reducían, sugiriendo así que TCP3, y posiblemente otros factores con los que actúa redundantemente, regulan a los genes *NGA* (Koyama et al. 2010). Nuestros resultados muestran niveles de expresión reducidos de los cuatro genes *NGA* en el fondo mutante *jaw-D* (donde la sobreexpresión del miR319 reduce los niveles de *TCP2*, *TCP3* y otros miembros de su mismo clado), lo que, junto con los resultados del híbrido simple y los de activación transitoria del promotor de *NGA3* en planta, indica la posible función de TCP2 y TCP3 como activadores transcripcionales directos de los genes *NGA*.

El clado CIN-like de la familia de los genes TCP de *Arabidopsis thaliana* comprende cinco genes regulados por el miR319 (*TCP2*, *TCP3*, *TCP4*, *TCP10* y *TCP24*) y otros 3 genes no regulados por miRNAs (*TCP5*, *TCP13* y *TCP17*) (Martín-Trillo and Cubas 2010). Estos ocho genes actúan de forma redundante en el control de varios aspectos del desarrollo de las hojas, como se deduce de los fenotipos observados en los mutantes simples de algunos de los genes del clado, que presentan hojas ligeramente más grandes y aserradas que las silvestres, y que van aumentando en severidad cuando se combinan mutaciones en varios de ellos o cuando se reducen simultáneamente los niveles de los ocho genes *TCP* CIN-like mediante la sobreexpresión conjunta del miR319 y de un miRNA artificial diseñado contra *TCP5*, *TCP13* y *TCP17*. En estas combinaciones de mutantes *tcp cin-like* con fenotipos más severos las hojas crecen desorganizadamente, perdiendo la forma de lámina y proliferando extensamente por sus márgenes, que toman un aspecto festoneado (Efroni et al. 2008; Koyama et al. 2010; Schommer et al. 2008). La relevancia biológica de la interacción regulatoria entre los genes *TCP* y los genes *NGA* está respaldada por el fenotipo de los cuádruples mutantes *nga*, que muestran defectos parecidos en el desarrollo de la hoja, lateralmente expandida y con márgenes algo lobulados, aunque son mucho menos severos que los de las

## DISCUSIÓN

combinaciones de mutantes *tcp cin-like* de mayor orden. Por otro lado, la sobreexpresión de los genes *NGA* produce efectos fenotípicos similares a los causados por la sobreexpresión de versiones de *TCP2*, *TCP3* y *TCP4* resistentes al miR319, que da lugar al desarrollo de hojas estrechas y curvadas hacia abajo con márgenes lisos y a la fusión ocasional de los cotiledones (Koyama et al. 2007; Palatnik et al. 2003; Trigueros et al. 2009). Además, las plantas 35S::*NGA3 tcp2* son indistinguibles de las plantas 35S::*NGA3*, y la sobreexpresión de *NGA3* en fondo *jaw-D* suprime parte de los fenotipos asociados a la sobreexpresión del miR319 en las hojas, especialmente el mayor crecimiento lateral de la lámina y, aunque solo parcialmente, la formación de lóbulos en sus márgenes. En conjunto, estos datos sugieren que los genes *NGA* estarían actuando aguas abajo de los genes *TCP CIN-like* para mediar en parte de sus funciones.

Ahora bien, la naturaleza y extensión de la interacción TCP-*NGA* puede interpretarse con hipótesis diferentes pero no mutuamente excluyentes:

Primero.- Los factores TCPs participan en múltiples interacciones y procesos de desarrollo que están genéticamente separados. Por ejemplo, se ha visto que regulan el tamaño de las hojas a través de la regulación negativa de los genes *CUC*. Esta regulación negativa se logra por la convergencia de varias rutas en las que los factores TCP activan de modo independiente a factores como *ASSYMETRIC LEAVES1*, al miR164 o a genes relacionados con auxinas, que a su vez reprimen la expresión de *CUC* (Koyama et al. 2007; Koyama et al. 2010). Además, los TCPs pueden controlar el desarrollo de la hoja por rutas independientes de *CUC*, como por ejemplo mediante el control de la proliferación celular a través de la activación del miR396, de la *CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR/KIP RELATED PROTEIN 1 (KRP1)* o de la biosíntesis de jasmonatos (Schommer et al. 2014), o interfiriendo con la señalización de citoquininas (Efroni et al. 2013). En esta situación, podemos imaginar que los genes *NGA* podrían estar participando en solo una parte de estas múltiples rutas, contribuyendo únicamente a un subconjunto de las funciones de los genes *TCP*. De hecho, los factores TCP y *NGA* han sido relacionados con vías comunes como las vías de señalización de auxinas (Martinez-Fernandez et al. 2014; Trigueros et al. 2009) de respuesta a citoquininas (Kwon et al. 2011) y el control de la proliferación (Kwon et al. 2009), sería muy interesante realizar los análisis genéticos pertinentes para averiguar que funciones de TCP son dependientes e independientes de *NGA*.

Segundo.- El fenotipo menos severo que presenta el cuádruple mutante *nga* en el desarrollo de la hoja cuando se compara con los mutantes múltiples *cin-tcp* podría ser debido a la redundancia de los genes *NGA* con los genes *NGA-LIKE (NGAL, At2G36080, At3G11580 y At5G06250)* también presentes en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Alvarez et al. 2009). De hecho, Engelhorn et al., (2012) publicaron que *DEVELOPMENT-*

*RELATED PcG TARGET IN THE APEX 4 (DPA4/NGAL2)*, controla el aserramiento de las hojas mediante la regulación negativa de *CUC2*. Además, se ha mostrado que la sobreexpresión de cualquier gen *NGAL* también causa la pérdida del margen aserrado de las hojas y la inhibición del crecimiento lateral de la lámina (Alvarez et al. 2009; Engelhorn et al. 2012; Shao et al. 2012). De este modo, podemos hipotetizar que los factores *NGA* y *NGAL* compartan funciones redundantes en el desarrollo de la hoja, que solo se pondrían de manifiesto generando las combinaciones mutantes en los siete loci. Estos mutantes múltiples podrían también usarse para comparar los efectos de la pérdida de función de *NGA/NGAL* y *CIN-TCP*, y así entender su relación funcional con mayor profundidad.

Tercero.- También es posible que los genes *NGA* estén únicamente activados por algunos de los factores *TCP* y que solo medien la función de éstos en el desarrollo de la hoja. De ese modo, los fenotipos mutantes *nga* reflejarían la contribución específica de este subconjunto de *TCPs* a este proceso de desarrollo. De hecho, en el rastreo de simple híbrido de levadura de este trabajo solo identificamos tres factores *TCP* capaces de unirse al fragmento de 55 pb más conservado en los promotores de los genes *NGA*, a pesar de que todos los miembros de la familia *TCP*, excepto *TCP7*, estaban presentes en la colección usada en el rastreo. Aunque no podemos descartar el que hayamos obtenido falsos negativos, estos resultados sugieren que no todos los factores *CIN-TCPs* regulan la expresión de los genes *NGA*, al menos a través de ese motivo. De hecho, se ha demostrado que no todos los factores *CIN-TCPs* son totalmente equivalentes: hay diferencias muy claras entre los patrones de expresión de los diferentes genes *CIN-TCP* (Danisman et al. 2013; Koyama et al. 2007), sus interacciones proteína-proteína (Danisman et al. 2013) o la severidad de los fenotipos causados por su sobreexpresión (Danisman et al. 2013; Koyama et al. 2007; Li and Zachgo 2013; Palatnik et al. 2003), así que es posible imaginar que estas diferencias puedan restringir la generalización de la relación regulatoria entre los factores *TCP CIN-like* y los genes *NGA*.

Aun así, no podemos descartar por completo que otros factores *TCP* además de *TCP2* y *TCP3* regulen la expresión de *NGA*. Nuestros análisis de expresión transitoria del efecto de *TCP* en el promotor de *NGA3* sugieren que la activación de éste por *TCP2* y *TCP3* no solo está mediada por la región usada en el rastreo de simple híbrido de levadura, sino que otros elementos regulados por *TCP* también están presentes en otras posiciones del promotor de *NGA3*. Para comprobar si estos elementos adicionales pueden también responder a otros miembros del clado de *CIN-TCPs*, sería interesante desarrollar un estudio sistemático en el que todos los ellos fueran analizados. Estos experimentos podrían también aportar evidencias funcionales para aclarar las diferencias entre los *TCPs* que actúan de forma redundante pero no son completamente equivalentes.

## DISCUSIÓN

Además de esta función en el desarrollo de los órganos laterales, los factores NGA son esenciales para especificar la identidad de los tejidos apicales del gineceo, el estilo y el estigma. Según análisis transcriptómicos en las bases de datos públicas, *TCP2* y *TCP3* se expresan en los carpelos y, por otro lado, nosotros hemos observado que los niveles de expresión de los genes *NGA* se reducen en los gineceos de los mutantes *jaw-D*. Sin embargo, los mutantes *jaw-D* solo muestran defectos moderados en el desarrollo del fruto que afectan a su elongación, pero no al desarrollo del estilo o el estigma (Palatnik et al. 2003), sugiriendo que el papel de *NGA* en el desarrollo de la parte apical del gineceo no es dependiente de la actividad de los factores TCP CIN-like.

Finalmente, nuestro trabajo indica que el papel en el desarrollo de la hoja del módulo regulador TCP-NGA está probablemente conservado en las angiospermas. Por un lado, hemos sido capaces de identificar la región de secuencia más conservada de los cuatro promotores *NGA* de *Arabidopsis* también en genes ortólogos a *NGA* en especies filogenéticamente lejanas y de interés agronómico como son el arroz (una monocotiledónea), el tomate (una solanácea) o la judía (una leguminosa). Además, hemos comprobado que el promotor de un gen *NGA* de tomate (*SINGAa*) es activado por el correspondiente ortólogo de *TCP3* de esta especie (*LANCEOLATE*, *-LA-*) en ensayos de expresión transitoria. En la literatura encontramos trabajos previos que muestran que los genes *CIN-TCP* controlan el desarrollo de la hoja en distintas especies de angiospermas. Por ejemplo, el estudio de los mutantes *cincinnata* en *Antirrhinum majus*, que muestran hojas severamente festoneadas, llevó a la identificación del primer gen *CIN-TCP* (Nath et al. 2003); en tomate, la mutación de ganancia de función en el gen *LANCEOLATE* (*LA*) causa una reducción extrema de la complejidad y el tamaño de la hoja, mientras que la sobreexpresión del miR319 que lo regula provoca un incremento en el tamaño de los folíolos y la formación de márgenes ondulados en las hojas (Ori et al. 2007); además, la sobreexpresión del miR319 también causa una expansión en la lámina de la hoja en arroz o en el jopillo (Yang et al. 2013; Zhou et al. 2013). Este papel general bien establecido de los genes *CIN-TCP* en el desarrollo de la hoja en las angiospermas contrasta con la falta casi total de información sobre el papel de los genes *NGA* en el desarrollo de la hoja en otras especies diferentes a *Arabidopsis*. Un estudio reciente de nuestro laboratorio muestra que los genes *NGA* juegan papeles similares en el desarrollo del gineceo en especies alejadas dentro de las eudicotiledóneas y que, al menos en *Nicotiana benthamiana*, otros órganos laterales como pétalos o sépalos están también afectados por la reducción de los niveles de expresión de *NGA* (Fourquin and Ferrandiz 2014), sugiriendo que la función de *NGA* en el control del crecimiento de los órganos laterales podría estar también conservada. En esta tesis mostramos que la regulación de los genes *NGA* por factores TCP CIN-like está posiblemente conservada en otras especies basándonos en la comparación de las secuencias de los promotores de

*NGA* en dichas especies y en los resultados de experimentos de expresión transitoria. Estas estrategias, aún siendo sencillas, nos han permitido proponer la existencia de un módulo regulador que podría ser importante para el correcto desarrollo de la hoja en especies cultivadas, y que por tanto justificaría la realización de estudios funcionales más profundos tanto para obtener nuevos conocimientos en cuestiones básicas acerca de los procesos de morfogénesis de la hoja, como para la identificación de nuevas dianas para la mejora biotecnológica de los cultivos.

### 1.3.- ¿Regulan los factores SPL y TCP a los genes *NGA* de manera independiente?

Se ha descrito que el factor SPL9 es capaz de interactuar físicamente con TCP4, un factor TCP CIN-like (Rubio-Somoza et al. 2014). Esta interacción interfiere en la formación de heterodímeros TCP4/CUC, de modo que cuando los niveles de SPL9 aumentan, se forman los heterodímeros SPL9/TCP4, secuestrando en cierta medida a los factores TCP4, y así favoreciendo la formación de homodímeros CUC y la activación de sus dianas, que en último término controlan la forma del margen de las hojas (Rubio-Somoza et al. 2014). La interacción descrita entre SPL9 y TCP4 nos llevó a plantearnos si los factores SPL de clado II y TCP2/TCP3 también podrían formar heterodímeros. Por otro lado, y puesto que el fragmento de 270 pb conservado en los promotores de los genes *NGA* parece contener secuencias de unión tanto para los factores SPL de clado II como para TCP2 y TCP3, podíamos pensar que estos factores podían unirse como heterodímeros a este fragmento. Sin embargo, mediante ensayos de BiFC, hemos observado que TCP1, TCP2 y TCP3 no son capaces de interactuar con SPL14. Aunque este resultado no apunta a que la actividad reguladora de los factores SPL y TCP sobre los genes *NGA* sea conjunta o tenga un cierto grado de interdependencia tampoco lo excluye, por lo que sería interesante profundizar en el análisis genético para explorar esta posibilidad.

### 1.4.- Otros posibles reguladores de los genes *NGA*.

Los escrutinios de híbrido simple de levadura que llevamos a cabo para identificar posibles reguladores de los genes *NGA* partieron de una región conservada entre los cuatro promotores y que por tanto parecía a priori que pudiera tener relevancia funcional. Esta estrategia nos ha permitido identificar a los factores SPL del clado II y a dos factores TCP de tipo CIN-like como posibles reguladores transcripcionales de los genes *NGA*. Tanto los genes *SPL* identificados como los *TCP* participan fundamentalmente en los procesos de desarrollo de la hoja y no parecen tener papeles importantes en la

## DISCUSIÓN

morfogénesis del gineceo. El hecho de que los resultados obtenidos estén principalmente relacionados con el papel de los genes *NGA* en los procesos de morfogénesis de la hoja no es demasiado sorprendente si tenemos en cuenta el origen evolutivo común de todos los órganos laterales de la planta. Se ha propuesto que los carpelos y el resto de órganos florales provienen de modificaciones a partir de las hojas y diversas evidencias experimentales apoyan este punto de vista: los órganos florales se convierten en hojas en plantas en las que todos los genes de función A, B y C, o los genes con función E se inactivan (Coen and Meyerowitz 1991; Pelaz et al. 2000). Además, la expresión ectópica de combinaciones de genes A, B o C con SEP (función E) convierte las hojas en órganos florales (Honma and Goto 2001). Así es esperable que genes que ejercen una función de desarrollo en hoja tengan funciones también en el gineceo, ya sea en solitario o en combinación con otros factores específicos de carpelo.

Pese a todo, resulta algo sorprendente que no obtuvieramos ningún regulador cuya función principal descrita estuviera ligada al desarrollo del carpelo. Esto puede deberse quizá a que el elemento elegido para los escrutinios de simple híbrido de levadura es un elemento común de órganos laterales. Sería interesante observar cómo el patrón de expresión de *NGA* se modifica en líneas reportadoras, por ejemplo, en las que se eliminara este elemento. Otro abordaje que podríamos llevar a cabo si quisieramos conocer elementos específicos de carpelo sería diseccionar el promotor, por ejemplo, mediante análisis de deleciones, para encontrar esos elementos y utilizarlos en otro escrutinio de simple híbrido de levadura. Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada: por ejemplo, en el laboratorio del Dr. Madueño analizaron el promotor de *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* mediante *phylogenetic shadowing* y los resultados obtenidos se combinaron con los de un análisis de deleciones del promotor para después utilizar una de esas regiones reguladoras en un escrutinio de híbrido simple que puso de manifiesto que los factores de transcripción *TCP7* y *ARABIDOPSIS VASCULAR ONE-ZINC FINGER 1 (VOZ1)*, son capaces de unirse al promotor de *TFL1* (Fernández-Nohales 2011; Zambrano Rodriguez 2013; Serrano-Mislata 2010, 2016). También Nguyen et al. (2016) identificaron que los factores de transcripción  $\Upsilon$ MYB1 y  $\Upsilon$ MYB2 son capaces de unirse a una región del promotor de la *PHOSPHOLIPASE A2- $\Upsilon$  (PLA2- $\Upsilon$ )* utilizando la misma estrategia (Nguyen et al. 2016).

Por otro lado, en el segundo escrutinio de híbrido simple con la genoteca de factores de transcripción RR obtuvimos también como positivos otros factores candidatos. Cuando realizamos la comprobación de los positivos obtenidos en un nuevo ensayo independiente solo fueron confirmados los que seleccionamos para su estudio posterior. Sin embargo, dado que no podemos descartar por completo que obtuviéramos resultados negativos por algún problema o alteración en las condiciones experimentales

utilizadas en estas comprobaciones, sería interesante volver a considerar estos posibles reguladores explorando su posible actividad sobre el promotor de *NGA3* en otros experimentos diferentes, como por ejemplo los de activación transitoria en planta de *NGA3::LUC*. De hecho, aunque algunos son de función desconocida, como *MYB4R1*, o han sido relacionados con procesos muy diferentes, como la defensa frente a patógenos en el caso de *TGA1* (Wang and Fobert 2013), al menos algunos de ellos parecen tener papeles en el desarrollo del gineceo o en el control de la proliferación celular. Por ejemplo *ERF056* (At2g22200) pertenece a la misma subfamilia dentro de los AP2/ERF que los genes *WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION (WIND)*, que han sido caracterizados por su papel en la desdiferenciación y subsecuente proliferación celular asociada a la formación de callos (Iwase et al. 2011), procesos de algún modo relacionados con los que regulan algunos factores TCP (Ikeda and Ohme-Takagi 2014). También *KNAT2* presenta características que hacen plausible su relación funcional con los genes *NGA*. *KNAT2* se expresa en el gineceo, en los márgenes de valva y placentas, solapando parcialmente con el dominio de expresión de los genes *NGA* (Pautot et al. 2001); aunque los mutantes *knat2* no presentan defectos fenotípicos evidentes, se ha descrito que *KNAT2* y sus parálogos cercanos *KNAT6*, *BP* y *STM* participan de un modo parcialmente redundante en la regulación de la proliferación celular, el mantenimiento de los meristemas, la deposición de lignina y en procesos de separación celular (Arnaud and Pautot 2014). Todo ello es compatible con un posible papel regulador de *KNAT2* y/o de sus parálogos cercanos sobre los genes *NGA*, que sería interesante explorar con mayor profundidad en trabajos futuros.

### **2.- La relación funcional de los factores *NGA* con otros factores bHLHs claves para la morfogénesis del gineceo.**

#### 2.1.- La relación funcional entre los genes *NGA* y *HEC*.

La parte apical del gineceo está coronada por células epidérmicas especializadas en la recepción del polen llamadas papilas estigmáticas y que conectan el estigma apical con el ovario. Durante la polinización los granos de polen germinan en el estigma y los tubos polínicos son guiados a través del tracto de transmisión hasta los óvulos, donde tiene lugar la fecundación

Como ya hemos mencionado anteriormente, los genes *NGA* promueven el desarrollo de los tejidos apicales en el gineceo de *Arabidopsis* (Trigueros et al. 2009), función que comparten parcialmente con los genes de tipo bHLH *HEC*, involucrados tanto en el desarrollo del tracto de transmisión como del estigma (Gremski et al. 2007). Podemos encontrar otros paralelismos entre los genes *NGA* y *HEC*. Por ejemplo, ambas familias comparten un alto grado de redundancia funcional entre sus miembros y muestran fenotipos de pérdida de función dependiente de dosis. También sus patrones de expresión son solapantes y, además de las similitudes entre sus fenotipos de pérdida de función, también son similares los fenotipos de sobreexpresión: las líneas de sobreexpresión de *HEC* y *NGA* se caracterizan por presentar carpelos con ovarios reducidos, ginoforos alargados y partes apicales engrosadas con estigmas agrandados. Estas similitudes tan sorprendentes sugerían una relación funcional significativa entre ambas familias, que hemos investigado fundamentalmente mediante abordajes genéticos.

Los resultados más importantes del análisis genético que hemos realizado para determinar la posible naturaleza de la interacción entre *HEC* y *NGA* son los siguientes:

(a) En primer lugar, las mutaciones *hec* suprimen el efecto de las líneas *35S::NGA3* en el desarrollo del gineceo, es decir, que las alteraciones en el desarrollo del gineceo y el fruto producidas por la sobreexpresión de *NGA3* dependen de la presencia de la función *HEC*. Por otro lado, también hemos observado que la sobreexpresión de *HEC* no es capaz de promover la formación de los tejidos apicales del gineceo en los mutantes *nga*. Por lo tanto, ni los factores *HEC* ni los *NGA* parecen ser capaces de dirigir la formación de la parte apical del gineceo en ausencia de la expresión del otro.

(b) El patrón espacial de expresión en las líneas *HEC1::HEC1:GUS*, *HEC2::GUS* y *HEC3::GUS* en fondos mutante *nga* y las líneas de sobreexpresión de *NGA3* no cambia apreciablemente respecto al silvestre, aunque sí hay cambios en el nivel de expresión.

Tampoco observamos cambios en el patrón de expresión de las líneas *NGA3::GUS* en fondo mutante *hec1 hec3* y *35S::HEC3*.

(c) Los factores bHLH, como *HEC*, pueden formar homodímeros y heterodímeros sugiriendo que tienen la posibilidad de participar en un amplio conjunto de interacciones combinatorias (Gremski et al. 2007; Toledo-Ortiz et al. 2003). De hecho, mediante ensayos de BiFC y de doble híbrido de levadura, hemos comprobado que los factores *HEC* y *NGA* son capaces de heterodimerizar. Además, la sobreexpresión simultánea de *HEC3* y *NGA3* tiene un efecto fuertemente sinérgico en el desarrollo, destacando la formación de gineceos con ovarios reducidos y estériles, con una parte apical ensanchada prácticamente cubierta de células estigmáticas, valvas muy reducidas o ausentes y ginóforos alargados.

Estos resultados en su conjunto sugieren que el desarrollo del estigma está regulado por un complejo transcripcional que incluiría necesariamente a los factores *HEC* y *NGA*.

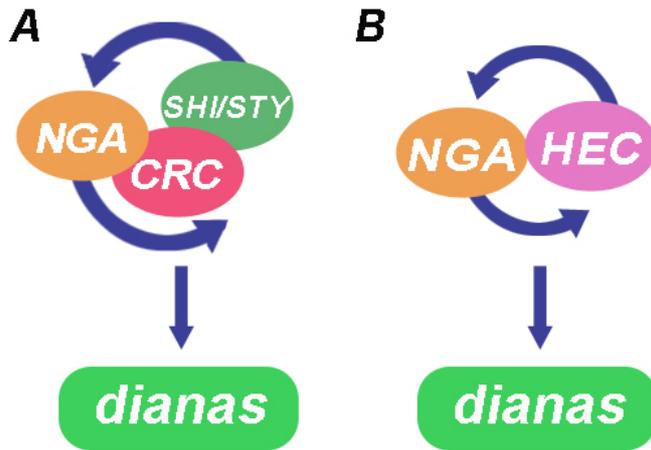
Este escenario presenta grandes similitudes con el que se deduce de los resultados descritos en Trigueros et al., (2009) y en Trigueros (2008). En estos trabajos, realizados en el mismo laboratorio donde se ha desarrollado esta tesis, se demuestra que los genes *NGA* y los genes *SHI/STY* interactúan cooperativamente para dirigir la morfogénesis de las regiones apicales del gineceo.

De nuevo, los genes *SHI/STY*, al igual que los *NGA* o los *HEC*, actúan de modo altamente redundante y los fenotipos de pérdida de función de los mutantes múltiples en los genes *SHI/STY* son muy similares a los de los mutantes múltiples en los genes *NGA*. Los patrones de expresión de los genes *SHI/STY* y *NGA* también son similares y al menos en varios de los casos estudiados, el patrón espacial de expresión de unos no cambia significativamente en los fondos de pérdida o ganancia de función de los otros y viceversa (Trigueros et al. 2009), lo cual indica que no se relacionan entre sí jerárquicamente dentro de una ruta génica lineal de regulación transcripcional. Sin embargo, Alvarez et al., (2009) y Ståldal et al., (2012) observaron que la expresión de *NGA2* y *NGA4* se incrementa en fondos con la actividad de *SHI/STY* aumentada, así como que se observa una reducción de los niveles de expresión de *STY2* y *SRS5* en fondo mutante *nga* (Alvarez et al. 2009), mientras que en un estudio transcriptómico realizado en nuestro laboratorio por el Dr. Vicente Balanzá se observa la reducción de los niveles de expresión de varios genes *SHI/STY* (en concreto *STY2*, *SRS3*, *SRS5*, *SRS7* y *LRP1*) en gineceos de estadíos 8-13 de los mutantes cuádruples *nga* (Martínez-Fernández et al. 2014). Todo ello sugiere que podría darse un bucle de retroalimentación positiva que modularía la expresión de los genes *NGA* y de los miembros de la familia *SHI/STY* durante el desarrollo del gineceo (Fig. D1.A) (Ståldal et al. 2012; Trigueros et

## DISCUSIÓN

al. 2009). Esta situación también es similar a la que podemos deducir de los análisis de expresión de *HEC* y *NGA* en los fondos mutantes estudiados: aunque no se observan cambios en el dominio espacial de las líneas reportadoras, sí parecen detectarse cambios en los niveles de expresión. De hecho, los datos obtenidos en el análisis transcriptómico mencionado (Martinez-Fernandez et al. 2014) confirman que los niveles de *HEC1*, *HEC2* y *HEC3* se encuentran reducidos fuertemente en los gineceos de estadíos 8-13 de los mutantes cuádruples *nga*. En cualquier caso, sería interesante realizar hibridaciones *in situ* de RNA para estudiar la expresión de los genes *HEC* en fondos con actividad *NGA* alterada y viceversa, con la finalidad de comprobar si ambos factores, *NGA* y *HEC*, además de interactuar y actuar conjuntamente para regular posibles dianas comunes, también se podrían autorregular (Fig. D1.B), ya que como hemos mencionado anteriormente, las líneas reporteras de *HEC* utilizadas en este trabajo solo reproducen parcialmente el patrón espacial de expresión de los genes *HEC* determinado por hibridación *in situ* de los correspondientes mRNAs, por lo que es probable que no contengan todos los elementos necesarios para la regulación correcta de los genes *HEC* y por ese motivo no seamos capaces de observar posibles cambios en el patrón de expresión (Gremski et al. 2007).

Además de la relación regulatoria similar entre *NGA-SHI/STY* y *NGA-HEC*, también se encuentran parecidos en su relación genética, como por ejemplo, los fuertes fenotipos sinérgicos de los dobles mutantes *nga3 sty1* o de las líneas *35S::NGA3 35S::STY1*, donde las células de la epidermis de la valva son reemplazadas completamente por células de estilo, una situación de algún modo análoga a la formación ectópica de estigma observada en las líneas *35S::NGA3 35S::HEC3*. Por otro lado, ni la sobreexpresión de *NGA3* es capaz de suprimir los defectos en la formación del estilo y el estigma de los mutantes *shi/sty* ni la sobreexpresión de *STY1* lo hace en los mutantes *nga* (Navarrete-Gómez 2011), por lo que se puede concluir que los factores de las dos familias se requieren simultáneamente para dirigir la formación de los tejidos apicales del gineceo. No se ha podido detectar la interacción física directa entre factores *NGA* y factores *SHI/STY*, aunque ambos son capaces de heterodimerizar con *CRC*, posiblemente formando un complejo de mayor orden *NGA/STY/CRC*. Distintas evidencias genéticas obtenidas en el laboratorio apuntan a que este complejo sería el que, en último término, dirigiría la formación del estilo (Navarrete-Gómez 2011 y Gomariz-Fernández, no publicado).



**Figura D1: Hipótesis sobre la posible interacción de los genes *NGA*.** (A) Posible interacción de los genes *NGA*, *CRC* y *SHI/STY* en la regulación de dianas como por ejemplo *YUCCA* (Alvarez et al., 2009; y Ståldal et al., 2012; Trigueros et al., 2009). (B) Posible interacción de los genes *NGA* y *HEC*.

Nuestros resultados indican que *NGA* y *HEC* también podrían actuar en forma de complejo para regular dianas comunes. En base a diversas evidencias, como los fenotipos de los mutantes y líneas de sobreexpresión ya descritos o los del análisis transcriptómico de los gineceos *nga*, podemos proponer algunos candidatos. *NGA* y *HEC* presentan un papel sinérgico en el control de la señalización de la ruta de las auxinas. Los fenotipos de los mutantes múltiples *nga* o *hec* muestran reducción de la fertilidad y pétalos y sépalos agrandados, rasgos que se han vinculado a defectos en la síntesis, señalización o regulación del transporte de auxina en numerosos estudios (Cheng et al. 2006; Okada et al. 1991; Varaud et al. 2011); también la sobreexpresión de los genes *HEC* y *NGA* bajo el control del promotor CaMV35S, da lugar a frutos con ovarios reducidos, regiones apicales engrosadas y ginóforos largos e, incluso, los fenotipos más severos recuerdan a los de pérdida de función del transportador de flujo de salida de auxinas *PIN1* o a los de *PID*, quinasa que controlan la localización polar de éste, así como a los de las plantas tratadas con el inhibidor del transporte de auxinas NPA (Gremski et al. 2007; Trigueros et al. 2009). Todo ello sugiere que *HEC* y *NGA* pueden interferir potencialmente con la homeostasis, el transporte o la respuesta a auxinas. No se conocen las dianas directas de *NGA*, aunque sí que muchos genes relacionados con las rutas de señalización de auxinas están desregulados en fondos con actividad *NGA* alterada (Martinez-Fernandez et al. 2014). Entre ellos, destacan algunos genes *YUCCA* (*YUC*), que codifican para flavin-monooxigenasas de la ruta de biosíntesis de auxinas, ya que la expresión de *YUC2*, *YUC4* o *YUC8* se reduce significativamente en los tejidos apicales de los gineceos de líneas amiRNA-*NGA* (líneas con niveles reducidos de expresión de los cuatro genes *NGA* por la sobreexpresión de un miRNA artificial diseñado para degradarlos específicamente) o en los mutantes múltiples *nga* (Martinez-Fernandez et al. 2014; Trigueros et al. 2009). Por otro lado, existen datos publicados sobre el efecto sobre el transcriptoma de la inducción de *HEC1* (Schuster et al. 2015), encontrándose que es capaz de activar la expresión de *YUC4* y así señalando a este gen

## DISCUSIÓN

como potencial diana del complejo NGA-HEC. Otras dianas directas de HEC1 previamente identificadas son *PIN1*, *PIN3*, *ARR5*, *ARR7* y *ARR15* (Schuster et al. 2015; Schuster et al. 2014), también posiblemente dianas de NGA, pero esto será discutido más adelante.

Partiendo de que las mutaciones *hec* suprimen completamente el fenotipo *35S::NGA3*; de que, como hemos descrito, NGA3 (y probablemente los otros factores NGA) hacen parte de sus funciones a través de su interacción con STY1; y de que los fenotipos de pérdida de función de los mutantes múltiples *shi/sty* y los *nga* son prácticamente idénticos, cabe preguntarse hasta qué punto el requerimiento mutuo de NGA y HEC para realizar sus funciones puede extenderse a los factores SHI/STY. De hecho, se ha determinado que *YUC4* es una diana directa de STY1 (Sohlberg et al. 2006). Además, en el laboratorio se ha comprobado que al menos STY1 y STY2 también son capaces de heterodimerizar con los factores HEC (Patricia Ballester y Mónica Colombo, resultados no publicados), lo cual es compatible con la posible formación de un complejo NGA/HEC/STY con actividad transcripcional que dirigiría específicamente la formación del estigma. Para comprobar esta hipótesis, sería necesario realizar un análisis genético de la interacción *STY/HEC* similar al que hemos llevado a cabo para *NGA* y *HEC*, y que en estos momentos estamos iniciando.

### 2.2.- La relación funcional entre los genes *NGA*, *HEC* y otros factores bHLH.

Como ya se ha mencionado, junto con los factores HEC, otros miembros de la familia bHLH tienen papeles relevantes en la formación de los tejidos apicales del gineceo de *Arabidopsis*. Los factores HEC están estrechamente relacionados con IND, con el que comparten una gran similitud de secuencia y junto al que pertenecen a un grupo atípico de factores bHLH que presentan una sustitución de un glutámico, importante para la unión del dominio básico al DNA, por una alanina (Gremski et al. 2007). IND tiene un papel esencial en el desarrollo de la zona de dehiscencia, aunque también se ha descrito que participa en la formación de los tejidos apicales junto con SPT, otro factor de tipo bHLH (Girin et al. 2011). SPT presenta menor similitud de secuencia con HEC/IND pero también controla el desarrollo del tejido marginal del carpelo al promover el crecimiento del estigma, el estilo y el septum. Además, se expresa más ampliamente durante el desarrollo que *HEC* o *IND*, abarcando los dominios de expresión de ambos (Gremski et al. 2007). Por otro lado, tanto HEC como IND son capaces de heterodimerizar con SPT (Girin et al. 2011; Gremski et al. 2007), y, al menos en el caso del complejo SPT-IND, esta interacción es esencial para su función en la morfogénesis de los tejidos apicales del gineceo (Girin et al. 2011).

Tanto los resultados obtenidos en esta tesis doctoral como otros producidos en nuestro mismo laboratorio y por otros grupos sugieren que la formación del estigma no sólo depende de la formación del complejo HEC/NGA, sino que también es necesaria la presencia de los factores IND y SPT. Como ya hemos mencionado, el trabajo de Girin et al. (2011) muestra que IND es capaz de activar a *SPT* y que posteriormente ambos factores heterodimerizan de forma obligada para regular a sus dianas comunes. En este contexto, proponemos que el complejo HEC-NGA sería capaz de regular a *IND*, que, interaccionaría a su vez con NGA, o con el complejo HEC-NGA para dar lugar a otro complejo mayor que a su vez activaría a *SPT*. Una vez presente, *SPT* se incorporaría al complejo y posiblemente éste sería capaz de regular a las dianas responsables de la formación del estigma (Fig. D2. A).

Podemos resumir las evidencias que apoyan esta hipótesis:

a. Existe una gran similitud entre los fenotipos observados en las líneas de sobreexpresión de *HEC*, *NGA* e *IND*. Sin embargo, la expresión ectópica de *SPT* es incapaz de inducir anomalías en el desarrollo del gineceo a menos que se le fusione un dominio de activación fuerte, lo cual puede explicarse si la actividad de *SPT* sobre sus dianas requiere de su interacción con otros factores (Groszmann et al. 2008). Los mutantes múltiples *hec* y el doble mutante *spt ind* también presentan gran similitud, con estilos sin tracto de transmisión y ausencia de papilas estigmáticas, aspectos que comparten con los mutantes cuádruples *nga*, donde no hay desarrollo de estilo ni estigma (Girin et al. 2011; Gremski et al. 2007; Liljegren et al. 2004; Trigueros et al. 2009). Estas similitudes indican que todos estos genes participan en la misma ruta, pero no permiten distinguir por sí solas la topología y jerarquía regulatoria de esa ruta.

b. El dominio espacial de expresión tanto de *SPT* como de *IND* se encuentra expandido en las líneas *35S::NGA3*, indicando que *IND* y *SPT* estarían siendo regulados por NGA. Esta expansión no es extensiva a todo el gineceo o el fruto, indicando que los factores NGA, para activar directa o indirectamente a *IND* y *SPT*, podrían requerir de la presencia de factores adicionales. Los candidatos más probables serían los factores HEC, ya que en las líneas *35S::NGA3 hec1 hec3* la expresión de *SPT* e *IND* no se expande.

c. Del mismo modo que ocurre en las líneas *35S::NGA3 hec1 hec3*, en las que se suprime el fenotipo de sobreexpresión de *NGA*, las mutaciones *ind* y *spt* suprimen parcialmente las alteraciones en el desarrollo del gineceo y el fruto observadas en las líneas *35S::NGA3*, lo que concuerda con que *IND* y *SPT* pudieran estar regulados por *NGA* en una posición posterior en la ruta. Sin embargo, la formación de estigma ectópico producida por la sobreexpresión de *IND* se suprime parcialmente en los fondos mutantes

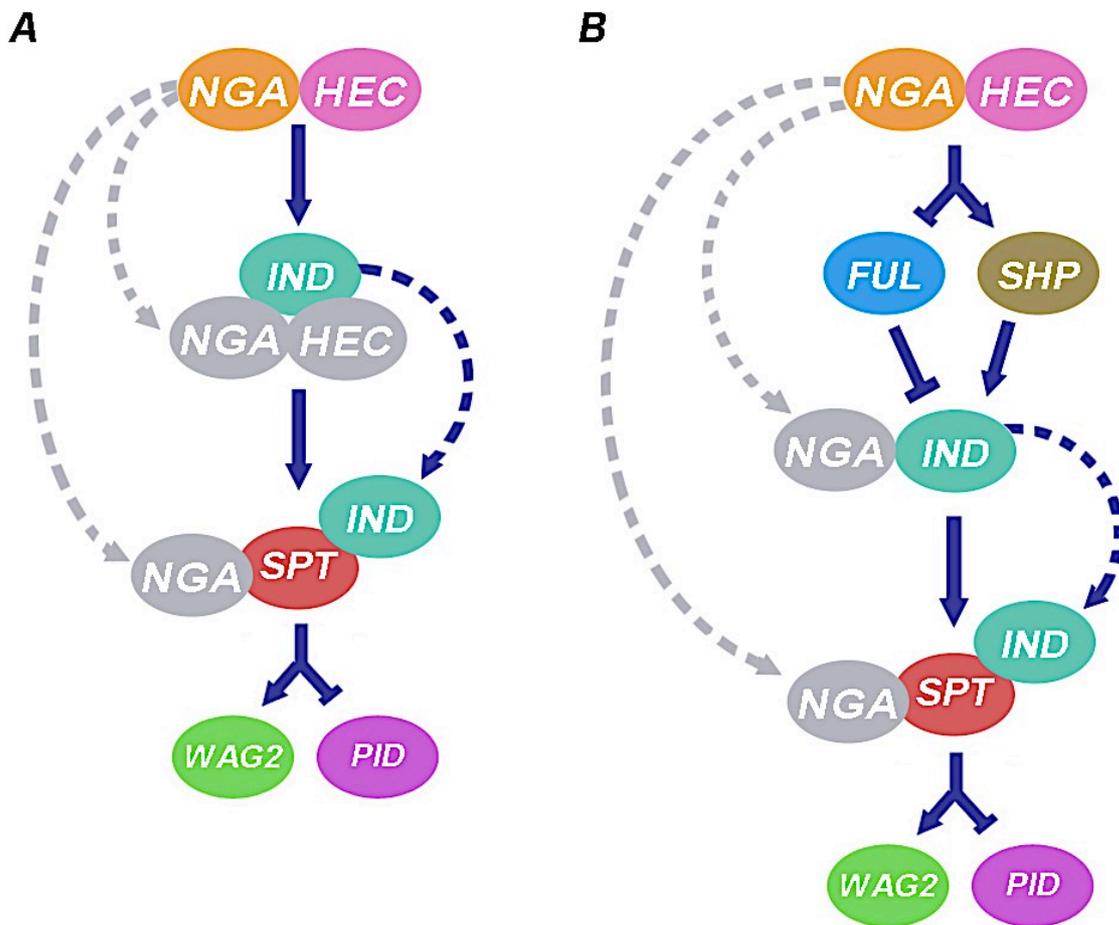
## DISCUSIÓN

*hec* y totalmente en fondos *nga*, lo que indica que IND requiere de la presencia de estos factores para realizar dichas funciones.

d. Todos los factores HEC, NGA, IND y SPT son capaces de interaccionar proteína-proteína entre sí, aunque en los ensayos de levadura hemos obtenido resultados contradictorios en la interacción de los factores NGA y SPT donde se observó que no son capaces de interaccionar en todas las condiciones (Mónica Colombo, comunicación personal).

e. La unión de IND al promotor de sus genes diana parece depender de la presencia de los factores NGA, ya que en los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina que hemos llevado a cabo y que recapitulan los previamente publicados en Girin et al. (2011) se detecta la unión de IND en fondo silvestre pero no en fondo mutante *nga*.

El modelo que proponemos concuerda bien con los resultados que acabamos de enumerar. Sin embargo, quedan algunas cuestiones abiertas y escenarios alternativos que deberíamos comprobar. Por ejemplo, no hemos determinado si la activación de *IND* por HEC-NGA es directa o indirecta: así, resultados previos del laboratorio han mostrado que *FUL* y *SHP* podrían estar regulados por NGA (Navarrete-Gómez 2011) y, dado que tanto *FUL* como *SHP* son reguladores de *IND*, es posible proponer que éstos podrían mediar la activación de *IND* por NGA/HEC (Fig. D2. B), (Ferrándiz et al. 2000b; Liljegren et al. 2004). De hecho, las mutaciones *shp* suprimen parcialmente el fenotipo de sobreexpresión de *NGA3* (Navarrete-Gómez 2011), lo cual parecería apoyar esta hipótesis. Por otro lado, tampoco hemos probado fehacientemente la existencia del complejo NGA/HEC/IND/SPT, ni hasta qué punto éste es funcional: si IND sólo requiriera a NGA para activar a *SPT*, también podrían explicarse bien los fenotipos observados e incluso la falta de unión de IND a los promotores de *PID* y *WAG2*, ya que la presencia conjunta de SPT e IND podría ser necesaria y suficiente para que se diera esta unión (Fig. D2. B). Otro aspecto poco explorado es la posible retroregulación de *NGA* y *HEC* por IND y SPT; sería necesario determinar los patrones de expresión de *NGA* y *HEC* en los fondos correspondientes y así completar con mayor profundidad el estudio de las interacciones regulatorias entre todos ellos.



**Figura D2: Modelos de acción planteados para los factores NGA y HEC. (A)** En el modelo se representa que el complejo formado por NGA y HEC es capaz de regular a *IND*; *IND*, o bien, el complejo formado por NGA, HEC e *IND*, es capaz de regular a *SPT* y finalmente el complejo formado por *IND* y *SPT*, o bien, el complejo formado por NGA, *IND* y *SPT*, es capaz de regular dianas comunes, como *PID* y *WAG2*. **(B)** En el modelo se representa que el complejo formado por NGA y HEC es capaz de regular a *SHF* y *FUL*; éstos a su vez son capaces de regular a *IND*, o bien, a el complejo formado por NGA e *IND*; *IND*, o bien, el complejo formado por NGA e *IND*, es capaz de regular a *SPT* y finalmente el complejo formado por *IND* y *SPT*, o bien, el complejo formado por NGA, *IND* y *SPT*, es capaz de regular dianas comunes, como *PID* y *WAG2*.

Además de estas evidencias, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran el posible papel del complejo formado por NGA-HEC en la regulación de la ruta de señalización de auxinas, papel que ha sido asignado previamente también al complejo IND-SPT (Girin et al. 2011). Por otro lado, recientemente ha sido puesto de manifiesto que los factores de transcripción HEC controlan el desarrollo del gineceo junto con SPT actuando sobre el equilibrio de las respuestas a las fitohormonas, más notablemente auxinas y citoquininas (Schuster et al. 2015). De nuevo, es posible encontrar paralelismos entre los factores HEC y NGA que apoyan que éstos últimos podrían estar implicados en esta mismas funciones. Por ejemplo, los factores HEC controlan la expresión de *YUC4* y por tanto la señalización de auxinas, como ya hemos mencionado antes, y sería interesante comprobar si *NGA* coopera en esta regulación junto con HEC, o por vías diferentes. Pero también se ha demostrado que los genes *HEC* dirigen la expresión de algunos transportadores de auxinas *PIN*. Schuster et al., (2015) muestran

## DISCUSIÓN

que los niveles de expresión de *PIN1* se ven incrementados en fondos *35S::HEC1*, y que los niveles de *PIN1* y *PIN3* disminuyen en fondos *hec1 hec2 hec3*. De nuevo, los factores *NGA* podrían compartir estas funciones, ya que en nuestro grupo hemos observado que los niveles de *PIN3* en fondos *35S::NGA3* se incrementan, sugiriendo que los genes *NGA* dirigen la expresión de *PIN* de modo directo o indirecto (Martinez-Fernandez et al. 2014).

Los genes *HEC* están estrechamente integrados en la red de señalización de auxinas también a otros niveles: las auxinas estimulan la expresión de *HEC1*, y por otro lado, la actividad de *HEC* y *SPT* se encuentra limitada a través de la función del factor de respuesta a auxinas *ARF3/ETT* (Gremski et al. 2007; Heisler et al. 2001). Tanto la expresión de los genes *HEC* como la de *SPT* se expande hacia las zonas basales y abaxiales del gineceo en fondos mutantes *ett*, de los que se deduce que *ETT* regula negativamente la expresión de *HEC* y *SPT* en el gineceo (Gremski et al. 2007; Heisler et al. 2001). Notablemente, al analizar el patrón de expresión de *NGA3* en un fondo mutante *ett* también se observa un aumento de la expresión de *NGA3* en el estilo, descendiendo hacia la zona abaxial de las valvas y en el ginóforo (Trigueros 2008), por lo que parece que *ETT*, al igual que lo hace con *SPT* y *HEC*, estaría reprimiendo a los genes *NGA* restringiendo su expresión a la zona apical del gineceo. La expresión ectópica similar de *NGA*, *HEC* y *SPT* en fondo *ett* indica la correulación de estos factores y apoya la hipótesis de la función del complejo propuesto en la formación del estigma, que se observa de modo ectópico en los mutantes *ett*.

En relación a las citoquininas, los factores *HEC* promueven la expresión de los genes *REGULADORES DE RESPUESTA DE TIPO A (ARR)* cuya función es amortiguar las respuestas a citoquininas y que se ha demostrado que son reprimidos por *WUSCHEL (WUS)*, involucrando a *HEC* en el bucle de retroalimentación *WUS-CLAVATA (CLV)* que controla el número de células madre y la tasa de proliferación y por tanto, en el mantenimiento del SAM (Schuster et al. 2014).

Schuster et al., (2014) determinan que *HEC1* tiene funciones importantes sobre la actividad de las células madre: primero, *HEC1* reprime la expresión de *CLV3*, y la reducción de esta señal en las células madre ejerce un efecto negativo que expande el meristemo (Fletcher et al. 1999). Sin embargo, los análisis genéticos demuestran que la pérdida de la función de *CLV3* no puede explicar completamente los fenotipos resultantes de la modificación de la actividad *HEC1* en el SAM. En segundo lugar, a través de la activación de *ARR7* y *ARR15*, *HEC1* es capaz de interferir en la expresión de *WUS*, dando lugar a su vez a una reducción en el tamaño del SAM. Finalmente, plantean la hipótesis de que dependiendo de los niveles relativos de *CLV3* y de los *ARRs* de tipo A en las células madre, se amplía o se reduce el tamaño de los meristemas, lo que sugiere que *HEC1* podría actuar como un amortiguador de la función de SAM.

Tal y como hemos mencionado anteriormente, HEC1 es capaz de interactuar con SPT (Gremski et al. 2007; Schuster et al., 2014) y diversos análisis genéticos indican que la función HEC1 en el meristemo es dependiente de la presencia de SPT y por tanto, es un complejo de estas dos proteínas, HEC1 y SPT, el que dicta el potencial proliferativo de las células madre (Schuster et al. 2014), aspecto que es compatible y se ve reforzado ampliamente por nuestro trabajo. Así mismo, Schuster et al., (2015) también estudiaron si HEC juega un papel en la regulación de señalización de citoquininas en el desarrollo del gineceo y el fruto, observando que el tratamiento con citoquininas de gineceos induce una proliferación celular exagerada en mutantes *hec1 hec2 hec3* y *spt*; esta observación hace pensar que el complejo formado por HEC1-SPT ejerce una función en la modulación de la señalización negativa de las citoquininas durante el desarrollo del gineceo. Por otro lado, gracias a una colaboración que hemos llevado a cabo junto al laboratorio del Dr. Stefan de Folter, sabemos que SPT también está involucrado en la señalización de citoquininas a través de la activación de los *ARRs DE TIPO B* en el gineceo de *Arabidopsis* (Reyes-Olalde et al., enviado). Además, tanto SPT como ARR1 pueden jugar un papel crucial en el balance de Aux/CK, ya que también regulan componentes de la vía de señalización de auxinas como TAA1 y PIN3 en estos tejidos, probablemente causando un flujo de auxina dependiente de PIN3. La regulación de *TAA1* y *PIN3* por SPT y ARR1 podría ser en paralelo o de manera cooperativa formando un complejo protéico junto con algún otro cofactor (Reyes-Olalde et al., enviado).

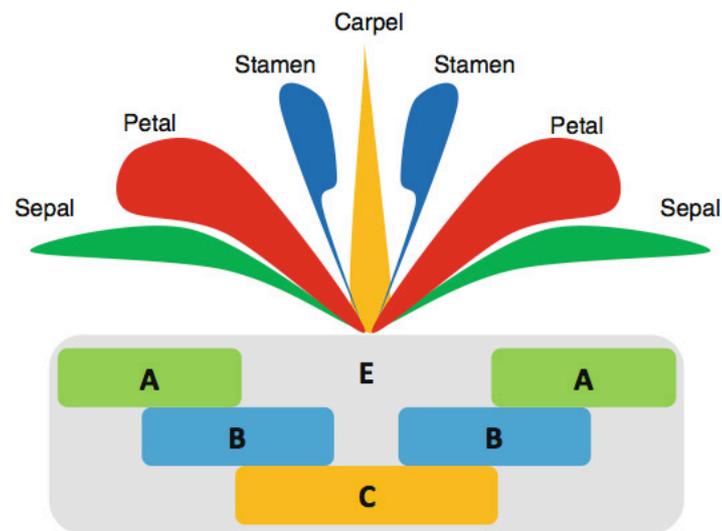
Si nuestro modelo de interacción de HEC y NGA es correcto y ambos se necesitan mutuamente para realizar sus funciones, podríamos sugerir que los factores NGA participan en estas mismas funciones, y así deberíamos comprobar qué ocurre con los *ARRs* de tipo A y B en respuesta a NGA y si los genes *NGA* también intervienen en la regulación del balance de Aux/CK. De hecho, los datos obtenidos en el análisis transcriptómico mencionado anteriormente (Martinez-Fernandez et al. 2014) confirman que en los gineceos de estadíos 8-13 de los mutantes cuádruples *nga* los niveles de *TAA1* se encuentran reducidos fuertemente, mientras que los niveles de *ARR1*, *ARR5*, *ARR7* y *ARR15* se encuentran aumentados significativamente, apoyando fuertemente esta hipótesis.

### 2.3.- Un código combinatorial para explicar la formación de los distintos tejidos del gineceo: la hipótesis del *Carpel-Code*.

A pesar de que se conocen muchas de las funciones génicas necesarias para la correcta formación del gineceo de *Arabidopsis* (Ferrandiz et al. 2010; Ferrándiz et al. 1999); ver apartado I.2 de la introducción), la precisa topología de las redes transcripcionales implicadas no ha podido ser bien resuelta todavía. Se conoce relativamente bien cómo se regulan los factores que dirigen la correcta formación de la zona de dehiscencia, pero no cómo se organizan las rutas genéticas que dirigen la formación de estilo, estigma y tracto de transmisión, por ejemplo, a pesar de que se han publicado numerosos estudios centrados en el análisis genético de estos procesos. Con los resultados obtenidos en este trabajo, en trabajos previos del laboratorio (Trigueros et al. 2009; Navarrete-Gómez 2011) y por otros grupos (Girin et al. 2011; Schuster et al. 2015) proponemos que esto puede deberse a que la formación de estos tejidos podría estar especificada no por rutas más o menos lineales, sino por la combinación de diferentes factores transcripcionales en dominios específicos del gineceo de *Arabidopsis*, de modo que en la composición de cada complejo residiría su especificidad funcional y así distintos factores participarían en distintas funciones según su contexto molecular.

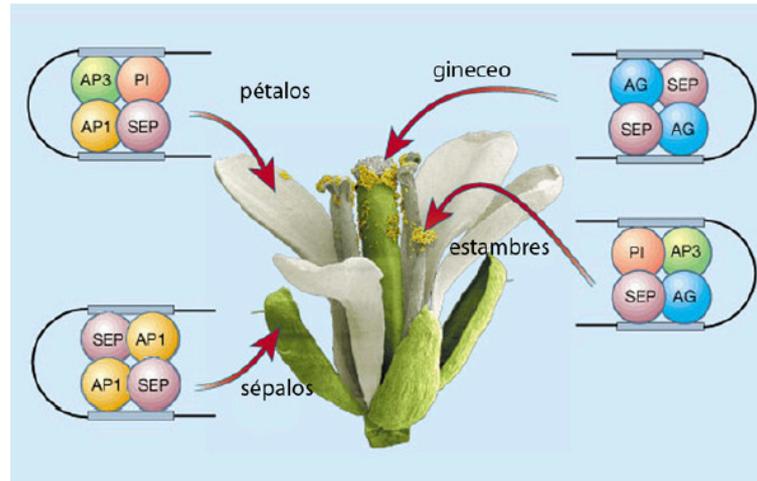
El concepto de código combinatorial no es nuevo, y se pueden encontrar ejemplos similares en otros procesos de desarrollo en plantas. Quizá el ejemplo más representativo y ampliamente aceptado es el modelo ABCE, que permite explicar las interacciones genéticas que confieren la identidad de los distintos órganos florales (Bowman et al. 1991; Coen and Meyerowitz 1991; Krizek and Fletcher 2005; Theissen and Melzer 2007; Weigel and Meyerowitz 1994).

El modelo propone la existencia de cuatro tipos de funciones (A, B, C y E), que equivalen a distintos tipos de factores transcripcionales, y que se combinarían en forma de complejos proteicos en diferentes dominios de expresión, cuya composición dirigiría el desarrollo de los diferentes órganos que forman la flor (Theissen and Saedler 2001); así, las funciones A + E especificarían los sépalos; las funciones A+B+E especifican los pétalos; B+C+E darían lugar a estambres; y las funciones C+E darían lugar a los carpelos (Fig. D.3).



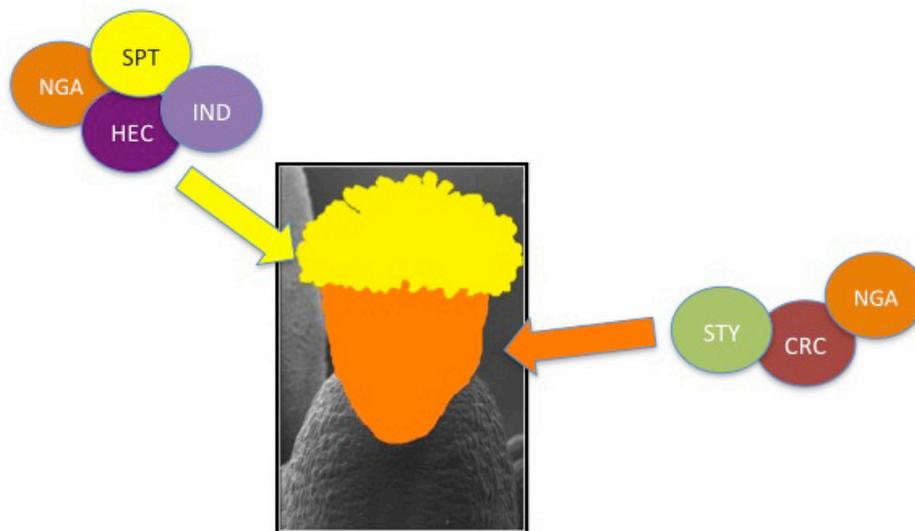
**Figura D3: Modelo ABCE.** Representación del modelo ABCE que explica el establecimiento de las diferentes identidades de los órganos florales. La función A más la E determina la formación de los sépalos; la A más la B y la E la de los pétalos; la B más la C y la E, los estambres; y la C más la E el gineceo (tomada de Chanderbali et al. 2010).

Este modelo, completado con una regla simple de mutua exclusión, según la cual las funciones A y C se reprimen mutuamente, explicaría los fenotipos de los mutantes homeóticos encontrados. Así, mutantes en la clase A dan lugar a transformaciones homeóticas en los dos primeros verticilos de la flor por la expansión de la función C, diferenciándose carpelos en lugar de sépalos, y estambres en lugar de pétalos. Los mutantes de clase B, como *pistillata* (*pi*) y *apetala3* (*ap3*) de *Arabidopsis*, presentan sépalos en lugar de pétalos y carpelos en lugar de estambres. En los mutantes de clase C, como *agamous* (*ag*) en *Arabidopsis*, se produce el cambio de identidad de estambres a pétalos y de carpelos a sépalos. Finalmente, los mutantes que carecen de la función E, como es el caso de los mutantes múltiples *sepallata* (*sep*) de *Arabidopsis*, desarrollan órganos de tipo foliar en lugar de órganos florales, ya que impiden la formación de ningún complejo funcional. La validación casi definitiva de este modelo fue la comprobación de que los factores implicados, identificados en base a sus fenotipos mutantes e interacciones genéticas, formaban tetrámeros funcionales *in vivo* que se unían a los promotores de sus dianas de modo específico y dependiente de la composición de los mismos (Theissen 2001; Theissen and Saedler 2001).



**Figura D4: Modelo ABCE.** Representación gráfica del modelo ABCE donde la expresión combinada de los genes homeóticos A, B, C o E repercute en la identidad del órgano floral. De modo que cuando se expresan los genes de función A y E darán lugar a sépalos (Se), si se expresan conjuntamente con los genes de función B, se formarán los pétalos (Pt), cuando se expresan los genes de función B, C y E, se forman los estambres (St) y cuando únicamente se expresan los genes de función C y E se formará el carpelo (Ca) (Theissen and Saedler 2001).

Nuestro trabajo, que muestra la importancia de la formación de complejos transcripcionales para la correcta morfogénesis del gineceo, nos permite especular sobre la existencia de un escenario similar para dirigir este proceso. En este contexto, queremos proponer un modelo de diferenciación del gineceo que denominamos *Carpel Code*, según el cual la especificación de la identidad de los diferentes tejidos del gineceo estaría basada en un código combinatorial, en el que distintos complejos transcripcionales, compuestos por factores que solaparían en dominios espacio-temporales concretos, darían lugar a la diferenciación de las diferentes partes del gineceo. Estos complejos estarían integrando a factores con expresión más o menos general en la planta, como por ejemplo los factores NGA, SHI/STY o SPT, y a factores que son específicos de carpelo, como son IND o CRC. ¿Pero cuáles son los elementos del código? Los trabajos llevados a cabo en esta tesis doctoral nos llevan a proponer que un complejo que integraría a los factores NGA, HEC, IND y SPT daría lugar a la formación del estigma, el tejido necesario para la correcta recepción y germinación del polen. También, por trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio anteriormente, podemos proponer que un complejo formado por las proteínas NGA, STY y CRC sería necesario para la formación del estilo, el tejido que conecta el estigma con el ovario (Fig. D5) (Trigueros et al. 2009).



**Figura D5: Representación de los elementos propuestos en el CARPEL CODE.** Representación del posible complejo responsable de la formación del estigma en el que participarían (al menos) los factores NGA, HEC, IND y SPT; y la formación del estilo en el que participarían los factores NGA, STY y CRC.

Hasta ahora no hemos podido definir otros componentes de este código, que de momento describe tan solo la formación de los tejidos apicales. No obstante, algunas evidencias adicionales apuntan a que podríamos identificar nuevos elementos. Por ejemplo, el mapa de interacciones proteína-proteína que estamos completando en el laboratorio, junto con los datos de expresión generados por varios grupos y que hemos ido mencionando a lo largo de esta memoria, es compatible con un gran número de posibles complejos alternativos (Marsch-Martinez and de Folter 2016; Chavez Montes et al. 2014). Además, los fenotipos de los mutantes correspondientes a muchos de estos factores de transcripción indican su posible función en la especificación de diferentes dominios, como por ejemplo, *IND* en la del estigma y la zona de dehiscencia, o el de *NTT* en el tracto de transmisión y el replum. Estas y otras posibilidades están comenzando a investigarse en el laboratorio.

#### 2.4.- NGATHA parece funcionar como un cofactor transcripcional.

A lo largo de todo el análisis sobre la función de los genes *NGA* en el desarrollo de los tejidos apicales del gineceo realizado en esta tesis doctoral, hemos podido confirmar como la actividad de *NGA* viene modulada por diferentes interacciones con otros factores, de modo que, dependiendo de donde se exprese y los factores que lo acompañen, la función que realiza puede ser diferente. De hecho, en todos los complejos propuestos en nuestro *Carpel Code*, los factores *NGA* son esenciales y sería necesario que estuvieran presente formando parte de dichos complejos transcripcionales de actividad cooperativa.

## DISCUSIÓN

Los factores NGA, dadas sus características, podrían actuar como una especie de cofactor y ser necesario para la actividad de muchos otros factores, actuando de una manera similar a los factores SEPALLATA (SEP) en el modelo ABCE.

En un trabajo sobre la caracterización molecular de RAV1, un factor de transcripción que codifica dos dominios de unión a DNA, unos de tipo AP2 y otro de tipo B3, muy similar en secuencia al de los factores NGA, se muestra que la unión de éste al 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; Okamura et al. 1997). Eso hace pensar en la posibilidad de que los factores NGA, con un solo dominio B3, podrían precisar dominios de unión a DNA adicionales para aumentar su afinidad de unión al DNA. De hecho, la Dra. Mónica Colombo en nuestro laboratorio trató de determinar la secuencia de unión de DNA a la que se une NGA1 utilizando *protein binding microarrays* (PBMs) en colaboración con los Dres José Manuel Franco y Roberto Solano, del CNB (Madrid) (Godoy et al. 2011). Los resultados obtenidos mostraban que no podían definirse motivos específicos de unión de NGA1, pero que cuando se hibridaban los PBMs con una mezcla de NGA1 y CRC, factor con el que era capaz de dimerizar y para el que sí había sido posible definir una secuencia consenso, ésta se modificaba levemente, de manera que podríamos decir que NGA quizás no une DNA de modo específico pero si podría hacerlo junto con otros factores e incluso modular la afinidad o la especificidad de unión al DNA de estos factores.

Todo ello apoyaría de algún modo la hipótesis del *Carpel Code*, proporcionando además un posible mecanismo molecular para explicar que un mismo factor pueda regular a un conjunto diferente de dianas en función de las interacciones que establece.

## **CONCLUSIONES**



Primera: Los cuatro genes *NGATHA* (*NGA*) comparten un conjunto de reguladores comunes que probablemente actúen a través de regiones conservadas en los cuatro promotores.

- Factores de transcripción de la familia *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*) regulan a los genes *NGA* tanto en órganos vegetativos como en inflorescencias.
- Los factores *SPL* identificados forman un clado específico dentro de la familia *SPL* aún no caracterizado funcionalmente. Nuestros resultados indican que actúan de forma redundante y que pueden afectar de un modo general a la morfogénesis de los órganos laterales de la planta.
- Se han identificado factores de transcripción de la familia *TCP CIN-like* como reguladores de los genes *NGA*.
- Parte de la función de estos factores *TCP* en el control de la expansión de la hoja, previamente descrita, depende de la presencia de *NGA*.
- El módulo de regulación *TCP-NGA* parece estar conservado en diferentes especies de dicotiledóneas.

Segunda: Los factores *NGA* especifican la identidad de diferentes tejidos del gineceo de *Arabidopsis thaliana* formando parte de complejos proteicos con otros factores de transcripción.

- Los factores *NGA* y *HECATE* (*HEC*) forman parte de un complejo transcripcional con actividad cooperativa y se requieren mutuamente para la formación del estigma.
- El complejo formado por *NGA* y *HEC* activa a los genes *INDEHISCENT* (*IND*) y *SPATULA* (*SPT*), que una vez producen los factores de transcripción correspondientes, a su vez se incorporan a un complejo *NGA/HEC/IND/SPT* de orden superior necesario para la correcta señalización de auxinas durante la morfogénesis del gineceo y la formación del estigma en *Arabidopsis*.



First: The four *NGATHA* (*NGA*) genes share a set of common regulators that probably act through conserved regions found in the four promoters.

- Transcription factors from the *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*) family regulate the *NGA* genes in vegetative organs and in the inflorescence.
- The identified *SPL* factors form a specific clade within the *SPL* family that remains to be functionally characterized. Our results indicate that they act in a redundant way and that they may affect, in a general way, the morphogenesis of the plant lateral organs.
- Transcription factors from the *TCP CIN-like* family have been identified as regulators of the *NGA* genes.
- Part of the function of these factors in the control of leaf expansion, previously described, depends on the presence of *NGA*.
- The *TCP-NGA* regulatory module seems to be conserved in different dicot species.

Second: The *NGA* factors specify the identity of the different tissues of the *Arabidopsis thaliana* gynoecium, acting in protein complexes with other transcription factors.

- The *NGA* and *HECATE* (*HEC*) factors form a transcriptional complex with cooperative activity, mutually requiring each other for the formation of the *Arabidopsis* stigma.
- The *NGA-HEC* complex regulates the *INDEHISCENT* (*IND*) and *SPATULA* (*SPT*) genes. Once the corresponding products are present, the *IND* and *SPT* factors incorporate to a higher-order *NGA/HEC/IND/SPT* complex required for correct auxin signaling during *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis and stigma development.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



**1.- Material biológico.**1.1.- Material bacteriano.

En este trabajo se han utilizado las siguientes cepas bacterianas:

**Tabla M.1: Cepas bacterianas utilizadas.**

CEPA	USO	ORIGEN/REFERENCIA
<i>Escherichia Coli</i> DH5 $\alpha$	Clonaje de vectores	(Hanahan 1983)
<i>Escherichia Coli</i> Supercharge EZ10	Clonaje de vectores	Clontech
<i>Escherichia Coli</i> DB3.1 <sup>TM</sup>	Clonaje de vectores portadores del gen ccdB del sistema Gateway	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (sinónimo de <i>Rhizobium radipbacter</i> ) C58 pMP90	Transformación de <i>Arabidopsis</i>	(Koncz 1986)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 pMP90 + pSOUP	Clonaje de vectores pGreen utilizados para la transformación de plantas.	(Hellens et al. 2005)

1.2.- Material vegetal.

En este trabajo se han utilizado las siguientes plantas de *Arabidopsis thaliana*:

1.2.1.- Ecotipo silvestre:**Tabla M.2: Ecotipo silvestre utilizado en esta tesis.**

GENOTIPO	CÓDIGO NASC	REFERENCIA
Col-0	N1092	(Redeí 1962)

1.2.2.- Líneas mutantes:**Tabla M.3: Líneas mutantes utilizadas en esta tesis.**

GENOTIPO	ECOTIPO	MUTÁGENO	REFERENCIA
<i>nga1-4</i>	Col-0	T-DNA	(Trigueros et al. 2009)
<i>nga2-2</i>	Col-0	Transposón dSpm	(Trigueros et al. 2009)
<i>nga3-3</i>	Col-0	Transposón Spm	(Trigueros et al. 2009)
<i>nga4-3</i>	Col-0	Transposón Spm	(Trigueros et al. 2009)
<i>spl14-101</i>	Col-0	T-DNA	Este trabajo
<i>spl16-101</i>	Col-0	T-DNA	Este trabajo
<i>spl8-1</i>	Col-0	Transposón dSpm	(Unte et al. 2003)
<i>tcp2-1</i>	Col-0	T-DNA	(Schommer et al. 2008)
<i>jaw-D</i>	Col-0	T-DNA (activation tagging)	(Weigel et al. 2000)
<i>hec1-1</i>	Col-0	T-DNA	(Gremski et al. 2007)
<i>hec3-1</i>	Col-0	T-DNA	(Gremski et al. 2007)
<i>ind1-2</i>	Col-0	EMS	(Liljegren et al. 2004)
<i>ind-6</i>	Ler	Transposón Ds	(Wu et al. 2006)
<i>spt-2</i>	Ler	EMS	(Alvarez and Smyth 1999)

1.2.3.- *Líneas transgénicas:***Tabla M.4: Líneas transgénicas utilizadas en esta tesis.**

LÍNEA	ECOTIPO	REFERENCIA
<i>35S::NGA3</i>	Col-0	(Trigueros et al. 2009)
<i>35S::GR:NGA1</i>	Col-0	Este trabajo
<i>NGA3p::GUS</i>	Col-0	(Trigueros et al. 2009)
<i>NGA2p::NGA2:GUS</i>	Col-0	(Ballester et al. 2015)
<i>35S::SPL14</i>	Col-0	Este trabajo
<i>35S::SPL14:SRDX</i>	Col-0	Este trabajo
<i>amiR-SPL1/SPL12</i>	Col-0	Este trabajo
<i>35S::HEC1</i>	Col-0	Este trabajo
<i>35S::HEC3</i>	Col-0	Este trabajo
<i>HEC1p::HEC1:GUS</i>	Col-0	(Gremski et al. 2007)
<i>HEC2p::GUS</i>	Col-0	(Gremski et al. 2007)
<i>HEC3p::GUS</i>	Col-0	(Gremski et al. 2007)
<i>35S::IND:GR</i>	Col-0	(Sorefan et al. 2009)
<i>INDp::GUS (GT140)</i>	Ler	(Liljegren et al. 2004)
<i>INDp::IND:GUS</i>	Col-0	(Sorefan et al. 2009)
<i>SPTp::GUS</i>	Ler	(Groszmann et al. 2010)
<i>PID::GUS</i>	Col-0	(Lee and Cho 2006)
<i>PIDp::PID:GFP</i>	Col-0	(Lee and Cho 2006)
<i>WAG2p:GUS</i>	Col-0	(Santner and Watson 2006)

**2.- Genotipado.**2.1.- *Mutantes nga.*

La tabla 5 recoge las condiciones de PCR utilizadas para genotipar los mutantes *nga*, así como los tamaños de las bandas esperadas en el gel.

**Tabla M.5: Condiciones de PCR utilizadas para genotipar los mutantes *nga*.** Se indican los tamaños de las bandas esperadas.

MUTANTE	PROGRAMA DE PCR	CEBADORES	BANDAS EN EL WT	BANDAS EN EL MUTANTE
<i>nga 1-4</i>	94°C 10 min 94°C 30 seg 59°C 45 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 15°C infinito 35x	otl2Rwt SS071 p750	otl2Rwt/SS071 1Kb  otl2Rwt/p750 no banda	otl2Rwt/SS071 no banda  otl2Rwt/p750 521pb
<i>nga 2-2</i>	94°C 5 min 94°C 40 seg 62°C 30 seg 72°C 45 seg 72°C 5 min 15°C infinito 35x	oMNG29 oMNG15 En8130	oMNG29/oMNG15 600pb  oMNG29/En8130 no banda	oMNG29/oMNG15 no banda  En8130/oMNG29 500pb
<i>nga 3-3</i>	94°C 10 min 94°C 40 seg 65.5°C 45seg 72°C 2 min 72°C 5 min 15°C infinito 35x	SS044 SS043 En8130	SS044/SS043 1.5Kb  En8130/SS044 no banda	SS044/SS043 2Kb  En8130/SS044 1.2 Kb

<i>nga 4-3</i>	94°C 10 min 94°C 30 seg 60°C 45 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 15°C infinito	35x	SS065 SS066 En8130	SS065/SS066 1Kb  En8130/SS065 no banda	SS065/SS066 no banda  En8130/SS065 400pb
----------------	--	-----	--------------------------	--	--

### 2.2.- Otros mutantes.

La tabla 6 recoge las condiciones de PCR para genotipar distintos mutantes utilizados, así como los tamaños de las bandas esperadas en el gel.

**Tabla M.6: Condiciones de PCR utilizadas para genotipar otros mutantes.** Se indican los tamaños de las bandas esperadas.

MUTANTE	PROGRAMA DE PCR	CEBADORES	BANDAS EN EL WT	BANDAS EN EL MUTANTE
<i>sp/14-101</i>	94°C 10 min 94°C 45 seg 60°C 45 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 15°C infinito	40x	oPBF18 oPBF58 LB1	oPBF18/oPBF58 800pb  oPBF18/LB1 no banda  oPBF18/LB1 600pb
<i>sp/16-101</i>	94°C 10 min 94°C 45 seg 60°C 45 seg 72°C 90 seg 72°C 5 min 15°C infinito	40x	oPBF55 oPBF59 8474	oPBF55/oPBF59 800pb  oPBF59/8474 no banda  oPBF59/8474 500pb
<i>tcp2-1</i>	94°C 10 min 94°C 30 seg 60°C 45 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 15°C infinito	35x	oPBF130 oPBF131 LB1	oPBF130/oPBF131 1.2Kb  oPBF131/LB1 no banda  oPBF131/LB1 700pb
<i>hec1-1</i>	94°C 3 min 94°C 20 seg 56°C 30 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 15°C infinito	35x	OKG156 OKG157 GabiT	OKG156/OKG157 600pb  OKG156/GabiT no banda  OKG156/GabiT 750pb
<i>hec3-1</i>	94°C 3 min 94°C 20 seg 55°C 30 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 15°C infinito	45x	ILC-X8 ILC-X3 LBb3	ILC-X8/ILC-X3 850pb  ILC-X3/LBb3 no banda  ILC-X3/LBb3 550pb

### 2.3.- Otros genotipados.

La tabla 7 recoge las condiciones de PCR para genotipar distintas líneas utilizadas, así como el tamaño de la banda esperada en el gel.

**Tabla M.7: Condiciones de PCR utilizadas para genotipar otras líneas.** Se indican los tamaños de las bandas esperadas.

	PROGRAMA DE PCR	CEBADORES	BANDA
35S:: <i>NGA3</i>	94°C 3 min 94°C 20 seg 55°C 30 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 15°C infinito 35x	2x35s SS043	2x35s/SS043 800pb
35S:: <i>IND:GR</i>	94°C 3 min 94°C 20 seg 56°C 30 seg 72°C 1 min 72°C 5 min 15°C infinito 35x	GR-F GR-R	GR-F/GR-R 800pb

### 3.- Construcciones

#### 3.1.- Vectores utilizados.

##### 3.1.1.- Vectores de clonaje de productos de PCR.

Las clonaciones se hicieron en diferentes plásmidos en función de los fines requeridos.

- pGEM-T Easy (Promega): vector intermediario utilizado para clonar fragmentos amplificados por PCR y secuenciarlos, ya que posee sitios de unión para los cebadores T7 y SP6. Presenta el gen de resistencia a ampicilina.
- pCRII (Dual promoter TA Cloning kit Invitrogen): vector intermediario para clonar fragmentos amplificados por PCR y su posterior secuenciación, ya que posee sitios de unión para los cebadores SP6 y T7. El plásmido pCRII confiere resistencia a kanamicina y ampicilina.
- pCR8/GW/TOPO (Invitrogen): vector intermediario utilizado para clonar fragmentos amplificados por PCR teniendo como objetivo introducirlos posteriormente en plásmidos de destino mediante la reacción de Gateway. Podemos secuenciar los fragmentos clonados usando los cebadores M13 directo y y M13 reverso. Este plásmido confiere resistencia a espectinomicina.
- pENTR<sup>TM</sup>/SD/D-TOPO (Invitrogen): vector intermediario utilizado para clonar direccionalmente fragmentos amplificados por PCR teniendo como objetivo introducirlos posteriormente mediante la reacción de Gateway en un plásmido de destino. Podemos secuenciar los fragmentos clonados usando los cebadores M13 directo y y M13 reverso. Confiere resistencia a kanamicina.
- pDONR 201/pDONR 207/pDONR 221 (Invitrogen): vectores intermediarios utilizados para clonar el inserto en un plásmido de destino mediante la reacción de Gateway. El pDONR 201 y el pDONR 221 incluyen el gen de resistencia para kanamicina y el pDONR 207 para gentamicina. El pDONR 221 nos permite

secuenciar dicho inserto con los cebadores M13 directo y M13 reverso.

### 3.1.2.- Vectores de transformación de plantas.

Estos vectores se utilizaron para obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

- pEarleyGate100: vector utilizado para la sobreexpresión transitoria de la proteína de interés bajo el control del promotor constitutivo 35S. Este vector también se utilizó para expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Incluye los genes de resistencia a kanamicina para bacterias y basta para plantas.
- pMDC32: vector utilizado para la sobreexpresión transitoria de la proteína de interés bajo el control del promotor constitutivo 35S. Incluye los genes de resistencia a kanamicina para bacterias e higromicina para plantas.
- pK2GW7: vector utilizado para la sobreexpresión transitoria de la proteína de interés bajo el control del promotor constitutivo 35S. Incluye los genes de resistencia a espectinomicina para bacterias y kanamicina para plantas.
- pMDC43: vector utilizado para fusionar la GFP en el extremo C-terminal de la proteína de interés y sobreexpresarla bajo el control del promotor constitutivo 35S. Incluye los genes de resistencia a kanamicina para bacterias e higromicina para plantas.
- pMDC83: vector utilizado para fusionar la GFP en el extremo N-terminal de la proteína de interés y sobreexpresarla bajo el control del promotor constitutivo 35S. Incluye los genes de resistencia a kanamicina para bacterias e higromicina para plantas.

### 3.1.3.- Vectores para expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

- pYFC43: vector utilizado para la expresión de proteínas fusionadas a la mitad C-terminal de la proteína fluorescente amarilla. La expresión está bajo el control del promotor constitutivo 35S. Confiere resistencia a kanamicina/amikacina. Para más información sobre este vector se puede consultar la página web <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>.
- pYFN43: vector utilizado para la expresión transitoria de proteínas fusionadas a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente amarilla. La expresión está bajo el control del promotor constitutivo 35S. Al igual que el vector anterior incluye el gen de resistencia a kanamicina/amikacina. Para más información sobre este

vector se puede consultar la página web <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>.

- pBin19G1: vector utilizado para evitar el silenciamiento génico que se puede producir al infiltrar plantas de *Nicotiana*. Confiere resistencia a kanamicina (Voinnet et al. 2003).
- pGreenII 0800-5 LUC: vector utilizado para la expresión del gen de la *LUCIFERASA* bajo el control de un promotor de interés. También sobreexpresa el gen de la *RENILA*. Confiere resistencia a kanamicina (Hellens et al. 2005).

### 3.1.4.- Vectores utilizados en los ensayos de simple híbrido de levadura.

- pHIS2: vector cebo empleado en el híbrido simple con la genoteca de cDNA de planta entera. Confiere resistencia a kanamicina para bacterias e incluye los genes de la *HIS3* y el *TRP1* como marcadores nutricionales para la selección en levadura.
- pGADT7-rec: vector presa empleado en el híbrido simple con la genoteca de cDNA de planta entera. Confiere resistencia a ampicilina para bacterias e incluye el gen de la *LEU2* como marcador nutricional para la selección en levadura.
- pTUY1H: vector cebo empleado en el híbrido simple con la genoteca de factores de transcripción de *Arabidopsis*. Confiere resistencia a ampicilina para bacterias e incluye los genes de la *LEU2* e *HIS3* como marcadores nutricionales para la selección en levadura.
- pDEST22: vector presa empleado en el híbrido simple con la genoteca de factores de transcripción de *Arabidopsis*. Confiere resistencia a ampicilina para bacterias e incluye el gen del *TRP1* como marcador nutricional para la selección en levadura.

Listado de los vectores utilizados:

**Tabla M.8: Plásmidos utilizados en esta tesis.**

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN
pGEM-T Easy	Amp <sup>r</sup> , lacZ, sitios de unión para los cebadores T7, SP6, M13D y M13R	Promega
pCRII	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , lacZ, sitios de unión para los cebadores T7,SP6, M13D y M13R.	Invitrogen
pCR8/GW/TOPO	Spec <sup>r</sup> , sitios de unión para los cebadores M13D,M13R, GW1 y GW2.	Invitrogen
pENTR <sup>TM</sup> /SD/D-TOPO	Kan <sup>r</sup> , sitios de unión para los cebadores M13D y M13R.	Invitrogen
pDONR 201	Kan <sup>r</sup> .	Invitrogen
pDONR 207	Gen <sup>r</sup> .	Invitrogen
pDONR 221	Kan <sup>r</sup> , sitios de unión para los cebadores M13D y M13R.	Invitrogen
pEarleyGate100	Kan <sup>r</sup> (bacterias) y Basta <sup>r</sup> (plantas).	Invitrogen
pMDC32	Kan <sup>r</sup> (bacterias) e Hygro <sup>r</sup> (plantas).	Invitrogen
pK2GW7	Spec <sup>r</sup> (bacterias), Kan <sup>r</sup> (plantas).	PSB

pMDC43	Kan <sup>r</sup> (bacterias) e Hygro <sup>r</sup> (plantas).	Invitrogen
pMDC83	Kan <sup>r</sup> (bacterias) e Hygro <sup>r</sup> (plantas).	Invitrogen
pYFC43	Kan <sup>r</sup> .	pMDC43
pYFN43	Kan <sup>r</sup> .	pMDC43
pBin19G1	Kan <sup>r</sup> .	pBin19
pGreenII0800-5 LUC	Kan <sup>r</sup> .	pGreenII 62-SK
pHIS2	Kan <sup>r</sup> (bacterias) e <i>HIS3</i> y <i>TRP1</i> (levadura).	Clontech
pGADT7-rec	Amp <sup>r</sup> (bacterias) y <i>LEU2</i> (levadura), GAL4 AD, sitios de unión para los cebadores T7 y 3 AD'.	Clontech
pTUY1H	Amp <sup>r</sup> (bacterias) y <i>LEU2</i> e <i>HIS3</i> (levadura).	Invitrogen
pDEST22	Amp <sup>r</sup> (bacterias) y <i>TRP1</i> (levadura), GAL4 AD.	Invitrogen

### 3.2.- Construcciones.

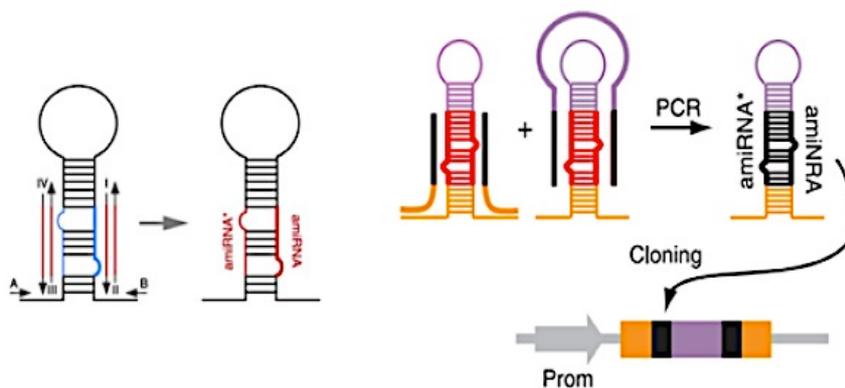
#### 3.2.1.- *Diseño del microRNA artificial (Schwab et al. 2006).*

Para el diseño de un microRNA artificial hay que tener en cuenta una serie de requerimientos:

- Para diseñar la secuencia del amiRNA, la cual debe tener una longitud de 21pb, hay que tener en cuenta que en la posición 1 debe haber un uracilo (U), en la posición 10 una adenina (A) y en la posición 19 una guanina (G) o una citosina (C). Además, es necesario que tenga una región 5' inestable y el contenido en GC debe estar alrededor del 50%.
- Para el reconocimiento de la secuencia diana deben emparejar todas las secuencias diana de la posición 2 a la 12 del microRNA, no debe haber más de 3 bases diferentes de la posición 13 a la 21 del microRNA; y, debe tener una energía libre de al menos un 75% (<-30Kcal/mol) de la correspondiente a un apareamiento perfecto.

El diseño del microRNA se puede realizar con el programa "Web MicroRNA Designer" (<http://wmd.weigelword.org>). Este programa proporciona la secuencia para los cuatro cebadores específicos (I a IV), necesarios para obtener el microRNA artificial.

El molde utilizado para realizar las PCR fue el vector RS300, se trata de un vector pBluescript (SK) con el miR319a, miRNA endógeno de *Arabidopsis*. Este plásmido no contiene ningún promotor, sólo sirve como molde para mutagénesis directa por PCR. Para sustitución del microRNA presente en el plásmido RS300 por el microRNA específico de los genes SPL1 y SPL12 se llevaron a cabo un total de cuatro PCRs (Fig.M.1), combinando los diferentes cebadores diseñados con anterioridad (Anexo I) como se muestra en la Tabla M.9.



**Figura M.1: Sustitución del miRNA319 del plásmido R300 por el microRNA específico para los genes *SPL1* y *SPL12*.** La superposición de PCRs se utiliza en varios pasos para generar un precursor de miRNA, en el cual, el dúplex miRNA-miRNA\* endógeno es sustituido por una secuencia artificial. La secuencia quimérica se transfiere posteriormente en el vector elegido.

**Tabla M.9: Combinación de cebadores en las 4 PCRs.**

REACCION	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR REVERSO	MOLDE	BANDA
(a)	A	IV	pRS300	272pb
(b)	III	II	pRS300	171pb
(c)	I	B	pRS300	298pb
(d)	A	B	(a)+(b)+(c)	701pb

Después, el producto de PCR obtenido a partir de la reacción (d) se clonó en el vector pCR8/GW/TOPO y posteriormente se secuenció con los cebadores A y B que forman parte del fragmento amplificado. Finalmente, este microRNA se clonó en el vector pMDC32 bajo el control del promotor CaMV35S y se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58. A continuación se transformaron tanto plantas silvestres Col-0, como plantas dobles mutantes *spl14-101 spl16-101*.

#### 4.- Análisis fenotípico de plantas mutantes y líneas transgénicas.

##### 4.1.- Fotografía a bajo aumento.

Para obtener imágenes a bajo aumento, como es el caso de fotografías de roseta o de plantas enteras, se utilizó una cámara digital Leica V-LUX1. Para la obtención de imágenes a mayor aumento, se utilizó una lupa binocular Nikon modelo SMZ800 provista de una unidad de iluminación externa de luz blanca fría (Volpi Intralux 4000-1) y conectadas a una cámara digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1) y una lupa binocular Leica MZ16Z conectada a un ordenador con el software de análisis de imagen Leica Application Suite.

#### 4.2.- Técnicas microscópicas.

##### 4.2.1.- Microscopia óptica.

Las muestras montadas en portaobjetos fueron observadas y fotografiadas en un microscopio Nikon Eclipse E-600 acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon Digital-Sight (DS-Ri1) y un ordenador con el software de análisis de imagen NIS-Elements F3.0. En función del tipo de muestra y que se pretendía visualizar, las muestras fueron observadas con iluminación de campo claro, o con iluminación de campo oscuro.

##### 4.2.2.- Microscopia electrónica de barrido.

Previamente a la visualización, se llevó a cabo la fijación del material vegetal en FAE (etanol 50%, ácido acético glacial 5%, formaldehído 3.7%), inmediatamente después de su recolección. El material se mantuvo en FAE toda la noche a 4°C y al día siguiente se sustituyó por etanol 70%. En este punto las muestras pueden ser almacenadas indefinidamente a 4°C hasta el momento en el que vayan a ser analizadas al microscopio. Al día siguiente se incubaron las muestras durante 30 min en etanol al 80%, 30 min en etanol al 90%, y finalmente 1 hora en etanol absoluto, este último paso se repitió al menos 3 veces, la última vez antes de someterlas al punto crítico.

El punto crítico consiste en la sustitución del etanol de la muestra por CO<sub>2</sub> y su posterior sublimación, y se llevó a cabo en un aparato Polaron E300. Las muestras 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 200nm, en atmosfera 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 200s por imagen, en un microscopio electrónico JEOL, modelo JSM-5410 operando bajo condiciones de microanálisis de entre 10-15 kV y una distancia de trabajo de 25mm.

##### 4.2.3.- Microscopia confocal.

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Alemania), consistente en un microscopio invertido DMIR2 y una unidad espectral confocal SL con dos detectores de fluorescencia simultáneos y 4 líneas de laser (458 nm, 488nm, 514 nm y 534 nm). La YFP se excitó con un laser de 488 nm, y su emisión se recogió entre 500 nm y 520 nm (máximo de emisión a 509 nm). La clorofila se excitó con el mismo laser, y su emisión se recogió entre 660 nm y 690 nm. La identidad de la señal se confirmó en todos los casos mediante un barrido de longitudes

de onda ( $\lambda$ -scan), para visualizar la intensidad de la emisión a las diferentes longitudes de onda.

### **5.- Técnicas de histología vegetal.**

#### **5.1.- Aclarado con hidrato de cloral para la observación de los haces vasculares.**

Se utilizó el protocolo de Sioux Christensen publicado en Weigel y Glazebrook (2002). Mediante este protocolo, se aclararon los tejidos vegetales, permitiendo que se pudieran observar los haces vasculares utilizando microscopía de campo oscuro.

Se fijaron las muestras en una mezcla de etanol: acético glacial (6:1) a temperatura ambiente durante 24 horas. Se reemplazó la mezcla de etanol : acético por etanol al 100% y se incubaron las muestras 30 minutos a temperatura ambiente. Este proceso se repitió dos veces. A continuación se quitó el alcohol y se reemplazó con una disolución de hidrato de cloral (8 g hidrato de cloral: 1 ml glicerol : 2 ml agua), se mantuvo en esta disolución durante 48 horas. Posteriormente se montaron las muestras con hidrato de cloral en portaobjetos excavados para evitar que las muestras se aplastaran. Para visualizar las muestras clareadas con hidrato de cloral al microscopio se utilizó la iluminación de campo oscuro.

### **6.- Analisis de expresión.**

#### **6.1.- Determinación de los niveles de transcrito mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).**

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos para cada gen en las reacciones de PCR cuantitativa fueron diseñados a partir de las regiones de cDNA de interés con el programa Primer Express 2.0 utilizando los parámetros por defecto, que incluye entre otros,  $T^a$  m entre 58-60 °C, contenido en GC 20-80 % y amplicones entre 50-150 pb. En el anexo I se puede encontrar la relación de cebadores empleados para cada uno de los genes analizados.

En primer lugar, se realizaron pruebas para cada pareja de cebadores modificando la concentración de éstos (300, 600 ó 900 nM) con el fin de encontrar la combinación más óptima. Al final de cada PCR, se realizó una cinética de  $T^a$ m (curva de disociación) aplicando un gradiente de temperaturas creciente para analizar la especificidad del producto y la presencia de dímeros de los cebadores. Además, se añadieron en cada experimento los controles pertinentes de contaminación de DNA genómico y controles negativos de la reacción. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un volumen final de 20 $\mu$ l empleando 10 $\mu$ l de SYBR<sup>®</sup> *Premix Ex Taq* (2 $\times$ ) (Tli RNaseH Plus), Bulk (CAT

#RR420L, Takara), 0,4µl del fluoróforo ROX (50X) que permite ajustar las posibles variaciones entre las muestras debidas a errores en el pipeteo, 0,25µl de cada uno de los dos cebadores a una concentración de 20µM para dejarlos a una concentración final de 0,25µM y 4µl de cDNA. La mezcla de reacción de SYBR® *Premix Ex Taq* (2×) (Tli RNaseH Plus) incluye el compuesto fluoróforo SYBR® Green I que emite fluorescencia cuando se intercala en las moléculas de DNA de doble cadena y permite por tanto cuantificar la cantidad de producto a lo largo de los ciclos de amplificación, la enzima *TaKaRa Ex Taq* HS, el tampón de la reacción Tli RNaseH Plus que degrada el RNAm residual que pueda encontrarse en el cDNA, minimizando de este modo la inhibición de las qRT-PCR como resultado de la presencia de ese RNAm residual, los dNTPs y el Mg<sup>2+</sup>.

Para cada muestra se realizaron tres PCRs idénticas empleando placas MicroAmp® Fast Optical 96-well reaction plate with barcode (Applied Biosystems) y se llevaron a cabo en el aparato 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), se trata de un termociclador con cámara CDD que registra fluorescencia, acoplado al programa informático 7500 System Software (Applied Biosystems). Se utilizó el programa de amplificación recomendado por la casa comercial para los oligos diseñados con Primer Express (2 min. 50 °C, 10 min. 95 °C, 40 ciclos de 15 s 95 °C, 1min., 60 °C). Los valores de expresión génica se calcularon mediante la cuantificación de la fluorescencia en un punto de la fase exponencial de la reacción de amplificación (umbral) asociado a un número de ciclos concreto para cada gen (Ct). A partir del parámetro Ct se calcularon para cada experimento los valores de expresión relativa de los genes de interés en las distintas muestras respecto a la muestra control, normalizados con el nivel de expresión obtenido para el gen constitutivo en las mismas muestras, según la fórmula:

$$2^{-\left[ \frac{\text{Ct}_{\text{gen A}} - \text{Ct}_{\text{gen constitutivo}}}{\text{(muestra problema)}} - \frac{\text{Ct}_{\text{gen A}} - \text{Ct}_{\text{gen constitutivo}}}{\text{(muestra control)}} \right]}$$

## 6.2.- Detección de la actividad β-glucuronidasa mediante tinción histoquímica.

La actividad GUS puede ser determinada con tinción histoquímica mediante el sustrato cromogénico 5-bromo-4-clor-3-indolil glucurónido (X-Glu), indicando las zonas teñidas de azul, los dominios físicos de expresión del gen interés en los órganos analizados.

Para realizar detecciones poco precisas se siguió un protocolo rápido. En este caso únicamente se pretendía descartar plantas que no fueran portadoras del gen delator, bien porque eran necesarias para la realización de cruces o bien para descartar plantas de generaciones F1 y F2, procedentes de un cruce con una línea portadora del gen delator GUS. Se cogieron flores o frutos en placas de 96 pocillos (Iwaki microplate) con el tampón de tinción (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,42Mm a pH 7,2; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,58 mM a pH 7,2;

## MATERIALES Y MÉTODOS

ferrocianuro potásico 0,5 mM, ferricianuro potásico 0,5 mM, EDTA 10mM y Tritón X-100 al 0,2 %) suplementado con X-Glu 2 mM. Las muestras se incubaron durante una noche a 37°C y en oscuridad. Posteriormente las muestras se observaron y en los casos en los que la señal no se detectaba con claridad previamente a la visualización las muestras se sometieron a varios lavados con etanol 70% y se observaron en una lupa binocular.

Para realizar detecciones GUS más precisas se siguió el protocolo descrito por Kirsten Bomblies en el manual de *Arabidopsis* (Weigel 2002) pág.243-245 con algunas modificaciones.

Las inflorescencias de plantas portadoras de construcciones con el gen delator GUS se recogieron en acetona fría al 90%, en esta solución se mantuvieron durante 20 min a T<sup>a</sup> ambiente. A continuación, se hizo un lavado de 5 min con agua. Posteriormente, las muestras fueron infiltradas al vacío durante 20 min, o en su defecto hasta que las muestras cayeron al fondo, con el tampón de tinción (tampón fosfato 50mM pH 7, ferricianuro potásico 2mM, ferrocianuro potásico 2mM, Tritón X-100 0,2%) suplementado con X-Glu 2mM y se incubaron a 37°C y oscuridad toda la noche. El ferrocianuro y el ferricianuro tamponan el estado redox del tampón de tinción y el producto derivado de X-Glu precipita en el lugar donde se localiza la proteína GUS, indicando por tanto la localización espacial y temporal del gen cuyo promotor controla la expresión del gen GUS en la planta. El tampón de tinción se elimina con una serie de etanol al 20%, 35% y 50% a T<sup>a</sup> ambiente durante 30 min cada serie, y a continuación, se fijaron las muestras en FAE (50%etanol, 10%ácido acético glacial, 5%formaldehído) durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se pasaron a etanol 70%, en esta solución se pueden mantener indefinidamente. Previamente a la visualización, y tras estar las muestras durante al menos un día en etanol 70%, el tejido fue aclarado con hidrato de cloral durante al menos 2 días. Las muestras se observaron y fotografiaron mediante una lupa binocular, o mediante el microscopio óptico.

Nota: Las concentraciones elevadas de ferrocianuro y ferricianuro restringen el nivel de señal de GUS, mientras que las concentraciones más bajas permiten detectar señales GUS más débiles (Sessions et al. 1999).

### **7.- Análisis de interacciones proteína-proteína.**

#### 7.1.- Ensayo de complementación Fluorescente Bimolecular (BiFC).

Con el ensayo de BiFC nuestro objetivo es comprobar si dos proteínas de interés interaccionan. Para ello, se utilizaron dos plásmidos de Gateway los cuales poseían cada

uno de ellos una mitad de la proteína YFP, de ahí sus nombres pYFP<sup>C</sup> (contiene la mitad C-terminal de la proteína) e pYFP<sup>N</sup> (contiene la mitad N-terminal de la proteína). Estos plásmidos constan de un promotor 35S por duplicado, la región C-terminal (C) o N-terminal (N) de la proteína YFP, un nexo de unión flexible entre el gen de la YFP y el gen de interés que permitiría la movilidad de la proteína de fusión, el casete de Gateway donde se clona el gen de interés y un terminador. Para más información sobre estos vectores se puede consultar la página web:

<http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>

En todos los experimentos realizados en esta tesis doctoral se utilizaron como controles positivos los plásmidos pYFP<sup>N</sup>-FUL y pYFP<sup>C</sup>-SOC, y como controles negativos se utilizaron los plásmidos pYFP<sup>N</sup>-AG y pYFP<sup>C</sup>-SOC (Balanza et al. 2014; de Folter et al. 2005; Immink et al. 2002a); y se clonó la región codificante de los genes de interés en la región C-terminal de la mitad de la proteína YFP, tras obtener estas construcciones se introdujeron en la cepa de *Agrobacterium* C58.

3 días antes de la infiltración se refrescaron las cepas de *Agrobacterium* (desde placa o glicerol) mediante triple estría en medio LB suplementado con los antibióticos que correspondan. Incubar a 28 °C durante 2 ó 3 días. Para cada ensayo, además de las cepas de interés se han de incluir: las cepas correspondientes a los controles positivos, las cepas correspondientes a los controles negativos y la cepa que corresponde al p19 (supresor viral del silenciamiento génico post-transcripcional).

1 día antes de la infiltración se inocularon por cultivo, una colonia de *Agrobacterium* en 50 ml de LB líquido más los antibióticos a las concentraciones correspondientes (en matraces de 250 ml para favorecer la aireación) y se incubaron a 28 °C en agitación 24 horas aproximadamente (a saturación).

El día de la infiltración se transfirieron los cultivos de *Agrobacterium* a botes falcon y se recogieron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 20-22 °C (temperatura ambiente para no dañar los Agros). Durante la centrifugación se preparó la solución de infiltración aproximadamente una cantidad de 20-25 ml por *Agrobacterium*. La solución de infiltración consta de:

- 10 mM de MgCl<sub>2</sub> ( del stock a 1 M)
- 10 mM de MES ( del stock autoclavado a 0.1 M, pH 5.6)
- 200 µl de acetosiringona ( del stock a 100 mM)
- Completar con H<sub>2</sub>O destilada estéril

Tras la centrifugación se resuspendieron los agros en 10 ml de solución de infiltración, para después diluir los cultivos de *Agrobacterium* y ajustarlos a una OD~1 (medida a

una longitud de onda de 600 nm) en un volumen final de 20 ml (estas diluciones se hacen con solución de infiltración y en tubos de falcon de 50 ml).

A continuación, los cultivos se incubaron horizontalmente y en oscuridad durante 3 horas, con agitación suave (50 rpm) a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, preparamos, en tubos falcon de 50 ml, las mezclas de cultivos con las que infiltraremos las hojas de Nicotiana (estas mezclas contendrán en un volumen final de 10 ml). Idealmente, las plantas de tabaco habían crecido unas 3 semanas en día largo, presentando 5 hojas aproximadamente, además antes de la infiltración (una o dos horas) se humedecieron las hojas con agua ya que de este modo los estomas se abren, y se favorece la infiltración.

Posteriormente, y con la ayuda de jeringuillas de 2ml se realizaron 3 infiltraciones en hojas de plantas de Nicotiana Benthamiana diferentes, por cada mezcla a ensayar. Las infiltraciones se realizaron en el envés de hojas juvenes (normalmente la 3ª y 4ª hoja), sanas y poco rugosas y en zonas alejadas de las venas principales (es importante ser cuidadoso y no generar heridas).

Tras la infiltración, las plantas se dejaron en el fitotrón durante 3 días.

Trascurridos este tiempo, se tomaron secciones de las hojas agroinfiltradas y se montaron exponiendo el envés de la hoja, en un portaobjetos con MOBIOL, sellado con el cubreobjetos y cinta adhesiva, y las muestras se observaron al microscopio confocal.

### **8.- Analisis de interacción proteina-DNA.**

#### **8.1.- Ensayo de activación transitoria de la luciferasa en planta.**

En el ensayo de Luciferasa se estudia el posible papel regulador de distintos factores de transcripción en la expresión de un determinado promotor. Para ello, se utilizó el plasmido pGreenII0800-5 LUC (Hellens et al. 2005) en el que clonamos la región de interés de los promotores que deseamos analizar dirigiendo la expresión del gen de la LUCIFERASA (LUC). El vector también contiene el gen de la RENILA (REN) bajo el control del promotor 35S y que se utiliza para normalizar los datos de expresión. Todas las construcciones generadas en este vector se introdujeron en la cepa de Agrobacterium C58 + Psoup (Hellens et al. 2005).

En todos los experimentos realizados en esta tesis doctoral se utilizaron, como control positivo el plásmido 35S::LUC, y como controles negativos se utilizaron los plásmidos: pGreenII0800-5 LUC vacío (Hellens et al. 2005), y el plásmido que contiene el promotor de interés del ensayo.

3 días antes de la infiltración se refrescaron las cepas de *Agrobacterium* (desde placa o glicerol) mediante triple estría en medio LB suplementado con los antibióticos que correspondían. Se incubaron a 28 °C durante 2 ó 3 días. Para cada ensayo, además de las cepas de interés se han de incluir: la cepa correspondiente al control positivo, las cepas correspondientes a los controles negativos y la cepa que corresponde al p19 (supresor viral del silenciamiento génico post-transcripcional).

1 día antes de la infiltración se inoculó por cada construcción a incluir en el ensayo una colonia de *Agrobacterium* portadora en 50 ml de LB líquido más los antibióticos a las concentraciones correspondientes (en matraces de 250 ml para favorecer la aireación) y se incubó a 28 °C en agitación aproximadamente 24 horas (a saturación).

El día de la infiltración se transfirieron los cultivos de *Agrobacterium* a botes falcon y se recogieron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 20-22 °C (temperatura ambiente para no dañar los Agros). Durante la centrifugación se preparó la solución de infiltración aproximadamente una cantidad de 20-25 ml por *Agrobacterium*.

La solución de infiltración consta de:

- 10 mM de  $MgCl_2$  ( del stock a 1 M)
- 10 mM de MES ( del stock autoclavado a 0.1 M, pH 5.6)
- 200  $\mu$ l de acetosiringona ( del stock a 100 mM)
- Completar con  $H_2O$  destilada estéril

Tras la centrifugación se resuspendieron los agros en 10 ml de solución de infiltración, para después diluir los cultivos de *Agrobacterium* y a continuación, los cultivos se incubaron horizontalmente y en oscuridad durante 90 minutos, con agitación suave (50 rpm) a 28° C.

Después, ajustamos a una  $OD \sim 0,4$  (medida a una longitud de onda de 600 nm) en un volumen final de 20 ml (estas diluciones se hacen con solución de infiltración y en tubos de falcon de 50 ml), y volvimos a incubar los cultivos horizontalmente y en oscuridad durante 90 minutos, con agitación suave (50 rpm) a 28° C.

Transcurrido este tiempo, preparamos, en tubos falcon de 50 ml, las mezclas de cultivos con las que infiltramos las hojas de *Nicotiana* (estas mezclas contendrán en un volumen final de 10 ml). Idealmente, las plantas de tabaco habían crecido unas 3 semanas en día largo, presentando 5 hojas aproximadamente, además antes de la infiltración (una o dos horas) se humedecieron las hojas con agua ya que de este modo los estomas se abren, y se favorece la infiltración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Posteriormente, y con la ayuda de jeringuillas de 2ml se realizaron 3 infiltraciones, en hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* diferentes, por cada mezcla a ensayar. Las infiltraciones se realizaron en el envés de hojas jóvenes (normalmente la 3ª y 4ª hoja), sanas y poco rugosas y en zonas alejadas de las venas principales (es importante ser cuidadoso y no generar heridas).

Tras la infiltración, las plantas se dejaron en el fitotrón durante 3 días.

El día del ensayo, en primer lugar, calculamos el volumen necesario que necesitaremos de los reactivos para realizar el ensayo enzimático: *Passive Lysis Buffer (PLB)*, *Luciferase Assay Reagent II (LAR-II)* y *Stop & Glo Reagent* (1 µl de sustrato por 99 µl de tampón), y descongelamos en un baño de agua a temperatura ambiente y en oscuridad el volumen necesario de los reactivos *LAR-II* y *Stop & Glo Buffer*.

Para la obtención de las muestras, se extrajeron, con un sacabocados, cilindros, de aproximadamente 1 cm de diámetro por hoja infiltrada (3 hojas infiltradas por ensayo). Es importante intentar obtener las muestras de una superficie sana y sin heridas, así como minimizar el daño mecánico. Después se introdujeron las muestras en un tubo *ependorf* de 1.5 ml y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

A continuación, se machacaron mecánicamente las muestras. Primero, se disgregó un poco el tejido con ayuda de palillos autoclavados e inmediatamente se añadieron 350 µl de PLB 1x. Finalmente se homogeneizó con cuidado de no dejar fragmentos grandes de tejido sin machacar y se centrifugaron las muestras 5 minutos a 4º C.

Se transfirieron 50 µl del lisado celular a una placa para cuantificar luminiscencia. Es importante no generar burbujas. Después, se añadieron 40 µl de LAR-II por muestra, se agitó la placa durante 10 segundos, y se incubó la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de iniciar la lectura del luminómetro. Es aconsejable iniciar la lectura por los controles negativos, por ello se les sitúa en la esquina superior izquierda de la placa, ya que su lectura puede verse afectada por la correspondiente a muestras con un nivel alto de fluorescencia.

Para realizar la lectura de la actividad luciferasa, se utilizó el luminómetro GLOMAX MULTI DETECTION SYSTEM-PROMEGA (MODELO:9301-062), y se seleccionaron los siguientes parámetros de medidacondiciones:

- *integration*: 10 segundos
- *readings*: 3
- *period*: 2 minutos

Tras realizar la medida de la actividad luciferasa, se realizó la lectura de la actividad renila, para ello se añadieron 40 µl de *Stop & Glo Reagent* por muestra, se agitó la placa

durante 10 segundos, y se incubó la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de volver a iniciar la lectura del luminómetro. Para obtener los resultados del ensayo, es importante normalizar respecto a la actividad renilla los valores de actividad luciferasa de cada muestra.

## 8.2.- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Para la realización de esta técnica se siguió el protocolo empleado por Sorefan et al. (2009), utilizando un anticuerpo frente a GR (AB3580, Abcam). El material biológico fueron plantas 35S::IND:GR y 35S::IND:GR *nga1 nga3 nga4* tratadas con DEXA o con MOCK (solución control).

Para el entrecruzamiento, se recolectaron 700mg de inflorescencias de unos 2 cm de altura, que tras ser lavadas con agua se sumergieron inmediatamente en 20 ml de solución A (solución de entrecruzamiento: 0.4M sacarosa, 10mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1% formaldehído) en un falcon de 50 ml, y se les aplicaron 2 pulsos de vacío de 5 y 10 minutos. Con este paso se consigue el entrecruzamiento de las proteínas al DNA al que están asociadas.

Para detener la reacción de entrecruzamiento se añadió 1ml de glicina 2M y se continuó aplicando vacío durante 10 minutos más.

Tras detener la reacción de entrecruzamiento se lavó el tejido con exceso de agua destilada (unos 5 enjuagues), se eliminó el exceso de agua secando con un poco de papel absorbente y se volvieron a pesar las muestras, para congelarlas en nitrógeno líquido. Las muestras se pueden almacenar ahora a -80°C pero hay que evitar periodos de almacenamiento prolongados.

La preparación de las *beads* se lleva a cabo el mismo día que se realiza la inmunoprecipitación (IP). Se utilizaron *beads* magnéticas (Protein A magnetic beads, New England BioLabs, S1425S), que facilitan en gran medida los lavados y recuperación del anticuerpo utilizado, mediante el uso de un soporte imantado. Se utilizaron 25µl de beads en cada prelavado de las muestras y de 30 a 50 µl por IP (15 µl por cada 100 µl de extracto).

Una vez calculado el volumen que necesitamos de beads, estas se lavaron 3 veces con solución B (50 mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deaxycholato sódico, 0.1% SDS, 10mM butirato sódico, 1mM PMSF, 1mg/ml BSA y 20ng/ml de DNA de esperma de salmón sonicado) en el mismo volumen inicial de las

## MATERIALES Y MÉTODOS

beads. En cada lavado las beads se incubaban al menos durante una hora con agitación a temperatura ambiente.

Por último se lavaron una vez con la solución de lisis (50 mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deaxycholato sódico, 0.1% SDS, 10mM butirato sódico, 1mM PMSF y 1X del cocktail inhibidor de proteinasas para plantas #sigma, P9599) y luego se resuspendieron en el volumen inicial de las beads.

Para la extracción y sonicación del DNA, las muestras entrecruzadas se machacaron en nitrógeno líquido minuciosamente y se resuspendieron en 150 µl de solución de lisis por cada 100mg de tejido (1050 µl en nuestro caso), obteniéndose una mezcla densa, que se transfirió a un tubo eppendorf de 2ml.

El siguiente paso fue romper el DNA por sonicación aproximadamente en fragmentos de entre 100 y 1000 pares de bases. La sonicación es un paso crítico en el experimento, por lo que la puesta a punto de las condiciones del sonicador es muy importante. Se debe evitar la formación de burbujas durante el sonicado ya que reduce su eficiencia. El rango óptimo de fragmentos sería entre 300 y 500 pares de bases. Nosotros utilizamos un sonicador UP200S Hielscher Ultrasonics GmbH, utilizando una amplitud del 70% y 70 ciclos/seg. Se realizaron cinco sonicaciones de 25 pulsos, manteniendo las muestras siempre en hielo y dejando pasar 2 minutos entre cada sonicación.

Tras haber sonicado se centrifugaban las muestras durante 10 minutos a máxima velocidad y a 4°C en una centrífuga de mesa.

El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se realizó el prelavado de cada muestra con 25µl de las beads preparadas anteriormente, al menos durante una hora, con rotación a 4°C.

Tras el prelavado con las beads se transfirieron volúmenes fijos, normalmente 150-300 µl, a tubos nuevos que contenían el anticuerpo para realizar la inmunoprecipitación. En nuestro caso se transfirieron 300 µl de las muestras 35S::IND:GR (DEXA y MOCK) y 35S::IND:GR *nga1 nga3 nga4* (DEXA y MOCK) a tubos que contenían 6 µl de anticuerpo antiGR. También se transfirieron 300 µl de cada muestra a tubos sin anticuerpo, que constituirían nuestro *control sin anticuerpo*. De cada muestra se reservó un volumen superior a 30 µl que después se utilizó como fracción del material de partida o INPUT.

Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con rotación.

Al día siguiente se añadieron 15 µl de *beads* por cada 100 µl de extracto utilizado, en nuestro caso 45 µl, y se continuó la incubación durante al menos dos horas más.

Transcurrido ese tiempo se realizaron los lavados en una cámara fría (4°C) utilizando el soporte imantado, y descartando el sobrenadante en cada paso. Cada lavado se realizaba con un volumen de 800 µl:

- Lavado breve con solución de lisis (invirtiendo el tubo 7-8 veces hasta resuspender las beads).
- Lavado largo con solución de lisis (5 minutos de incubación con rotación).
- Lavado breve con solución LNDET (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P40, 1% deoxicholato sódico y 1mM EDTA).
- Lavado largo con solución LNDET.
- Lavado breve con TE (10mM Tris, pH 8, 1mM EDTA).
- Lavado largo con TE.

A las beads obtenidas se le añadieron 40 µl de solución de elución (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> y 0.25 mg/ml de proteinasa K) y se incubaron a 65°C durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y se repitió la elución de las beads con 40 µl más de solución de elución, repitiendo todo el proceso una segunda vez. Finalmente tendremos un volumen de elución de 80 µl.

De la fracción del material de partida que habíamos reservado se tomaron 30 µl y se les añadieron 50 µl de solución de elución. Esto corresponde a un 10% del material de partida utilizado en la IP.

Para revertir el entrecruzamiento, todas las muestras se incubaron durante toda la noche a 65°C en un termociclador.

El DNA se recuperó al día siguiente usando el Kit comercial *UltraClean PCR Clean-Up Kit* (MOBIO), eluyendo en un volumen final de 50 µl.

Es aconsejable testar la calidad de la sonicación en la fracción del INPUT después de la purificación mediante el kit de MOBIO, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

La determinación del grado de enriquecimiento en secuencias de nuestras muestras se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente, pero una vez obtenidos los valores de DNA relativos de las regiones de interés en las distintas muestras, respecto a los controles internos se normalizaron los resultados obtenidos entre las muestras de partida o INPUT, y las muestras inmunoprecipitadas o IP. Posteriormente se calculó la relación existente entre el INPUT y

el IP, estableciendo el grado de enriquecimiento según se describe en la siguiente fórmula:

$$\text{Enriquecimiento} = \frac{\frac{\text{INPUT}}{2^{\Delta Ct_x - Ct_{UBQ10 \text{ ACT}}}}}{\frac{\text{IP}}{2^{\Delta Ct_x - Ct_{UBQ10 \text{ ACT}}}}} \Bigg/ \frac{\frac{\text{INPUT control}}{2^{\Delta Ct_x - Ct_{UBQ10 \text{ ACT}}}}}{\frac{\text{IP control}}{2^{\Delta Ct_x - Ct_{UBQ10 \text{ ACT}}}}}$$

### 8.3.- Escrutinio de híbrido simple de levadura (Y1H) frente una genoteca de factores de transcripción de Arabidopsis.

En el ensayo de Y1H se estudia el posible papel regulador de distintos factores de transcripción en la expresión de un determinado fragmento de un promotor.

Este ensayo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Luis Oñate Sanchez, en el CBGP de Madrid. La metodología empleada se encuentra descrita por Castrillo et al. (2011). A continuación se presenta de forma breve el protocolo seguido:

#### 8.3.1.- Transferencia de DNA plasmídico en Levaduras.

Las distintas cepas de *S. cerevisiae* fueron transformadas siguiendo dos protocolos dependiendo del caso: para la transformación de levaduras con los plásmidos cebo se utilizó el protocolo rápido *Lazy bones*; para el rastreo de la genoteca de factores de transcripción se utilizó el protocolo de conjugación (*mating*), basado en el intercambio horizontal del DNA.

##### 8.3.1.1.- Método rápido de transformación: Lazy bones.

Protocolo basado en la incubación con acetato de litio (Serrano 1993). A partir de cultivos de una noche en medio YPD sólido se recogieron varias colonias de células y se resuspendieron en 500 µl de buffer de transformación [PEG (40%), acetato de litio (100mM), Tris (10mM), EDTA (0,4mM)].

Seguidamente se añadieron 50µl de una mezcla compuesta por: 5µl de sDNA de salmón, 5µl del plásmido a introducir (1 a 2 µg) y 40µl de dH2O estéril. El tubo que contenía las muestras se agitó de forma vigorosa y se incubó a temperatura ambiente durante toda

la noche. A continuación se realizó un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Las células fueron centrifugadas a 9000g durante 5 minutos descartando el sobrenadante. Finalmente se procedió a su resuspensión en 200 µl de dH<sub>2</sub>O estéril. Los plásmidos utilizados en los eventos de transformación complementan las auxotrofías de las cepas de levadura, por lo que posterior a su transformación las células fueron crecidas en un medio mínimo selectivo.

#### 8.3.1.2.- *Método de transformación por mating.*

A pequeña escala, este método fue empleado para la conjugación entre las levaduras en la pruebas de titulación de 3AT y confirmación de interacciones de simple híbrido. Básicamente el protocolo se realizó de la siguiente manera: se dejó crecer un cultivo de 24 horas en medio SD sólido selectivo correspondiente a cada una de las levaduras cebo y genoteca. Posteriormente, sobre una placa de YPDA sólido se colocaron inóculos (4-5 colonias) de colonias cebo y de colonias pertenecientes a la presa. La mezcla fue mezclada con un asa estéril mediante movimientos suaves sobre la misma placa. El cultivo se dejó incubando a temperatura ambiente durante toda la noche. Las células resultantes se sembraron en medio sólido selectivo apropiado, que unían las auxotrofías conferidas por los plásmidos de las levaduras parentales.

El rastreo original de la genoteca de factores de transcripción también se basó en la transformación por *mating*, aunque sufriendo varias modificaciones, por motivo de la cantidad de reacciones requeridas. Su metodología se describe en el apartado 8.3.3.

#### 8.3.2.- *Prueba de expresión del gen HIS3.*

El gen delator *HIS3* presenta un nivel basal de expresión no inducible por el dominio GAL4 que varía en las distintas cepas de levaduras utilizadas en este trabajo. Esta condición da lugar a un fondo de crecimiento en un medio sin histidina. Para eliminar la actividad enzimática resultante de esta expresión basal se suplementó el medio de cultivo con diferentes concentraciones de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT), un compuesto que es inhibidor competitivo de la actividad de la proteína de *HIS3* (His3p) de levadura (Bartel et al. 1993). Se escogió la concentración más baja que solo permitía el crecimiento de colonias de un tamaño inferior a 1mm.

Para el establecimiento de la concentración óptima de 3AT en el caso de los diploides generados para la construcción en el vector pTUY1H, la titulación de 3AT se realizó en un transformante producto de la expresión de la proteína cebo y una proteína al azar que no interaccionara con éste. Para ello, la cepa de levadura Y187a fue transformada con la

construcción que portaba el gen cebo de interés, en nuestro caso la región más conservada del promotor de *NGA3*. Seguidamente, las levaduras resultantes fueron transformadas mediante "mating" con la cepa de levadura YM4271 que portaba el gen de la GFP. En este punto las colonias diploides obtenidas se sembraron en placas de medio SD/-His/- Trp/-Leu, conteniendo 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 30, 50, 60 y 100mM de 3AT. Las levaduras se crecieron a 28°C durante 8 días.

### 8.3.3.- Rastreo en genoteca de factores de transcripción de *A. thaliana*.

En primer lugar, se transformó previamente la cepa Y187a con las construcciones que portaba el gen cebo de interés, en este caso la región más conservada del promotor de *NGA3*. Esta construcción poseía la auxotrofia a Leu conferida por el plásmido pTUY1H. Por otro lado, la cepa YM4271, portadora de la genoteca de factores de transcripción, poseía la auxotrofia de Trp conferida por el plásmido pDEST22.

Las levaduras de la genoteca y la del clon cebo fueron cultivadas durante tres días en medios líquidos SD/-Trp y SD/-Leu respectivamente. En un *erlenmeyer* de 1L conteniendo 200ml de medio YPDA se inocularon varias colonias conteniendo el transformante cebo (5-10 colonias) y se cultivaron a 28°C durante toda la noche con agitación. En paralelo, se dispensaron 100µl de YPDA en placas de 96 pocillos (*Placas TC standard clear plate with lid and flat bottom*; Corning-cultek-153596) con la ayuda de una pipeta multicanal. Un replicador apropiado para los 96 pocillos fue utilizado para inocular el medio de YPDA dispensado anteriormente con sus correspondientes colonias de la genoteca. Seguidamente se procedió a la incubación con agitación vigorosa (500rpm) a 28°C.

Para el *mating*, 100µl del cultivo de los cebos fueron añadidos en las placas de 96 pocillos inoculadas anteriormente con los clones de la genoteca. El proceso de transformación fue favorecido durante el crecimiento a 28°C durante 48 horas sin agitación. Seguidamente, el sedimento se resuspendió por agitación vigorosa. Las células transformantes de cebo-presa se replicaron nuevamente en placas de 96 pocillos con medio líquido SD/- Leu/-Trp, y se incubaron a 28°C durante 48 horas con agitación. Pasado este tiempo, y mediante el uso del replicador simultáneo de 96 pocillos por placa, se procedió a inocular simultáneamente las células en dos tipos de medio sólido, el primero, SD/-Leu/-Trp (control de crecimiento), y un segundo en medio de selección, en nuestro caso, SD/- Leu/Trp/-His. Las placas se dejaron crecer a 28°C durante 3-8 días, las colonias positivas fueron visibles a partir de 3-5 días de crecimiento.

El rescate de los plásmidos de la genoteca de las colonias positivas se llevó a cabo aislando el DNA plasmídico de la correspondiente levadura, siguiendo el protocolo de (Causier and Davies 2002), y utilizando esa preparación de DNA para transformar *E. coli*.

Finalmente se realizaron preparaciones de DNA plasmídico de *E.coli* las cuales se secuenciaron. Los análisis para comprobar cada uno de los insertos que poseían los plásmidos se analizaron mediante alineamiento BLAST.

8.3.4.- Comprobación de la interacción entre genes rastreados.

Se comprobaron las interacciones positivas transformando mediante el protocolo rápido y mediante *mating* los plásmidos en el mismo sistema de levadura utilizado en este trabajo y en otras cepas (Apartados 8.3.1.1 y 8.3.1.2).



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301 (5633):653-657.
- Alvarez J, Smyth D (1998) Genetic pathways controlling carpel development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 111:295-298.
- Alvarez J, Smyth DR (1999) CRABS CLAW and SPATULA, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development* 126 (11):2377-2386
- Alvarez JP, Goldshmidt A, Efroni I, Bowman JL, Eshed Y (2009) The NGATHA distal organ development genes are essential for style specification in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21 (5):1373-1393.
- Alvarez JP, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, Eshed Y (2006) Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* 18 (5):1134-1151.
- Arazi T, Talmor-Neiman M, Stav R, Riese M, Huijser P, Baulcombe DC (2005) Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *Plant J* 43 (6):837-848.
- Arnaud N, Pautot V (2014) Ring the BELL and tie the KNOX: roles for TALEs in gynoecium development. *Front Plant Sci* 5:93.
- Balanza V, Martinez-Fernandez I, Ferrandiz C (2014) Sequential action of FRUITFULL as a modulator of the activity of the floral regulators SVP and SOC1. *J Exp Bot* 65 (4):1193-1203.
- Balanzá V, Navarrete M, Trigueros M, Ferrándiz C (2006) Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *J Exp Bot* 57 (13):3457-3469.
- Ballester P, Navarrete-Gomez M, Carbonero P, Onate-Sanchez L, Ferrandiz C (2015) Leaf expansion in *Arabidopsis* is controlled by a TCP-NGA regulatory module likely conserved in distantly related species. *Physiol Plant* 155 (1):21-32.
- Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques* 14 (6):920-924
- Bartrina I, Otto E, Strnad M, Werner T, Schmülling T (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23 (1):69-80.
- Becraft PW, Bongard-Pierce DK, Sylvester AW, Poethig RS, Freeling M (1990) The *liguleless-1* gene acts tissue specifically in maize leaf development. *Dev Biol* 141 (1):220-232

## BIBLIOGRAFÍA

- Belda-Palazon B, Ruiz L, Marti E, Tarraga S, Tiburcio AF, Culianez F, Farras R, Carrasco P, Ferrando A (2012) Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One* 7 (10):e46907.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115 (5):591-602
- Bennett S, Alvarez J, Bossinger G, Smyth DR (1995) Morphogenesis in pinoid mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 8 (4):505-520
- Bernardo-Garcia S, de Lucas M, Martinez C, Espinosa-Ruiz A, Daviere JM, Prat S (2014) BR-dependent phosphorylation modulates PIF4 transcriptional activity and shapes diurnal hypocotyl growth. *Genes Dev* 28 (15):1681-1694.
- Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H, Huijser P (2005) Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *J Mol Biol* 352 (3):585-596.
- Blanc G, Hokamp K, Wolfe KH (2003) A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. *Genome Res* 13 (2):137-144.
- Blázquez M, Weigel D (2000) Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404:889-892
- Bowman J, Baum S, Eshed Y, Putterill J, Alvarez J (1999) Molecular Genetics of Gynoecium Development in *Arabidopsis*. *Curr Top Dev Biol* 45:155-205
- Bowman JL (ed) (1994) *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*. Springer, New York
- Bowman JL, Drews GN, Meyerowitz EM (1991) Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell* 3:749-758
- Bowman JL, Smyth DR (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 (11):2387-2396
- Brudno M, Steinkamp R, Morgenstern B (2004) The CHAOS/DIALIGN WWW server for multiple alignment of genomic sequences. *Nucleic Acids Res* 32 (Web Server issue):W41-44.
- Busch MA, Bomblies K, Weigel D (1999) Activation of a Floral Homeotic Gene in *Arabidopsis*. *Science* 285 (5427):585-587
- Cardon G, Hohmann S, Klein J, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P (1999) Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* 237 (1):91-104
- Cardon GH, Hohmann S, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P (1997) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J* 12 (2):367-377

- Castillejo C, Pelaz S (2008) The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Curr Biol* 18 (17):1338-1343.
- Castrillo G, Turck F, Leveugle M, Lecharny A, Carbonero P, Coupland G, Paz-Ares J, Onate-Sanchez L (2011) Speeding cis-trans regulation discovery by phylogenomic analyses coupled with screenings of an arrayed library of Arabidopsis transcription factors. *PLoS One* 6 (6):e21524.
- Causier B, Davies B (2002) Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Mol Biol* 50 (6):855-870
- Chanderbali AS, Yoo M-J, Zahn LM, Brockington SF, Wall PK, Gitzendanner MA, Albert VA, Leebens-Mack J, Altman NS, Ma H, Depamphilis CW, Soltis DE, Soltis PS (2010) Conservation and canalization of gene expression during angiosperm diversification accompany the origin and evolution of the flower. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (52):22570-22575.
- Chavez Montes RA, Coello G, Gonzalez-Aguilera KL, Marsch-Martinez N, de Folter S, Alvarez-Buylla ER (2014) ARACNe-based inference, using curated microarray data, of Arabidopsis thaliana root transcriptional regulatory networks. *BMC Plant Biol* 14:97.
- Chen Q, Atkinson A, Otsuga D, Christensen T, Reynolds L, Drews GN (1999) The Arabidopsis FILAMENTOUS FLOWER gene is required for flower formation. *Development* 126 (12):2715-2726
- Chen X, Zhang Z, Liu D, Zhang K, Li A, Mao L (2010) SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like Transcription Factors: Star Players for Plant Growth and Development. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (11):946-951.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev* 20 (13):1790-1799.
- Cheng ZJ, Wang L, Sun W, Zhang Y, Zhou C, Su YH, Li W, Sun TT, Zhao XY, Li XG, Cheng Y, Zhao Y, Xie Q, Zhang XS (2013) Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiol* 161 (1):240-251.
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353 (6339):31-37
- Costa M, Nobre MS, Becker JD, Masiero S, Amorim MI, Pereira LG, Coimbra S (2013) Expression-based and co-localization detection of arabinogalactan protein 6 and arabinogalactan protein 11 interactors in Arabidopsis pollen and pollen tubes. *BMC Plant Biol* 13:7.

## BIBLIOGRAFÍA

- Crawford BCW, Yanofsky MF (2008) The formation and function of the female reproductive tract in flowering plants. *Curr Biol* 18 (20):R972-978.
- Crawford BCW, Yanofsky MF (2011) HALF FILLED promotes reproductive tract development and fertilization efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 138 (14):2999-3009.
- Cress WD, Triezenberg SJ (1991) Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. *Science* 251:87-90
- Danisman S, van Dijk AD, Bimbo A, van der Wal F, Hennig L, de Folter S, Angenent GC, Immink RG (2013) Analysis of functional redundancies within the *Arabidopsis* TCP transcription factor family. *J Exp Bot* 64 (18):5673-5685.
- de Folter S, Immink RGH, Kieffer M, Parenicová L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, Davies B, Angenent GC (2005) Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *Plant Cell* 17 (5):1424-1433.
- Efroni I, Blum E, Goldshmidt A, Eshed Y (2008) A Protracted and Dynamic Maturation Schedule Underlies *Arabidopsis* Leaf Development. *Plant Cell* 20: 2293-2306.
- Efroni I, Han SK, Kim HJ, Wu MF, Steiner E, Birnbaum KD, Hong JC, Eshed Y, Wagner D (2013) Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Dev Cell* 24 (4):438-445.
- Eklund DM, Staldal V, Valsecchi I, Cierlik I, Eriksson C, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Sundstrom JF, Thelander M, Ezcurra I, Sundberg E (2010) The *Arabidopsis thaliana* STYLISH1 protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis. *Plant Cell* 22 (2):349-363.
- El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* 140 (7):1373-1383.
- Engelhorn J, Reimer JJ, Leuz I, Gobel U, Huettel B, Farrona S, Turck F (2012) Development-related PcG target in the apex 4 controls leaf margin architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 139 (14):2566-2575.
- Fernández-Nohales P (2011) Papel de TERMINAL FLOWER1 en el control de la arquitectura vegetal. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia,
- Ferrándiz C (2002) Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 53 (377):2031-2038
- Ferrandiz C, Fourquin C, Prunet N, Scutt C, Sundberg E, Trehin C, Vialette-Guiraud A (2010) Carpel Development. *Advances in Botanical Research* 55:1-74.
- Ferrándiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF (2000a) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* 127 (4):725-734

- Ferrándiz C, Liljegren SJ, Yanofsky MF (2000b) Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development. *Science* 289 (5478):436-438
- Ferrándiz C, Pelaz S, Yanofsky MF (1999) Control of Carpel and Fruit Development in Arabidopsis. *Ann Rev Biochem* 68:321-354
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM (1999) Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* 283 (5409):1911-1914
- Fourquin C, Ferrandiz C (2014) The essential role of NGATHA genes in style and stigma specification is widely conserved across eudicots. *New Phytol* 202 (3): 1001-1013.
- Franco-Zorrilla JM, Solano R (2014) High-throughput analysis of protein-DNA binding affinity. *Methods Mol Biol* 1062:697-709.
- Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I (2004) VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 32 (Web Server issue):W273-279.
- Friml J, Yang X, Michniewicz M, Weijers D, Quint A, Tietz O, Benjamins R, Ouwerkerk PBF, Ljung K, Sandberg G, Hooykaas PJJ, Palme K, Offringa R (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306 (5697):862-865.
- Girin T, Paicu T, Stephenson P, Fuentes S, Körner E, O'Brien M, Sorefan K, Wood TA, Balanzá V, Ferrándiz C, Smyth DR, Ostergaard L (2011) INDEHISCENT and SPATULA Interact to Specify Carpel and Valve Margin Tissue and Thus Promote Seed Dispersal in Arabidopsis. *Plant Cell* 23 (10):3641-3653.
- Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pérez-Pérez J, Oliveros JC, Lorenzo O, Solano R (2011) Improved protein-binding microarrays for the identification of DNA-binding specificities of transcription factors. *Plant J* 66 (4):700-711.
- Gomariz-Fernández Á. Complejos transcripcionales implicados en la morfogénesis del gineceo. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Gomez-Mena C, de Folter S, Costa MM, Angenent GC, Sablowski R (2005) Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis. *Development* 132 (3):429-438.
- Gonzalez-Grandio E, Poza-Carrion C, Sorzano CO, Cubas P (2013) BRANCHED1 promotes axillary bud dormancy in response to shade in Arabidopsis. *Plant Cell* 25 (3):834-850.
- Gremski K, Ditta G, Yanofsky MF (2007) The HECATE genes regulate female reproductive tract development in Arabidopsis thaliana. *Development* 134 (20):3593-3601.
- Groszmann M, Bylstra Y, Lampugnani ER, Smyth DR (2010) Regulation of tissue-specific expression of SPATULA, a bHLH gene involved in carpel development, seedling

## BIBLIOGRAFÍA

- germination, and lateral organ growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 61 (5): 1495-1508.
- Groszmann M, Paicu T, Alvarez JP, Swain SM, Smyth DR (2011) SPATULA and ALCATRAZ, are partially redundant, functionally diverging bHLH genes required for *Arabidopsis* gynoecium and fruit development. *Plant J* 68 (5):816-829.
- Groszmann M, Paicu T, Smyth DR (2008) Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Plant J* 55 (1):40-52.
- Gu Q, Ferrandiz C, Yanofsky MF, Martienssen R (1998) The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* 125 (8):1509-1517
- Guo A-Y, Zhu Q-H, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J (2008) Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* 418 (1-2):1-8.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166 (4):557-580
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387 (6634):733-736.
- Heisler M, Atkinson A, Bylstra Y, Walsh R, Smyth D (2001) SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development* 128 (7):1089-1098
- Hellens RP, Allan AC, Friel EN, Bolitho K, Grafton K, Templeton MD, Karunairetnam S, Gleave AP, Laing WA (2005) Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* 1:13.
- Hiratsu K, Matsui K, Koyama T, Ohme-Takagi M (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J* 34 (5):733-739
- Hiratsu K, Ohta M, Matsui K, Ohme-Takagi M (2002) The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS Letters* 514 (2-3):351-354
- Hong RL, Hamaguchi L, Busch MA, Weigel D (2003) Regulatory Elements of the Floral Homeotic Gene AGAMOUS Identified by Phylogenetic Footprinting and Shadowing. *Plant Cell* 15 (6):1296-1309
- Honma T, Goto K (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409 (6819):525-529

- Hu YX, Wang YX, Liu XF, Li JY (2004) Arabidopsis RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Res* 14 (1):8-15.
- Hwang H-J, Kim H, Jeong Y-M, Choi MY, Lee S-Y, Kim S-G (2011) Overexpression of EVE1, a novel ubiquitin family protein, arrests inflorescence stem development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 62 (13):4571-4581.
- Ikeda M, Ohme-Takagi M (2009) A novel group of transcriptional repressors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 50 (5):970-975.
- Ikeda M, Ohme-Takagi M (2014) TCPs, WUSs, and WINDs: families of transcription factors that regulate shoot meristem formation, stem cell maintenance, and somatic cell differentiation. *Front Plant Sci* 5:427.
- Immink RG, Gadella TW, Jr., Ferrario S, Busscher M, Angenent GC (2002a) Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (4):2416-2421
- Immink RG, Pose D, Ferrario S, Ott F, Kaufmann K, Valentim FL, de Folter S, van der Wal F, van Dijk AD, Schmid M, Angenent GC (2012) Characterization of SOC1's central role in flowering by the identification of its upstream and downstream regulators. *Plant Physiol* 160 (1):433-449.
- Immink RG, Gadella TW, Jr., Ferrario S, Busscher M, Angenent GC (2002b) Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *PNAS* 99 (4):2416-2421
- Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, Inoue Y, Seki M, Sakakibara H, Sugimoto K, Ohme-Takagi M (2011) The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Curr Biol* 21 (6):508-514.
- Kagaya Y, Ohmiya K, 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 (2):470-478
- Kim S, Soltis PS, Wall K, Soltis DE (2006) Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family. *Molecular Biology and Evolution* 23 (1):107-120.
- Klein J, Saedler H, Huijser P (1996) A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. *Mol Gen Genet* 250 (1):7-16
- Koncz CA, J (1986) The promoter of the TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics* 204:383-396.
- Koyama T, Furutani M, Tasaka M, Ohme-Takagi M (2007) TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 19 (2):473-484.

## BIBLIOGRAFÍA

- Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M (2010) TCP transcription factors regulate the activities of *ASYMMETRIC LEAVES1* and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22 (11):3574-3588.
- Krizek BA, Fletcher JC (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat Rev Genet* 6 (9):688-698
- Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depege N, Huijser P, Merchant S (2005) A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (51):18730-18735.
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Long JA, Fridborg I, Sundberg E (2002) *STY1* and *STY2* promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis* gynoecium development. *Development* 129 (20):4707-4717
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Magnus Eklund D, Sundberg E (2006) Functionally redundant *SHI* family genes regulate *Arabidopsis* gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant J* 47 (1):99-111.
- Kwon SH, Chang SC, Ko JH, Song JT, Kim JH (2011) Overexpression of *Brassica rapa* *NGATHA1* Gene Confers De-Etiolation Phenotype and Cytokinin Resistance on *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology* 54 (2):119-125.
- Kwon SH, Lee BH, Kim EY, Seo YS, Lee S, Kim WT, Song JT, Kim JH (2009) Overexpression of a *Brassica rapa* *NGATHA* gene in *Arabidopsis thaliana* negatively affects cell proliferation during lateral organ and root growth. *Plant Cell Physiol* 50 (12):2162-2173.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21):2947-2948.
- Larsson E, Franks RG, Sundberg E (2013) Auxin and the *Arabidopsis thaliana* gynoecium. *J Exp Bot* 64 (9):2619-2627.
- Larsson E, Roberts CJ, Claes AR, Franks RG, Sundberg E (2014) Polar auxin transport is essential for medial versus lateral tissue specification and vascular-mediated valve outgrowth in *Arabidopsis* gynoecia. *Plant Physiol* 166 (4):1998-2012.
- Lee BH, Kwon SH, Lee SJ, Park SK, Song JT, Lee S, Lee MM, Hwang YS, Kim JH (2015) The *Arabidopsis thaliana* *NGATHA* transcription factors negatively regulate cell proliferation of lateral organs. *Plant Mol Biol* 89 (4-5):529-538.
- Lee J, Park JJ, Kim SL, Yim J, An G (2007) Mutations in the rice *liguleless* gene result in a complete loss of the auricle, ligule, and laminar joint. *Plant Mol Biol* 65 (4):487-499.

- Lee SH, Cho HT (2006) PINOID positively regulates auxin efflux in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell* 18 (7):1604-1616.
- Li S, Zachgo S (2013) TCP3 interacts with R2R3-MYB proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 76 (6):901-913.
- Liang X, Nazarenius TJ, Stone JM (2008) Identification of a consensus DNA-binding site for the Arabidopsis thaliana SBP domain transcription factor, AtSPL14, and binding kinetics by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 47 (12):3645-3653.
- Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* 404 (6779):766-770.
- Liljegren SJ, Roeder AHK, Kempin SA, Gremski K, Østergaard L, Guimil S, Reyes DK, Yanofsky MF (2004) Control of fruit patterning in Arabidopsis by INDEHISCENT. *Cell* 116 (6):843-853
- LLopis-Torregrosa V (2009) Identificación de posibles reguladores de la familia de factores de transcripción NGATHA. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia,
- Lohmann JU, Hong RL, Hobe M, Busch MA, Parcy F, Simon R, Weigel D (2001) A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell* 105 (6):793-803.
- Magnani E, Sjölander K, Hake S (2004) From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell* 16 (9):2265-2277.
- Mano Y, Nemoto K (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot* 63 (8):2853-2872.
- Mano Y, Nemoto K, Suzuki M, Seki H, Fujii I, Muranaka T (2010) The AMI1 gene family: indole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot* 61 (1):25-32.
- Marsch-Martinez N, de Folter S (2016) Hormonal control of the development of the gynoecium. *Curr Opin Plant Biol* 29:104-114.
- Marsch-Martinez N, Ramos-Cruz D, Irepan Reyes-Olalde J, Lozano-Sotomayor P, Zuniga-Mayo VM, de Folter S (2012a) The role of cytokinin during Arabidopsis gynoecia and fruit morphogenesis and patterning. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 72 (2):222-234.
- Marsch-Martinez N, Reyes-Olalde JI, Ramos-Cruz D, Lozano-Sotomayor P, V MZ-M, de Folter S (2012b) Hormones talking: Does hormonal cross-talk shapes the Arabidopsis gynoecium? *Plant signaling & behavior* 7 (12)
- Martín-Trillo M, Cubas P (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci* 15 (1):31-39.

## BIBLIOGRAFÍA

- Martinez-Fernandez I, Sanchis S, Marini N, Balanza V, Ballester P, Navarrete-Gomez M, Oliveira AC, Colombo L, Ferrandiz C (2014) The effect of NGATHA altered activity on auxin signaling pathways within the Arabidopsis gynoecium. *Front Plant Sci* 5:210.
- Matsui K, Umemura Y, Ohme-Takagi M (2008) AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* 55 (6):954-967.
- McCarty DR, Carson CB, Stinard PS, Robertson DS (1989) Molecular Analysis of viviparous-1: An Abscisic Acid-Insensitive Mutant of Maize. *Plant Cell* 1 (5):523-532.
- Moreno MA, Harper LC, Krueger RW, Dellaporta SL, Freeling M (1997) *liguleless1* encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis. *Genes Dev* 11 (5):616-628
- Moubayidin L, Ostergaard L (2014) Dynamic control of auxin distribution imposes a bilateral-to-radial symmetry switch during gynoecium development. *Curr Biol* 24 (22):2743-2748.
- Mouchel CF, Osmont KS, Hardtke CS (2006) BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature* 443 (7110):458-461.
- Nagpal P, Ellis CM, Weber H, Ploense SE, Barkawi LS, Guilfoyle TJ, Hagen G, Alonso JM, Cohen JD, Farmer EE, Ecker JR, Reed JW (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132 (18):4107-4118.
- Nath U, Crawford BCW, Carpenter R, Coen E (2003) Genetic Control of Surface Curvature. *Science* 299 (5611):1404-1407
- Navarrete-Gómez ML (2011) Análisis funcional de los genes reguladores del desarrollo del fruto y su relación con las vías reguladas por auxinas. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia
- Nemhauser J, Feldman L, Zambryski P (2000) Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. *Development* 127 (18):3877-3888
- Ng M, Yanofsky MF (2001) Activation of the Arabidopsis B class homeotic genes by APETALA1. *Plant Cell* 13 (4):739-753
- Nguyen CC, Nakaminami K, Matsui A, Kobayashi S, Kurihara Y, Toyooka K, Tanaka M, Seki M (2016) Oligouridylate Binding Protein 1b Plays an Integral Role in Plant Heat Stress Tolerance. *Front Plant Sci* 7:853.
- Oh E, Zhu JY, Ryu H, Hwang I, Wang ZY (2014) TOPLESS mediates brassinosteroid-induced transcriptional repression through interaction with BZR1. *Nat Commun* 5:4140.

- Oh E, Zhu JY, Wang ZY (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat Cell Biol* 14 (8):802-809.
- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H, Ohme-Takagi M (2001) Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* 13 (8):1959-1968
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* 3:677-684
- Okamoto JK, Caster B, Villarreal R, Van Montagu M, Jofuku KD (1997) The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (13):7076-7081
- Ori N, Cohen AR, Etzioni A, Brand A, Yanai O, Shleizer S, Menda N, Amsellem Z, Efroni I, Pekker I, Alvarez JP, Blum E, Zamir D, Eshed Y (2007) Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nat Genet* 39 (6):787-791.
- Ostergaard L (2009) Don't 'leaf' now. The making of a fruit. *Curr Opin Plant Biol* 12 (1):36-41.
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425 (6955):257-263.
- Parcy F, Nilsson O, Lee I, Busch M, Weigel D (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature* 395:561-566
- Pautot V, Dockx J, Hamant O, Kronenberger J, Grandjean O, Jublot D, Traas J (2001) KNAT2: evidence for a link between knotted-like genes and carpel development. *Plant Cell* 13 (8):1719-1734.
- Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2000) B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405 (6783):200-203.
- Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424 (6944):85-88.
- Preston JC, Hileman LC (2013) Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. *Front Plant Sci* 4:80.
- Rademacher EH, Möller B, Lokerse AS, Llavata-Peris CI, van den Berg W, Weijers D (2011) A cellular expression map of the *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. *Plant J* 68 (4):597-606.
- Rajani S, Sundaresan V (2001) The *Arabidopsis* myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology* 11:1914-1922
- Redei GP (1962) Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 47:443-460

## BIBLIOGRAFÍA

- Reyes-Olalde JI, Zuniga-Mayo VM, Chavez Montes RA, Marsch-Martinez N, de Folter S (2013) Inside the gynoecium: at the carpel margin. *Trends Plant Sci.*
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110 (4):513-520
- Riese M, Höhmann S, Saedler H, Münster T, Huijser P (2007) Comparative analysis of the SBP-box gene families in *P. patens* and seed plants. *Gene* 401 (1-2):28-37.
- Robles P, Pelaz S (2005) Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Dev Biol* 49 (5-6):633-643.
- Roeder A, Yanofsky M (2005) Fruit Development in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*
- Rubio-Somoza I, Zhou CM, Confraria A, Martinho C, von Born P, Baena-Gonzalez E, Wang JW, Weigel D (2014) Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes. *Curr Biol* 24 (22):2714-2719.
- Ryu H, Cho H, Bae W, Hwang I (2014) Control of early seedling development by BES1/TPL/HDA19-mediated epigenetic regulation of ABI3. *Nat Commun* 5:4138.
- Santner AA, Watson JC (2006) The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in *Arabidopsis*. *Plant J* 45 (5):752-764.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* 37 (5):501-506.
- Schommer C, Debernardi JM, Bresso EG, Rodriguez RE, Palatnik JF (2014) Repression of Cell Proliferation by miR319-Regulated TCP4. *Mol Plant* 7 (10):1533-1544.
- Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chetelat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U, Weigel D (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol* 6 (9):e230.
- Schuster C, Gaillochet C, Lohmann JU (2015) *Arabidopsis* HECATE genes function in phytohormone control during gynoecium development. *Development* 142 (19):3343-3350.
- Schuster C, Gaillochet C, Medzihradzky A, Busch W, Daum G, Krebs M, Kehle A, Lohmann JU (2014) A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals. *Dev Cell* 28 (4):438-449.
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18 (5):1121-1133.
- Sehra B, Franks RG (2015) Auxin and cytokinin act during gynoecial patterning and the development of ovules from the meristematic medial domain. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4 (6):555-571.
- Serrano R (1993) *Métodos de bioquímica y biología molecular*. Germany

- Serrano-Mislata A (2010) Análisis de la regulación transcripcional del gen *TERMINAL FLOWER1* de *Arabidopsis*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia,
- Serrano-Mislata A (2016) Separate elements of the *TERMINAL FLOWER1* cis-regulatory region integrate pathways to control flowering time and shoot meristem identity. *Development*. doi:DOI:10.1242/dev.135269
- Sessions A, Weigel D, Yanofsky MF (1999) The *Arabidopsis thaliana* *MERISTEM LAYER 1* promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J* 20 (2):259-263
- Sessions RA (1997) *Arabidopsis* flower development and gynoecium patterning in wild-type and *ettin* mutants. *Am J Bot* 84:1179-1191
- Sessions RA, Zambryski PC (1995) *Arabidopsis* gynoecium structure in the wild type and in *ettin* mutants. *Development* 121 (5):1519-1532
- Shani E, Yanai O, Ori N (2006) The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr Opin Plant Biol* 9 (5):484-489.
- Shao J, Liu X, Wang R, Zhang G, Yu F (2012) The over-expression of an *Arabidopsis* B3 transcription factor, *ABS2/NGAL1*, leads to the loss of flower petals. *PLoS One* 7 (11):e49861.
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2:755-767
- Sohlberg JJ, Myrenas M, Kuusk S, Lagercrantz U, Kowalczyk M, Sandberg G, Sundberg E (2006) *STY1* regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *Plant J* 47 (1):112-123.
- Soltis DE, Chanderbali AS, Kim S, Buzgo M, Soltis PS (2007) The ABC model and its applicability to basal angiosperms. *Annals of Botany* 100 (2):155-163.
- Somerville C, Koornneef M (2002) A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat Rev Genet* 3 (11):883-889.
- Sorefan K, Girin T, Liljegren SJ, Ljung K, Robles P, Galván-Ampudia CS, Offringa R, Friml J, Yanofsky MF, Ostergaard L (2009) A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 459 (7246):583-586.
- Staldal V, Cierlik I, Chen S, Landberg K, Baylis T, Myrenas M, Sundstrom JF, Eklund DM, Ljung K, Sundberg E (2012) The *Arabidopsis thaliana* transcriptional activator *STYLISH1* regulates genes affecting stamen development, cell expansion and timing of flowering. *Plant Mol Biol* 78 (6):545-559.
- Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, Ljung K, Alonso JM (2011) The *Arabidopsis* *YUCCA1* flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell* 23 (11):3961-3973.

## BIBLIOGRAFÍA

- Stone JM, Liang X, Nekl ER, Stiers JJ (2005) Arabidopsis AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *Plant J* 41 (5):744-754.
- Sun Y, Fan XY, Cao DM, Tang W, He K, Zhu JY, He JX, Bai MY, Zhu S, Oh E, Patil S, Kim TW, Ji H, Wong WH, Rhee SY, Wang ZY (2010) Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev Cell* 19 (5):765-777.
- Sundberg E, Ostergaard L (2009) Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (6):a001628.
- Swaminathan K, Peterson K, Jack T (2008) The plant B3 superfamily. *Trends Plant Sci* 13 (12):647-655.
- Takase T, Nakazawa M, Ishikawa A, Kawashima M, Ichikawa T, Takahashi N, Shimada H, Manabe K, Matsui M (2004) ydk1-D, an auxin-responsive GH3 mutant that is involved in hypocotyl and root elongation. *Plant J* 37 (4):471-483
- Tao Z, Shen L, Liu C, Liu L, Yan Y, Yu H (2012) Genome-wide identification of SOC1 and SVP targets during the floral transition in Arabidopsis. *Plant J* 70 (4):549-561.
- Theissen G (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol* 4 (1):75-85
- Theissen G, Melzer R (2007) Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower. *Annals of Botany* 100 (3):603-619.
- Theissen G, Saedler H (2001) Plant biology. Floral quartets. *Nature* 409 (6819):469-471.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis [et al] Chapter 2:Unit 2 3.*
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* 16 (2):533-543.
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH (2003) The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15 (8):1749-1770
- Triezenberg SJ, Kingsbury RC, McKnight SL (1988) Functional dissection of VP16, the *trans*-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev* 2:718-729
- Trigueros M (2008) Análisis funcional de los factores de transcripción TOWER-OF-PISA1 y TOWER-OF-PISA2 y su implicación en el desarrollo del gineceo de Arabidopsis. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia
- Trigueros M, Navarrete-Gómez M, Sato S, Christensen SK, Pelaz S, Weigel D, Yanofsky MF, Ferrándiz C (2009) The NGATHA Genes Direct Style Development in the Arabidopsis Gynoecium. *Plant Cell* 21 (5):1394-1409.

- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276 (5320):1865-1868
- Unte US, Sorensen A-M, Pesaresi P, Gandikota M, Leister D, Saedler H, Huijser P (2003) SPL8, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15 (4):1009-1019
- Varaud E, Brioudes F, Szecsi J, Leroux J, Brown S, Perrot-Rechenmann C, Bendahmane M (2011) AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates *Arabidopsis* petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp. *Plant Cell* 23 (3):973-983.
- Vert G, Chory J (2006) Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* 441 (7089):96-100.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33 (5):949-956
- Wang L, Fobert PR (2013) *Arabidopsis* clade I TGA factors regulate apoplastic defences against the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* through endoplasmic reticulum-based processes. *PLoS One* 8 (9):e77378.
- Weigel D, Ahn J, Blázquez M, Borevitz J, Christensen S, Fankhauser C, Ferrándiz C, Kardailsky I, Malancharuvil E, Neff M, Nguyen J, Sato S, Z W, Xia Y, Dixon R, Harrison M, Lamb C, Yanofsky M, Chory J (2000) Activation Tagging in *Arabidopsis*. *Plant Phys* 122:1003-1013
- Weigel D, Meyerowitz EM (1994) Morphology and development of *leafy* mutants. In: Bowman JL (ed) *Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development*. Springer, New York, pp 206-211
- Weigel D and Glazebrook, J (2002) *Arabidopsis: A laboratory manual*.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2 (8):e718.
- Wu H, Mori A, Jiang X, Wang Y, Yang M (2006) The INDEHISCENT protein regulates unequal cell divisions in *Arabidopsis* fruit. *Planta* 224 (4):971-979.
- Wynn AN, Seaman AA, Jones AL, Franks RG (2014) Novel functional roles for PERIANTHIA and SEUSS during floral organ identity specification, floral meristem termination, and gynoecial development. *Front Plant Sci* 5:130.
- Xing S, Salinas M, Garcia-Molina A, Hohmann S, Berndtgen R, Huijser P (2013) SPL8 and miR156-targeted SPL genes redundantly regulate *Arabidopsis* gynoecium differential patterning. *Plant J* 75 (4):566-577.

## BIBLIOGRAFÍA

- Yamaguchi N, Wu MF, Winter CM, Berns MC, Nole-Wilson S, Yamaguchi A, Coupland G, Krizek BA, Wagner D (2013) A molecular framework for auxin-mediated initiation of flower primordia. *Dev Cell* 24 (3):271-282.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Hayami N, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2004) Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1. *Plant Cell* 16 (12):3448-3459.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Terada T, Shirouzu M, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2006) An Arabidopsis SBP-domain fragment with a disrupted C-terminal zinc-binding site retains its tertiary structure. *FEBS Lett* 580 (8):2109-2116.
- Yang C, Li D, Mao D, Liu X, Ji C, Li X, Zhao X, Cheng Z, Chen C, Zhu L (2013) Overexpression of microRNA319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell & Environment* 36 (12):2207-2218.
- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346:35-39
- Yu X, Li L, Zola J, Aluru M, Ye H, Foudree A, Guo H, Anderson S, Aluru S, Liu P, Rodermeil S, Yin Y (2011) A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 65 (4):634-646.
- Zambrano Rodriguez JA (2013) Caracterización funcional del gen VOZ1, su papel en el control de la arquitectura de la inflorescencia a través de la regulación de TFL1. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia,
- Zhang Y, Du L, Xu R, Cui R, Hao J, Sun C, Li Y (2015) Transcription factors SOD7/NGAL2 and DPA4/NGAL3 act redundantly to regulate seed size by directly repressing KLU expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 27 (3):620-632.
- Zhao D, Yu Q, Chen M, Ma H (2001) The ASK1 gene regulates B function gene expression in cooperation with UFO and LEAFY in *Arabidopsis*. *Development* 128 (14):2735-2746
- Zhao M, Morohashi K, Hatlestad G, Grotewold E, Lloyd A (2008) The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development* 135: 1991-1999.
- Zhou M, Li D, Li Z, Hu Q, Yang C, Zhu L, Luo H (2013) Constitutive expression of a miR319 gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass. *Plant Physiology* 161 (3):1375-1391.

Zuniga-Mayo VM, Reyes-Olalde JI, Marsch-Martinez N, de Folter S (2014) Cytokinin treatments affect the apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium and resemble the effects of polar auxin transport inhibition. *Front Plant Sci* 5:191.



**ANEXOS**



## ANEXO I

Nombre	Secuencia	Proposito	Secuencia que aparea	Orientación
OMNG42	TGGAATGTGGCAATGACTATAATCA	qRT-PCR NGA (Trigueros et al., 2009)	NGA3	F
OMNG43	GTGGCACCAACCATGACTCTT	qRT-PCR NGA (Trigueros et al., 2009)	NGA3	R
OMNG44	TCGTCTCCGGTTGTGATCAG	qRT-PCR NGA (Trigueros et al., 2009)	NGA4	F
OMNG45	TGGCGACCTCCAAAATGATT	qRT-PCR NGA (Trigueros et al., 2009)	NGA4	R
OMNG46	GGAGAGCACAAAGTCGCTTCAA	qRT-PCR NGA (Trigueros et al., 2009)	NGA2	F
OMNG47	GCCTTAACCGCTTCTCTCCTC	qRT-PCR NGA (Trigueros et al., 2009)	NGA2	R
OMNG48	CAGCTTTCCTTCGACCAATTACA	qRT-PCR NGA (Trigueros et al., 2009)	NGA1	F
OMNG49	TGACGTTGCTGCTGATGATTATAAA	qRT-PCR NGA (Trigueros et al., 2009)	NGA1	R
UBC21F	TGCGACTCAGGGAATCTTCTA	qRT-PCR NGA (Trigueros et al., 2009)	UBC21	F
UBC21R	CATCATCCTTCTTAGGCATAGC	qRT-PCR NGA (Trigueros et al., 2009)	UBC21	R
oPBF3	ATGAATAATTATAATATGAACCCAT	amplicifar CDS HEC3	HEC3	F
oPBF4	CTAGATTAATTCTCCTACTGCTCT	amplicifar CDS HEC3	HEC3	R
oPBF7	ATGGATTCTGACATAATGAACATGA	amplicifar CDS HEC1	HEC1	F
oPBF8	TCATCTAAGAAATCTGTGCATTGC	amplicifar CDS HEC1	HEC1	R
oPBF11	AGCCATGGATAGATCCATTAT	clonar promotor TOP1/NGA3 Arabidopsis	NGA3	R + NcoI
oPBF12	ATGGATGAGGTAGGAGCTCA	amplicifar CDS SPL14	SPL14	F
oPBF13	CTAGATTGAGCCATAATCCAAA	amplicifar CDS SPL14	SPL14	R
oPBF18	CGAATAGAGGAGCTGCAGAT	genotipar SPL14 (SAIL-1247 G10)	SPL14	F
oPBF23	GAGATCTCCAACCTGAATCATCT	oligo aguas arriba ATG para amplificar CDS SPL14	SPL14	F
oPBF24	GTGTGTACAGTCATGTCTCT	oligo aguas abajo STOP para amplificar CDS SPL14	SPL14	R
oPBF28	GAGCTCAGGGGCCCA	oligo reverso corto (trimero)	NGA3	R
oPBF29	GATTGAGCCATAATCCAAACCT	quitar codon STOP a SPL14	SPL14	R

oPBF30	ATCGGTCGGGGGGGCATGGATTGAGCCATAATCCAAC CT	añadir VP16 a SPL14	SPL14-VP16	R
oPBF31	TTACTGCAGCCACCCTAC	añadir VP16	VP16	R
oPBF32	CATGCCCCCGACCGAT	añadir VP16	VP16	F
oPBF41	GAATTCATGAAAAGGA	oligo directo corto (trimero)	NGA3	F
oPBF42	ATGGGTGAGTTACCAAGGAT	amplificar CDS SPL16	SPL16	F
oPBF43	TTAGATTGAGCCATAATCAAG	amplificar CDS SPL16	SPL16	R
oPBF46	CCCGGAAATTCATGAAAAGGA	oligo directo corto (trimero xmaI)	NGA3	F + XmaI
oPBF47	TCTAGAGCTCAGGGGCCCA	oligo directo corto (trimero xbaI)	NGA3	R + XbaI
oPBF48	CCGGATGAAAAGGACAAGAGCTCACATGACCCGAACC ATATCATTTCATGGGCCCT	monomero xmaI	NGA3	F + XmaI
oPBF50	CTAGAGGGCCCATGAATGATATGGTTGGGGTCATGTG AGCTTCTTGCTCTTTTCAT	monomero xbaI	NGA3	R + XbaI
Lb1	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG	genotipar SALK	T-DNA	R
Lb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCACT	genotipar SALK	T_DNA	R
M13F	GTA AACGACGGCCAG	secuenciar	-	F
M13R	CAGAAACAGCTATGAC	secuenciar	-	R
CFYtri	AATTCATGAAAAGGACAAGAGCTCACATGACCCGAACC ATATCATTTCATGGGCCCTATGAAAAGGACAAGAGCTC ACATGACCCGAACCATATCATTTCATGGGCCCTATGAAA AGGACAAGAGGCTCACATGACCCGAACCATATCATTTCAT GGGCCCTGAGCTC	TRIMERO	NGA3	
pTUY1H F	CACGAGGCCCTTTCGTCTTC	oligo plasmido pYUY1H	pTUY1H	F
pTUY1H R	TTCCTCGAAGAAATCACATTAC	oligo plasmido pYUY1H	pTUY1H	R
8474	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT	genotipar GABI-KAT	T-DNA	R
8409	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT	genotipar GABI-KAT	T-DNA	R
oPBF51	ATTCCATCTGCAATGTCC	amplificar CDS SPL16	SPL16	R
oPBF53	AATTATTGTTGGTTAGCAC	clonar promotor TOP1/NGA3 sin región 270pb Arabidopsis	NGA3	R
oPBF55	TGCTGCCTGCATTGACCAA	genotipar SPL16 (GK 085-F04)	SPL16	R
oPBF58	CACAGCTACAGGTGACACTGA	genotipar SPL14 (SAIL-1247 G10)	SPL14	R

oPBF59	AAAAATTGCATCTTCAACAA	genotipar SPL16 (GK 085-F04)	SPL16	F
oPBF62	ATGTCGTCTCCACCAATGACTAC	amplificar CDS TCP1	TCP1	F
oPBF63	TTATGCAAAATCCAGTCTGAGTTCAGGTCGAGATCCAG GTTTACAAAAGAGTCTTGAATCCAA	añadir SRDX a TCP1	TCP1-SRDX	R
oPBF64	TCAGTTCITGGCCTTACCC	amplificar CDS TCP2	TCP2	R
oPBF65	ATGATTGGAGATCTAATG	amplificar CDS TCP2	TCP2	F
oPBF79	CAGGAACCAGGGGTATCTCTT	oligo reverso LUC para secuenciar	LUC	R
oPBF80	CCCGGGTCATTGTCTCGATTGTAAT	clonar promotor STY1 Arabidopsis	STY1	F + SmaI
oPBF81	CCATGGCCATTACCAAGACAACAA	clonar promotor STY1 Arabidopsis	STY1	R + NcoI
oPBF83	GTGCTAACCAACAATAATCAATCTCGCTCTCTCTCTCTA AG	clonar promotor TOP1/NGA3 sin región 270pb Arabidopsis	NGA3	F
oPBF98	AAGTAATCATGGCATGCCAACAA	para secuenciar promotor de NGA sin frag.(270)	NGA3	F
oPBF101	ATGGAAGCTAGAATTGATGAAGG	amplificar CDS SPL1	SPL1	F
oPBF102	TCAGCTTGTTCCATAGTCCAATAA	amplificar CDS SPL1	SPL1	R
oPBF103	ATGGAAGCTAGAATTGAAGGTG	amplificar CDS SPL12	SPL12	F
oPBF104	CTAGCTTGTTCCATAGTCCAATAA	amplificar CDS SPL12	SPL12	R
oPBF105	CTGACATCGGTGGGGGGCATGGTTTACAAAAGA	añadir VP16 a TCP1	TCP1-VP16	R
oPBF115	ATGGAAGAGAAAATTGCAAAACAAGG	amplificar cds LA Solanum	LA	F
oPBF116	TTACTGCTCCACCACTACCCACCAG	amplificar cds LA Solanum	LA	R
oPBF123	CCATGGTTTAGGACCCAGCATAGATCTAATCA	clonar promotor NGAa Solanum	NGAa	R + NcoI
oPBF124	CCCGGGTCATTAGAGACCACAAAATATTTCAT	clonar promotor NGAa Solanum	NGAa	F + SmaI
oPBF130	AACCCGTTTTATCAATTGTTGTG	genotipar tcp2-1 (LP SAIL_562_D05)	TCP2	LP
oPBF131	AACCGGAATTTAACAAAATCCG	genotipar tcp2-1 (LP SAIL_562_D05)	TCP2	RB
GR F	GGCCGTCTCACTGGCCAATTCAGC	genotipar GR	GR	F
GR R	GGCCGTCTCACTGGAAGCTCATTTTT	genotipar GR	GR	R
2x35S prom	GGATGACGCACAATCCCACTATCC	genotipar/secuenciar	promotor 35s	F
SPT473	GATCCCTTGTTAAATTTGACGATT	qRT_PCR chip (Girin et al., 2011)	SPT	F

SPT776	TGCAACATTCACCTAACCTCGTAT	qRT_PCR chip (Girin et al., 2011)	SPT	R
Mu-like-F	GATTTACAAGGAATCTGTTGGTGGT	qRT_PCR chip (Girin et al., 2011)	Mu-like	F
Mu-like-R	CATAACATAGTTTAGAGCATCTGC	qRT_PCR chip (Girin et al., 2011)	Mu-like	R
NRT2.1-F	AACAAGGGCTAACGTGGATG	qRT_PCR chip (Girin et al., 2011)	NRT2	F
NRT2.1-R	CTGCTTCTCCTGCTCATTCC	qRT_PCR chip (Girin et al., 2011)	NRT2	R
WAG2F	CCGACCGTACATTCACCTCATCAAG	qRT_PCR chip (Sorefan et al., 2009)	WAG2	F
WAG2R	ATCCGGTAGGGTTAGGGCAATCA	qRT_PCR chip (Sorefan et al., 2009)	WAG2	R
PID-678F	TTCGTTTATTCTAGCCATTTCACA	qRT_PCR chip (Sorefan et al., 2009)	PID	F
PID-368R	CCTCTCGCTAAATTTTGTGTTGTT	qRT_PCR chip (Sorefan et al., 2009)	PID	R
WAG2-F	GACGGACACGTCATGTTGTCGGA	qRT_PCR WAG2 (Girin et al., 2011)	WAG2	F
WAG2-R	GTGTCCGTTGCCGGAACACTAGCT	qRT_PCR WAG2 (Girin et al., 2011)	WAG2	R
PID-F	GCCAGATTTTATGCCGCCGAAGT	qRT_PCR PID (Girin et al., 2011)	PID	F
PID-R	GAAGACGAGGAAGATTCAACGGCT	qRT_PCR PID (Girin et al., 2011)	PID	R
Lb1.3	ATTTTGCCGATTCGGAAC	genotipar SALK	T-DNA	R
I miR-s	GATACAAAGTAACCTTATGCCAGTCTCTCTTTGTATTCC	diseño amiR-SPL1 SPL12	microRNA SPL1 SPL12	R
II miR-a	GACTGGCATAAGGTTACTTTGTATCAAAAGAAATCAATG A	diseño amiR-SPL1 SPL12	microRNA SPL1 SPL12	F
III miR*s	GACTAGCATAAGGTTTCTTTGTTTCCACAGGTCGTGATAT G	diseño amiR-SPL1 SPL12	microRNA SPL1 SPL12	R
IV miR*a	GAACAAAGAAACCTTATGCTAGTCTACATATATATTCCT	diseño amiR-SPL1 SPL12	microRNA SPL1 SPL12	F
A	CTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAA	diseño amiR-SPL1 SPL12	microRNA SPL1 SPL12	F
B	GCGGATAACAATTTCCACACAGGAAACA	diseño amiR-SPL1 SPL12	microRNA SPL1 SPL12	R
SPL14SRDX_r	TTATGCAAATCCCAGTCTGAGTTCCAGGTCGAGATCCAG GATTGAGCCATAATCCAAA	añadir SRDX a SPL14	SPL14-SRDX	R
SPL8VP16_r	ATCGGTCGGGGGGGCATGTCGGCTGGAGAAAAACATT	añadir VP16 A SPL8	SPL8-VP16	R
LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	genotipar SAIL	T-DNA	R
LB3	TAGCATCTGAATTTTATAACCAATCTCGATACAC	genotipar SAIL	T-DNA	R
NGA1 f link flex	GCGATCCGTCGACACACCTACTCCCTCTCCAGCGATC GCCATGATGACAGATTATCTC	amplificar GR:NGA1	NGA1	F

NGA1 r STOP	CCCCGGTTATTGATCCAAATCAAAAAGACAATG	amplificar GR:NGA1	NGA1	R
GR f ATG	GCCATGGAAGCTCGAAAAACAAAG	amplificar GR:NGA1	GR	F
GR r link flex	GGCGATCGCTGGAGAGGGAGTAGGGTGGTGTGCGACGGA ATCGCTTTTTGATGAAACAGAAAG	amplificar GR:NGA1	GR	R
SS43	CCAACGGCTCTGATCCAACAATG	genotipar NGA3	NGA3	R
SS44	ACCGTCGACAACTAAACATATACATAC	genotipar NGA3	NGA3	F
EN8130	GAGCGTCGGTCCCCACACACTTCTATAC	genotipar NGA2/NGA3/NGA4	Spm	R
SS65	CCTCTCGAGTGATACTTTTTGATGAATATCTCAAC	genotipar NGA4	NGA4	F
SS66	GGAGGATCCTCTTCAAAAGCTCTAAAAGATTTCCC	genotipar NGA4	NGA4	R
oMNG15	CCAACCATAGAAACTCTGCC	genotipar NGA2	NGA2	R
oMNG14	CGACAAAAGTAGTAACACCCAAG	genotipar NGA2	NGA2	F
oTOL2Rwt	AGCAGCAGCAGCAGCCATATTTAG	genotipar NGA1	NGA1	R
SS071	AACGTCATCATCACAGTGGTGGG	genotipar NGA1	NGA1	F
P745	AACGTCCGCAATGTATTAAAGTTGTC	genotipar NGA1	T-DNA	R
oKG156	ACCACAACAACACTTACCCTTTTC	genotipar HEC1	HEC1	F
oKG157	GTTCCACACCCCTTTCATAACCACT	genotipar HEC1	HEC1	R
Gabi-T	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	genotipar HEC1	T-DNA	R
ILC-X8	GTGCTATTTTCGTGAAGAGACAAGAGA	genotipar HEC3	HEC3	F
ILC-X3	TCCTAACAAAACCCCTTATTTTCGTATCCA	genotipar HEC3	HEC3	R
LBb3	AACCAGCGTGGACCGCTTGGTG	genotipar HEC3	T-DNA	F
OMG29	TAACTCCACAACAACGACAG	genotipar NGA2	NGA2	F
SS043	CCAACGGCTCTGATCCAACAATG	genotipar NGA3	NGA3	R
qSPL14.FW1	TTGAAGCTAAACCGGTGGATG	qRT-PCR SPL14	SPL14	F
qSPL14.REV1	CAAGTCCTCTTCTTCCACTCC	qRT-PCR SPL14	SPL14	R
qSPL1 F	GGATTTGTTTTCTCCGACGTTTA	qRT-PCR SPL1	SPL1	F
qSPL1 R	TTTGTGAGCAATGTAGAGTTCC	qRT-PCR SPL1	SPL1	R

qSPL12 F	TCTGTCCTCGTAAGGCAACTGGAA	qRT-PCR SPL12	SPL12	F
qSPL12 R	TGGAGATGCACAGAGCCCGTACTGA	qRT-PCR SPL12	SPL12	R
qUBQ10 F	CACACTCCACTTGGTCTTGCCT	qRT-PCR	UBQ10	F
qUBQ10 R	TGGTCTTCCGGTGAGAGCTTTCA	qRT-PCR	UBQ10	R
qHEC1 F	GGGGGAGTGGTTATGAAAGGGTGT	qRT-PCR HEC1	HEC1	F
qHEC1 R	TGCATTGCCACCACCATCTGATGAGT	qRT-PCR HEC1	HEC1	R
qHEC2 F	TGCGGGTACTGTTGGTGAGGATA	qRT-PCR HEC2	HEC2	F
qHEC2 R	TGATCAGACCCGCATAATGCCACAC	qRT-PCR HEC2	HEC2	R
qHEC3 F	ACCTGGCAGGAGTCTCTGAAGAA	qRT-PCR HEC3	HEC3	F
qHEC3 R	GGCTAGACATCGCCGTGAGAGAAT	qRT-PCR HEC3	HEC	R
qRT-TIP41 F	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA	qRT-PCR	TIP41	F
qRT-TIP41 R	TCAACTGGATACCCCTTTCGCA	qRT-PCR	TIP41	R

# **AGRADECIMIENTOS**



## AGRADECIMIENTOS

Muy de vez en cuando tienes la oportunidad de hacer algo que deje una huella indeleble en tu vida y sin duda para mí una de esas huellas ha sido realizar esta tesis doctoral. Sin embargo, sería imposible realizar un proyecto de este tipo sin la orientación, talento e influencia de otras personas. Por este motivo quiero dar las gracias a todas ellas por su esfuerzo, y en especial a todos aquellos que a lo largo de esta etapa me animaron a conseguirlo.

En primer lugar quiero dar las gracias a mi directora y cari-jefa, Cris. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar en tu laboratorio, y es que, quien tenga la posibilidad de trabajar contigo se puede considerar muy afortunado. Gracias por ver el lado positivo del trabajo, incluso cuando eran equivocaciones, por enseñarme y animarme a tomar otro camino cuando nos hemos encontrado con resultados que simplemente no eran los que esperábamos, en definitiva, gracias por dirigirme tan bien y hacer de mi una buena investigadora. Sin duda, tus reflexiones, sensibilidad y aguda capacidad investigadora han sido una bendición a la que nunca podré corresponder en la medida que se merece. Pero sobre todo, gracias por ser más que una jefa, una amiga. También quiero darle las gracias a Paco, el cari-jefe, por darme fuerzas con ese delicioso gazpacho andaluz que prepara, por ser un brillante investigador, por ayudarme con las traducciones al inglés, por tu ojo clínico, y las sugerencias que has realizado al trabajo y por tu profunda atención a los detalles. Pero principalmente, muchas gracias Paco por tener siempre palabras de apoyo.

Quiero dar miles de gracias al maravilloso equipo de compañeros de laboratorio que han compartido conmigo estos años. A mi gran compañera y amiga Irene, que me ha acompañado prácticamente en toda la tesis, y cuyas habilidades organizativas y talento me han ayudado muchísimo, hemos trabajado codo con codo, hemos reído, hemos llorado, nos hemos enfadado ... y ha llegado el punto en que solo con mirarnos ya sabemos lo que hay, nunca te lo agradeceré bastante, eres una grande, no lo olvides. Y a Vicente, el alfa del lab, como te hemos echado de menos, pero ya estas de vuelta!!, gracias por tu consejo experto, tu apoyo y por tu amistad. A Afri, Pepe, M. Ángeles, Ana y Vero, por ayudarme siempre que habéis podido, por vuestro apoyo, por los ratitos de risas, charlas, por vuestra paciencia, y por aportar diferentes puntos de vista y soluciones. También quiero agradecerle de corazón a Majo que sea tan buena compañera y amiga, eres una grandísima profesional y solo tengo palabras de agradecimiento por enseñarme tanto, por resolver mis dilemas, y en más de una ocasión hacerme respirar y ver el lado bueno de las cosas. Y a súper Anita, muchas gracias especialmente por tu amistad, siento gran admiración por esa vitalidad y capacidad que tienes, muchas gracias también por siempre estar dispuesta a ayudarme con una sonrisa aunque te desborde la faena y por ayudarme una y mil veces a poner mis cuantitativas. Muchísimas gracias también: a Marina por estar siempre dispuesta a ayudarme con los oligos, con las cuantitativas, con la bibliografía... ; a Marcos, que con las ganas y energía con las que has empezado, me has dado fuerza para terminar, no pierdas jamás esas ganas, y fuera dudas y negatividad; y a Carlos, por sus bonitas palabras de apoyo y de ánimo estos últimos meses.

Además en esta tesis doctoral he tenido la oportunidad de dirigir a algunos "cachorrillos" ya fueran en sus prácticas de grado, TFGs y TFGs, Alex, Sofía, Pedro, Ana, Miguel, Lucía, a todos ellos muchísimas gracias por los momentos de risas, por su paciencia, y por enseñarme a enseñar, me siento tremendamente orgullosa de ser un puntito en vuestra carrera científica.

Quiero dar las gracias a las chicas que trabajaron anteriormente en este proyecto, ya que sin sus avances, nada hubiera sido igual. A Vicent, con el que empecé en el labo y del que heredé el trabajo sobre SPL14, gracias por ayudarme y ser tan buena persona. También a Rocío, que tanto me ayudó con los genotipados de HECATE al principio. Y a Carol, que siempre ha estado dispuesta a ayudarme a plaquear semillitas y mucho más, aun cuando no tenía porqué, por los consejos, por los ánimos, por recibir los cambios siempre de una manera positiva y vivir con una sonrisa (muchos tendríamos que aprender). Así como, algunos compañeros que han compartido diferentes momentos de mi tesis y que ahora siguen su camino fuera del labo: Chloè, Mónica, Amparo, Antoñete, Jose Alfredo, Pedrete, Carla (y sus tartas), Lorena, Max (y las tartas de su madre) ...

También durante esta tesis, he tenido el privilegio de ir a trabajar a los laboratorios: del Dr. Luis Oñate Sánchez, al de los Dres. Stefan de Folter y Nayelli Marsch Martínez, y al de la Dra. Simona Masiero, a todos muchísimas gracias por acogerme en vuestros laboratorios y hacerme sentir como en casa. Además en todas estas estancias conocí a grandes compañeros que también me ayudaron a adaptarme a su modo de trabajo, me indicaron donde estaban los utensilios, me cuidaron y me enseñaron los lugares típicos de sus ciudades, Mariana, Carla, Sergi, Irma, Eva, Marta, Goyo, muchas gracias por todo.

## AGRADECIMIENTOS

También quiero dar las gracias a los compañeros del EVOCODE que han pasado por el laboratorio: Humberto, Víctor, los machos mexicanos, y como no, a las chicas Brasileñas Priscilla, Stéfanie, pero sobre todo a las guapísimas Nacielle y Mariana, a las que quiero con locura y que pasaron de ser compañeras del labo a formar parte importante de mi vida. Naci, gracias por tener ese grandísimo corazón, aunque nos separe la distancia, y tardemos en hablar, siempre estás cuando te necesito. Y Mariana, no sabes cuanto te agradezco tus consejos, tus ánimos, principalmente ahora al final, siempre tienes bonitas palabras para ayudarme, ya sabes te quiero mogollón, gracias.

Quiero darle las gracias también a mi tutora Lynne, por apoyarme en todo lo que he necesitado, por facilitarme muchísimo los trámites con la escuela de doctorado, por siempre estar dispuesta a ayudarme si me surgía alguna duda en los ensayos de levadura, por dejarme utilizar su nespreso y por siempre ser tan cercana.

Me gustaría agradecer también a todo el personal de los servicios técnicos del IBMCP; pero sobretodo, a Victoria y todo el equipo del invernadero que tan bien cuidan de nuestras Arabidopsis, y no me olvido de Toni, muchas gracias por siempre tener bonitas y listas mis Nicotianas; a Alexis, por ser mi amigo, darme consejos y ánimos con un buen café y por siempre ayudarme con los problemas informáticos que no han sido pocos; a Marisol, por resolver todas las dudas que me surgían con la lupa, el microscopio y el confocal con una flamante sonrisa, y por siempre ayudarme a sacar las fotos más bonitas. Así como, al personal del Servicio de Microscopía Electrónica de la UPV por toda la ayuda que me han prestado.

Gracias también a un círculo de amigos muy especial: los Masters del Universo, los Biotecs: Rafi, Ceci, Lau, los kiwitos: Félix e Iván, los papis: Juanvi y Vanesa, y Cris Codes, gracias por vivir día a día la tesis conmigo, teneros como amigos es muy importante para mí y sin vosotros esta tesis no hubiera sido lo mismo. Me siento realmente afortunada de haber coincidido con vosotros en el máster y de compartir mil y un momentazos. Gracias por estar siempre ahí.

También quiero agradecer a Edu, Isa, Alba (my sun), Jesús, Marcos, Irene, Elena, Gaetano, Estefanía, Borja... todas las palabras de ánimo, ayuda, consejos, y más momentos que hemos compartido, sois unos grandísimos compañeros y amigos. Así como, también quiero darle las gracias a muchos otros compañeros del IBMCP que me dejo por nombrar, a todos, ¡ MUCHÍSIMAS GRACIAS !

ii Que recuerdos tan bonitos me deja esta etapa de mi vida a vuestro lado !!

Fuera de este mundillo de la ciencia, quiero darles las gracias a mis amigos: Bea, Carlos, Juana Mari, Rafa, Mariano, Davinia, Oscar, Anahí, Roberto, Jose y Marta, que han compartido todo el proceso, os agradezco vuestro apoyo e interés sin límites. Como olvidar a los mocitos, Amparo, Laura, Juanjo, que tiene mil palabras bonitas siempre listas para levantarme el ánimo, y no se cansa de decirme que soy la mejor, y a Ana y Sergio, cuyo cariño y amistad han sido clave para este trabajo. A Vanne, por la paciencia estos años y por los ánimos, a Cris Camps y Tania, por las quedadas para ponernos al día y despejarnos, y a Mari Carmen, por ser tan buena amiga, por animarme y por abandonar a tus compañeras para almorzar conmigo y que así desconectara un rato.

Y, por supuesto, quiero dar las gracias a toda mi familia por su apoyo y comprensión. Gracias muy especiales a mi princesa Daniela, por quitarme los agobios con tantos y tantos besos y abrazos. Pero sobre todo a mi hermano, Juan, cuyo ánimo y entusiasmo han significado mucho para mí durante este proceso, también quiero darle las gracias a Virginia, que le ha puesto la guinda al pastel, y me ha ayudado a vestir mi tesis. Y como no a los más importantes, a mis padres, que me han enseñado que la disciplina, profesionalidad y trabajo duro tienen siempre recompensa. Gracias papás, os quiero mucho.

Por último, quiero dar infinitas gracias a mi marido, Manuel, muchas gracias por todo, has sido una parte fundamental en este trabajo, gracias por ayudarme en tantas cosas, gracias por celebrar los ratos buenos y por animarme a continuar y enseñarme a no tirar la toalla cuando algún experimento se me ha resistido, por traerme algún que otro fin de semana e incluso en vacaciones, gracias por esperar tantas veces fuera del instituto, gracias, gracias, gracias... Eres lo mejor que me ha pasado en la vida, te amo.



