



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas 2015-2017

Conservación funcional de factores transcripcionales que dirigen la formación de estilo y estigma en las Angiospermas

- Trabajo Final de Máster -

Autora: Verónica Sánchez Gerschon

Directora: Cristina Ferrándiz Maestre

Codirectora: África Gomáriz Fernández

RESUMEN

El gineceo es el órgano reproductivo femenino de la flor. Tiene importancia tanto económica como evolutiva, ya que además de dar lugar a productos de interés agronómico, en las plantas angiospermas ha permitido la adaptación de éstas para la dispersión y protección de las semillas.

Para el correcto desarrollo del gineceo en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* intervienen numerosos genes, entre los que se encuentran los genes *NGA* (factores B3, 4 miembros en *Arabidopsis* con funciones redundantes) y *SHI/STY* (factores RING-Zn finger, 10 miembros en *Arabidopsis*, también redundantes). Estos genes codifican factores de transcripción que participan, entre otras funciones, en la determinación de la zona apical del gineceo.

Se han identificado homólogos de estos genes en muchas especies de Angiospermas, y en el laboratorio donde se desarrolló este trabajo se determinó que las funciones parecen conservadas en especies como *Eschscholzia californica* y *Nicotiana benthamiana*, ya que el silenciamiento de éstos genes en dichas especies causa malformaciones en el estilo y estigma de sus gineceos. El objetivo de este trabajo es continuar el estudio de la conservación funcional de los genes *NGA* y *STY* en *Nicotiana benthamiana*. Para ello, se transformaron plantas de *Arabidopsis* y *Nicotiana* con los distintos genes de interés de *Nicotiana* para obtener líneas de sobreexpresión. La caracterización morfológica de estas líneas reveló que los fenotipos obtenidos eran muy similares a los observados en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban distintos genes *NGA* o *SHI/STY*, proporcionando una confirmación adicional de que los genes parecen mantener su función en la evolución.

Índice

RESUMEN	ii
Índice.....	iii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	v
1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1. Importancia evolutiva y económica del gineceo y las flores de las Angiospermas.....	- 1 -
1.2. Factores de transcripción con un papel relevante en la formación del gineceo: los factores STY y NGA	- 3 -
1.3. La conservación funcional de los factores de transcripción en la evolución.....	- 6 -
2. OBJETIVOS	- 9 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 10 -
3.1. Material biológico.....	- 10 -
3.1.1. Material vegetal	- 10 -
3.1.2. Microorganismos.....	- 10 -
3.2. Vectores utilizados.....	- 11 -
3.3. Transformación genética de plantas	- 11 -
3.3.1. Transformación estable de plantas de Arabidopsis thaliana	- 11 -
3.3.2. Transformación estable de Nicotiana benthamiana.....	- 13 -
3.4. Técnicas de biología molecular y celular.....	- 15 -
3.4.1. Aislamiento de DNA genómico de Arabidopsis thaliana y Nicotiana benthamiana.....	- 15 -
3.4.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL PARA LA SÍNTESIS DE cDNA.....	- 16 -
3.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa	- 16 -
3.4.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	- 19 -
3.5. Técnicas de fotografía y microscopía.....	- 19 -
3.5.1. Microscopía	- 19 -

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 22 -
4.1.	Sobreexpresión de los genes NbSTY1, NbSTY2, NbSTY3, NbNGAa y NbNGAb en Arabidopsis thaliana.	- 22 -
4.1.1.	Obtención y caracterización de las plantas transgénicas	- 22 -
4.1.2.	Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas sobreexpresoras de los genes SHI/STY de N. benthamiana.....	- 23 -
4.1.3.	Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas sobreexpresoras de los genes NGA de N. benthamiana.....	- 29 -
4.2.	Sobreexpresión de los genes NbSTY1, NbSTY2 y NbNGAb en Nicotiana benthamiana.....	- 34 -
4.2.1.	Obtención y caracterización de las plantas transgénicas	- 34 -
4.2.2.	Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas 35S::NbSTY1	- 36 -
4.2.3.	Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas 35S::NbSTY2	- 38 -
4.2.4.	Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas 35S::NbNGAb.....	- 42 -
4.2.5.	Análisis del nivel de expresión de NbSTY1, NbSTY2 y NbNGAb en las plantas transgénicas T1	- 48 -
4.3.	Las funciones de NGA y STY en la morfogénesis del gineceo están muy conservadas en Nicotiana benthamiana	- 49 -
5.	CONCLUSIONES	- 51 -
6.	AGRADECIMIENTOS.....	- 52 -
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	- 53 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
µg/ml	microgramo por mililitro
µl	microlitro
µM	Micromolar
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AG	AGAMOUS
BA	benziladenina
CaMV35S	promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
cm	centímetro
CO ₂	dióxido de carbono
Col-0	ecotipo Columbia
Ct	ciclo umbral
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
et al.	y otros
EtOH	Etanol
FAE	Formaldehido-ácido acético-etanol
Fig	Figura
g/L	gramo por litro
gDNA	DNA genómico
h	hora
H ₂ O	agua
HCl	ácido clorhídrico
kb	kilobase
KOH	hidróxido de potasio
kV	kilovoltios
L	litro
LB	Luria-Bertani, medio de cultivo bacteriano
MES	Ácido 4-morfolino-etano-sulfónico
mg	miligramo
mg/L	miligramo por litro

mg/ml	miligramo por mililitro
MgCl ₂	cloruro de magnesio
Min	Minuto
mm	milimetro
mM	milimolar
ml	mililitro
MS	medio Murashige y Skoog
NAA	ácido 1-naftalenacético
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
<i>Nb</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>NGA</i>	<i>NGATHA</i>
nm	nanometro
<i>o/n</i>	<i>over night</i> (toda la noche)
p/v	peso por volumen
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pNos	promotor de la nopalina sintasa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
s	Segundo
SDS	dodecil sulfato sódico
SEM	microscopio electrónico de barrido
<i>STY</i>	<i>STYLISH</i>
T ₁	transformantes primarios
TBE	tampón tris-borato EDTA
TFs	Factores de transcripción
T _m	temperatura de fusión estimada
TRIS	TRIS (hidroximetil) aminometano
v/v	volumen por volumen
WT	ecotipo silvestre

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia evolutiva y económica del gineceo y las flores de las Angiospermas

Los frutos son una parte importante de la economía, ya que no sólo son la parte comestible de muchas especies de cultivo como lo son las frutas y hortalizas, sino que también son útiles para la obtención de productos como son el algodón, aceites industriales, especias y semillas. Es por este motivo que una mejora en el rendimiento o calidad de los frutos sería de gran importancia para la producción agrícola y para ello es necesario un mayor conocimiento de los mecanismos genéticos que controlan su desarrollo (Gomáriz, 2013).

Además del factor económico, los frutos son importantes porque son una adquisición evolutiva clave de las Angiospermas, ya que protegen las semillas en desarrollo y aseguran su dispersión. Es por ello que existe una increíble diversidad morfológica en frutos, generalmente asociadas a sus estrategias de dispersión de semillas (Gomáriz, 2013).

Los frutos derivan en su mayor parte del gineceo maduro fertilizado, aunque en algunos casos, como por ejemplo en algunos frutos carnosos, pueden incorporar otras partes de la flor. Por eso la morfología y función de los frutos depende en gran medida de la morfología del gineceo (Figura 1). El gineceo es el órgano reproductivo femenino de la flor, compuesto por uno o más pistilos. Un pistilo puede consistir a su vez en uno o más carpelos fusionados. Los carpelos son los órganos florales femeninos y corresponden a la unidad básica del gineceo. Cuando una flor tiene un solo carpelo, los términos carpelo, pistilo y gineceo son sinónimos (Ferrandiz *et al.*, 2010).

El gineceo es un órgano muy complejo formado por varios tejidos especializados y organizados a lo largo de tres ejes: medio-lateral, abaxial-adaxial y apical-basal. Los principales tejidos se encuentran organizados en módulos funcionales: el estigma, formado por células especializadas para recibir y germinar el polen; el estilo, un tejido muy vascularizado con un núcleo interno de tejido transmisor por el que penetra el tubo polínico hacia el ovario; y el ovario, la cámara que contiene los óvulos. Algunos

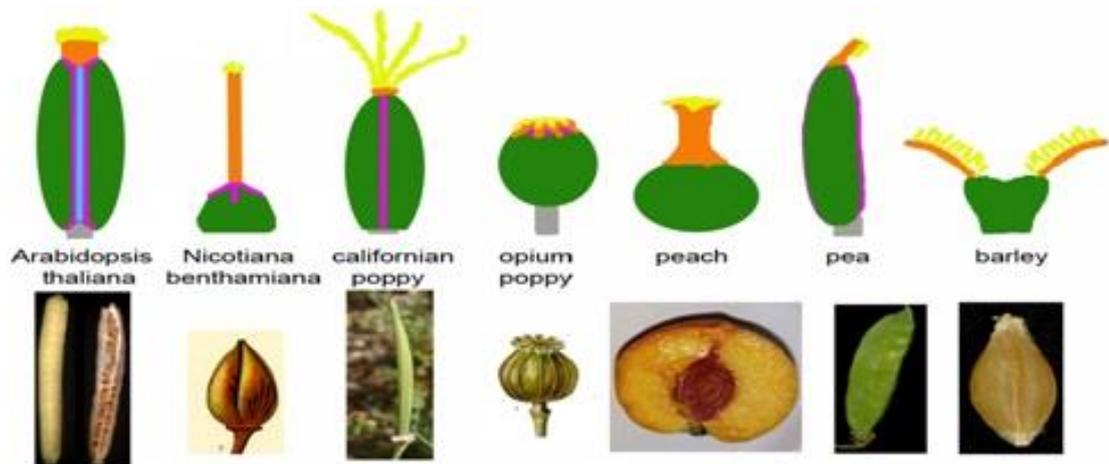


Figura 1. Diversidad morfológica de pistilos y frutos. Arriba, fenotipos de pistilos de diferentes especies. Abajo, fenotipos de fruto en diferentes especies. Los distintos módulos están diferenciados por colores: en verde, las valvas; en naranja, el estilo; en amarillo, el estigma; en rosa, la zona de dehiscencia; en azul, el replum y en gris el ginóforo. Imagen sacada de Gomáriz, 2013.

pistilos tienen un ginóforo, que es una especie de pedúnculo que conecta el ovario con la flor. También se distinguen varios módulos transversalmente: las valvas, que corresponden a las paredes de los carpelos; los márgenes de valva, en las zonas de fusión de los carpelos; e internamente las placentas, que dan lugar a los óvulos y, en algunos casos, los septos, paredes que dividen internamente el ovario. En algunos pistilos aparecen módulos adicionales, como el replum, zonas anatómicamente diferenciadas que corresponden a la parte externa de los septos. A pesar de este plan básico de organización, la morfología del gineceo manifiesta una gran diversidad entre las angiospermas (Figura 1, Ferrándiz *et al.*, 2010). En la figura 2 se muestra el gineceo de *Arabidopsis thaliana* (especie modelo para el estudio del desarrollo en planta) donde todos estos módulos aparecen indicados.

A. thaliana es una pequeña planta herbácea que pertenece a la familia de las brasicáceas (Brassicaceae) que se utiliza desde mediados de los 80 como el organismo modelo de elección para la investigación básica y aplicada en biología vegetal, debido a su pequeño tamaño, arquitectura simple, ciclo vital corto, tamaño de genoma pequeño, la facilidad a la hora de hacer cruzamientos y de manipularla genéticamente. Debido a esto, actualmente se dispone de bases de datos de dominio público con herramientas informáticas e información útiles para la investigación.

El gineceo de *A. thaliana* (Figura 2) está formado por un pistilo bicarpelar. En antesis, los distintos módulos funcionales están claramente diferenciados. En el eje apical-basal encontramos el estigma, un estilo corto con morfología epitelial distintiva, un ovario bilocular y un ginóforo corto y en posición basal. En una sección transversal del ovario también podemos diferenciar distintos módulos: las valvas, que corresponden a las dos paredes de los carpelos; los márgenes de valva y el replum. Internamente, el septum divide el ovario y contiene el tracto transmisor a través del cual los tubos polínicos alcanzan los óvulos. Tras la fertilización, los óvulos se desarrollan en semillas y el gineceo es transformado en un fruto binocular alargado llamado silicua. Esta estructura se abre en su madurez para liberar las semillas a lo largo de cuatro zonas de dehiscencia ambos lados del replum (Balanzá *et al.*, 2006; Balanzá *et al.*, 2014).

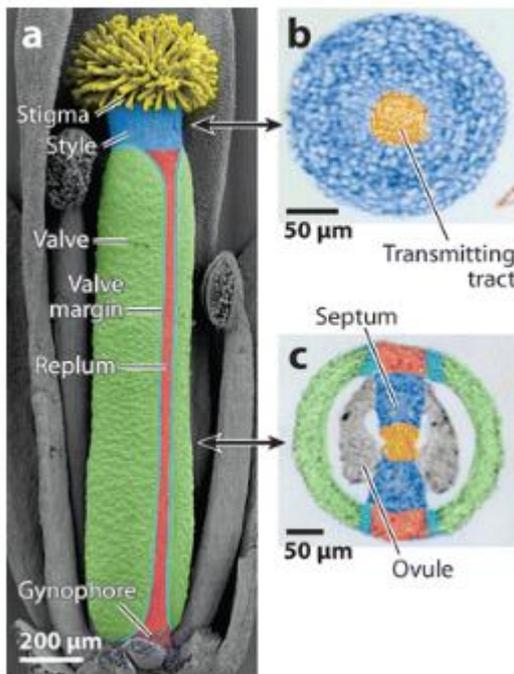


Figura 2. Gineceo de *Arabidopsis thaliana* en antesis. A la izquierda, indicadas las distintas partes apical-basal en un gineceo completo en antesis. A la derecha, indicadas las distintas partes mediolateral en una sección transversal del ovario. Imagen tomada de Seymour *et al.*, 2013.

1.2. Factores de transcripción con un papel relevante en la formación del gineceo: los factores STY y NGA

Debido a la enorme diversidad y potencial de las herramientas genéticas disponibles para *A. thaliana*, se han podido identificar varios genes implicados en la correcta diferenciación de los tejidos y estructuras del gineceo. La mayoría de estos codifican factores de transcripción (TFs) (Balanzá *et al.*, 2006; Ferrándiz *et al.*, 2010), que son proteínas que se unen al DNA regulando la transcripción de sus genes diana. El

trabajo de varios grupos de investigación ha permitido que las redes genéticas que participan en la diferenciación y desarrollo del gineceo sean más comprendidas. El gen clave que especifica la identidad del carpelo es *AGAMOUS*, y su acción parece estar ampliamente conservada en Angiospermas. Una vez que se establece esta identidad, se activan las diferentes rutas genéticas que controlan el desarrollo del gineceo y la diferenciación de sus módulos funcionales (Yanofsky *et al.*, 1990; Sundberg y Ferrándiz, 2009).

Entre otros de los genes que son activados a partir de *AG* se encuentran los factores de transcripción *NGATHA (NGA)* y *SHORT INTERNODES/STYLISH (SHI/STY)*.

Los miembros de la familia *SHORT INTERNODE/STYLISH (SHI/STY)* codifican proteínas de tipo RING ZINC finger que controlan de manera redundante el desarrollo del estigma y del estilo. Se conocen 10 miembros de esta familia en *A. thaliana* (Kuusk *et al.*, 2002; Kuusk *et al.*, 2006). En caso de mutación simple, únicamente el mutante *sty1-1* causa una pequeña depresión en el estilo (Kuusk *et al.*, 2002), pero en casos de mutaciones múltiples la parte apical del carpelo está gravemente afectada (Figura 3), observándose una disminución progresiva del desarrollo del tejido estigmático y estilar y en el tamaño del gineceo conforme aumenta el número de mutaciones combinadas (Kuusk *et al.*, 2006). Por el contrario, la sobreexpresión de *STY1* produce frutos anómalos con estilos cortos y compactados formados por células de tamaño y forma irregular y la aparición de parches de tejido ectópico de estilo en las valvas (Figura 4).

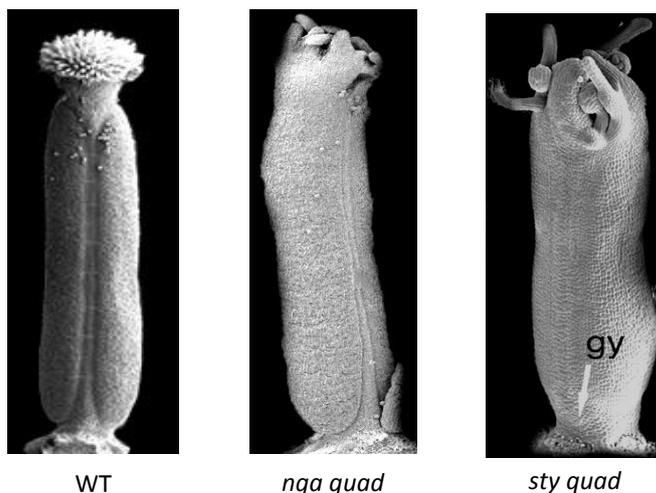


Figura 3. Fenotipo de los mutantes cuádruples *nga* y *sty* frente al fenotipo silvestre. La figura muestra gineceos en antesis de los tres genotipos

Los factores NGA forman una pequeña subfamilia de cuatro miembros dentro del grupo de factores B3 (Álvarez *et al.*, 2009; Trigueros *et al.*, 2009) y juegan papeles esenciales para la especificación de los tejidos apicales del gineceo. Los mutantes simples en *A. thaliana* no poseen defectos en la parte apical del gineceo o éstos son muy sutiles, sin embargo, el cuádruple mutante *nga1 nga2 nga3 nga4* carece de estilo y estigma, además de tener problemas de fusión en la parte apical del carpelo (Figura 3). Estos fenotipos son similares a los mencionados por múltiples mutantes de la familia SHI/STY (Trigueros *et al.*, 2009). Por otra parte, los frutos de las líneas de sobreexpresión de los genes NGA se caracterizan por tener una parte apical engrosada, con ovarios de pequeño tamaño de valvas reducidas, un replum ancho con células dispuestas en zig-zag, y unos ginóforos alargados (Figura 4b, Trigueros *et al.*, 2009).

Se ha observado que *NGA3* y *STY1* comparten patrones de expresión similares, que se observan fuertes fenotipos sinérgicos cuando se combinan los mutantes *nga3 sty1*, y que, por otra parte, la expresión constitutiva y simultánea de *NGA3* y *STY1* induce la conversión de toda la epidermis del ovario en tejido del estilo (Figura 4 C-E, Trigueros *et al.*, 2009).

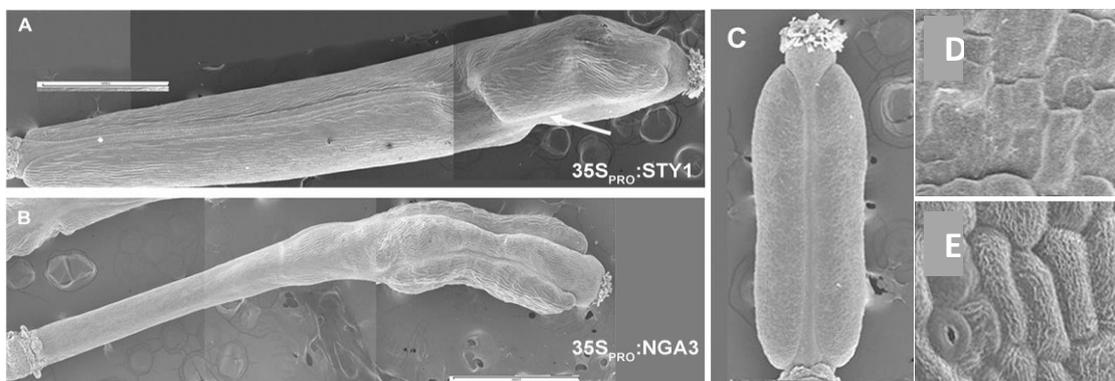


Figura 4. Fenotipo de sobreexpresión 35S:STY1 y 35S:NGA3 en *Arabidopsis thaliana*. (A) Sobreexpresión de AtSTY1, la flecha indica la expresión ectópica de células de estilo en las valvas. (B) Sobreexpresión de AtNGA3, con replum ancho y células dispuestas en zig-zag. (C) Sobreexpresión simultánea de AtSTY1 y AtNGA3, de tamaño reducido y células similares a la de estilo en las valvas. (D) Imagen a mayor aumento de las células de valva silvestre (E) Imagen a mayor aumento de las células de valva del doble sobreexpresor, columnares y con estomas. Imagen tomada de Trigueros *et al.*, 2009.

1.3. La conservación funcional de los factores de transcripción en la evolución

Existe muy poca información disponible sobre las bases moleculares de la morfogénesis del estilo y estigma en especies distintas a *Arabidopsis*. Aún así, estudios comparativos sobre especies distantes de Angiospermas han permitido comenzar a obtener más información sobre las diferentes rutas moleculares involucradas en el desarrollo de los carpelos. Hasta el momento se han identificado homólogos a los genes NGA y STY en muchas especies de Angiospermas. Fourquin y Ferrándiz han determinado que las funciones de NGA en la formación del estilo y estigma aparecen conservadas en *Eschscholzia californica* (amapola de California, dicotiledónea basal) y *Nicotiana benthamiana* (Solanácea, estrechamente emparentada con el tabaco) (Fourquin y Ferrándiz, 2013). En el caso de los genes SHI/STY, Gomáriz y Ferrándiz también determinaron que los genes STY parecen mantener su función en el desarrollo de estilo y estigma en estas mismas especies (Gomáriz *et al.*, manuscrito en preparación).

N. benthamiana es una solanácea separada evolutivamente de *Arabidopsis*, hecho que se manifiesta en cierta medida en la diferencia morfológica que hay en la forma del gineceo. El gineceo de *N. benthamiana* (Figura 5) está formado por un ovario binocular con placenta central y sin replum. En anthesis, en el eje apical-basal encontramos un estigma redondo de tipo húmedo, un estilo muy largo, un ovario bilocular y un ginóforo en posición basal sólo apreciable mediante microscopía electrónica de barrido. En una sección transversal del ovario podemos diferenciar distintos módulos: exteriormente, las valvas, que corresponden a las dos paredes de los carpelos, y los márgenes de valva. Internamente, el septum divide el ovario en dos lóculos donde se encuentran los óvulos y en el centro se encuentra la placenta. Tras la fertilización, los óvulos se desarrollan en semillas y mientras el ovario se expande para dar lugar al fruto, el estilo y estigma se desprenden con el resto de la flor (pétalos y estambres). Esta estructura se abre en su madurez para liberar las semillas a lo largo de cuatro zonas de dehiscencia que se encuentran en la zona apical del ovario.

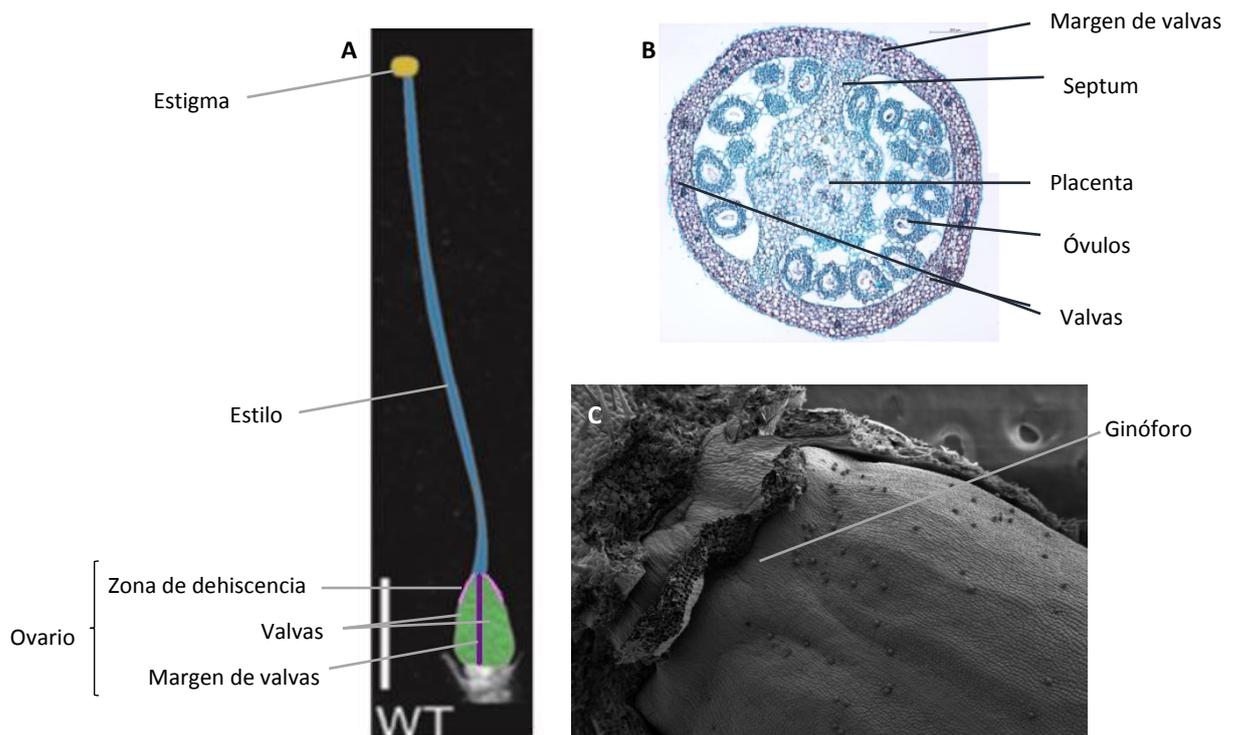


Figura 5. Gineceo de *Nicotiana benthamiana*. (A) Los módulos están diferenciados por colores: En verde las valvas, en azul el estilo, en amarillo el estigma, en morado el margen de valvas y en rosa la zona de dehiscencia. (B) Corte transversal de ovario, el septum lo divide en dos lóculos donde se encuentran los óvulos, con una placenta central. (C) el ginóforo sólo es apreciable mediante microscopía electrónica de barrido.

En esta especie, en los trabajos mencionados previamente, se encontraron dos genes homólogos a los *NGA* de *Arabidopsis*, nombrados *NbNGAa* y *NbNGAb* (Fourquin y Ferrandiz, 2014), y tres homólogos a *AtSTY*: *NbSTY1*, *NbSTY2* y *NbSTY3* (Gomáriz *et al.*, manuscrito en preparación). Mediante hibridaciones *in situ* se demostró la presencia de estos genes en la parte apical del gineceo al igual que ocurre en *Arabidopsis* (Fourquin y Ferrándiz, 2014; Gomáriz *et al.*, en preparación). Además, se realizaron estudios de inactivación mediada por VIGS de estos genes. Los gineceos de las plantas con silenciamiento se observan en la Figura 6. Al igual que ocurre en *Arabidopsis* al mutar los genes *sty* y *nga*, en *Nicotiana* hay una malformación de la parte apical del gineceo, que se caracteriza por un estilo corto y un estigma que no se fusiona (Fig 6 B-D). Estos resultados implican que es probable una conservación de la función de los genes *NGA* y *STY* en el desarrollo de estilo y estigma a lo largo de la evolución.



Figura 6. VIGS de los genes *NbSTY1* y *NbNGAb* en *Nicotiana benthamiana*. (A) Gineceo de *Nicotiana silvestre* (B) El gineceo *NbSTY1*-VIGS tiene estilo corto y malformación en el estigma (C) Estigma *NbSTY1*-VIGS no fusionado y abierto (D) Gineceo *NbNGAb*-VIGS, tiene estilo corto y estigmas no del todo fusionados y abiertos. Barra (A) 200 μ m Barra (B, D) 500 μ m. (B,C) tomadas de Gomáriz *et al.* (manuscrito en preparación) (D) tomada de Fourquin y Ferrándiz (2014)

En este trabajo se pretende continuar los trabajos de Fourquin y Gomáriz, utilizando otras técnicas útiles para comprobar la conservación funcional de los genes STY y NGA en *N. benthamiana*. Para ello, se realizarán transformaciones genéticas en *Arabidopsis thaliana* y *N. benthamiana* de los homólogos de STY y NGA de *N. benthamiana* y la caracterización y comparación de los fenotipos obtenidos.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si la función de los factores de transcripción STY y NGA está conservada en una familia de angiospermas separadas evolutivamente como lo es *Nicotiana benthamiana*, una solanácea con una morfología de estilo y estigma muy diferente a las de *Arabidopsis*.

Objetivos específicos:

1. Observar si el fenotipo de sobreexpresión de los genes *NbSTY* y *NbNGA* en *Arabidopsis thaliana* es similar a los obtenidos por la sobreexpresión de los genes *AtSTY* y *AtNGA*.
2. Comprobar si el fenotipo de sobreexpresión de estos factores de transcripción caracterizados previamente en *A. thaliana* se manifiesta también en *Nicotiana benthamiana* mediante la obtención de plantas transgénicas que los sobreexpresen.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico.

3.1.1. Material vegetal

N. benthamiana se cultivó en invernadero, a 22°C (día) y 18°C (noche) en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), en suelo regado con solución Hoagland nº1, suplementada con oligoelementos (Hewit, 1966). Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en invernadero en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), con un rango de temperatura entre 21-23°C y una humedad del 50%. Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron en alveolos de plástico de 6,5 x 6,5 x 5 cm con una mezcla de turba: perlita: vermiculita (1:1:1), previamente esterilizada a -80°C durante 20 minutos y las plantas de *Nicotiana* se atemperaron y crecieron en macetas de plástico de 12 cm de diámetro con la misma mezcla.

3.1.2. Microorganismos

3.1.2.1. Cepas bacterianas

En este trabajo se han utilizado las cepas bacterianas que se detallan en la tabla 1.

Tabla 1: Cepas bacterianas.

Cepas	Referencias/Origen	Uso
C58 pMP90 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	Koncz y Schell (1989)	Transformación de plantas.

3.1.2.2. Medios de cultivo bacterianos

Medio LB (Luria-Bertani-Medium) pH 7.0: 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl.

3.1.2.3. Suplementos de los medios de cultivo bacterianos

En la tabla 2 se detallan los suplementos que se han utilizado en los medios de cultivo bacterianos.

Tabla 2. Suplementos de los medios de cultivo bacterianos.

Antibiótico	Stock	Disolvente	Concentración utilizada
Kanamicina	100 mg/ml	H2O	50 µg/ml
Rifampicina	50 mg/ml	Metanol 90%	50 µg/ml

3.1.2.4. Condiciones de cultivo de microorganismos

Los cultivos líquidos de *A. tumefaciens* se incubaron a 28°C en agitación a O/N.

3.2. Vectores utilizados.

En la tabla 3, se detallan los vectores utilizados en este trabajo.

Tabla 3. Listado de los vectores utilizados.

Vector	Características
pMDC32	Vector Gateway de clonación para el análisis funcional de genes en planta. Dirige la expresión del gen insertado bajo el control del promotor constitutivo 35S (CaMV35S). Confiere resistencia a Kanamicina en bacteria e Higromicina en planta.

3.3. Transformación genética de plantas

3.3.1. Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Para transformar plantas silvestres y los correspondientes mutantes de *Arabidopsis* se siguió el protocolo de infiltración descrito en Bechtold *et al.* (Bechtold *et al.*, 1993) con algunas modificaciones.

Aproximadamente 60 semillas de plantas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) se cultivaron en macetas de 12 cm de diámetro en condiciones de día largo. Unas dos semanas después de la siembra, se eliminaron algunas plantas para facilitar el crecimiento homogéneo de la población. Cuando la altura de las plantas era de unos 10 cm, aproximadamente tras un mes de cultivo, se decapitó el ápice de la inflorescencia principal, induciendo de este modo la proliferación de las inflorescencias de roseta. Tras

la decapitación del ápice, las plantas se cultivaron durante 4 días más en día largo antes de la infiltración.

Tres días antes de la infiltración, se inoculó la cepa C58 pMP90 de *A. tumefaciens* con la construcción de interés, en un tubo de 50 ml con 10 ml de LB más rifampicina y kanamicina a las concentraciones indicadas en la tabla 2. Este precultivo se incubó durante toda la noche en oscuridad a 28 °C con agitación de 200 rpm. A la mañana siguiente, se inoculó el precultivo en un matraz de 1 L que contenía 600 ml de medio LB con kanamicina. Este cultivo se incubó en las mismas condiciones durante 48 horas. El día de la infiltración se centrifugó el cultivo, a 6000 rpm durante 15 min, y el sedimento obtenido se resuspendió en 200 ml de medio de infiltración (2.2 g/l de sales MS, 5% p/v de sacarosa, 1 mg/l de BAP, 100 mg/l MES, pH 5.9) al que se le había añadido surfactante “Silwet L.77” (“Lehle Seeds”), a una concentración final de 0.05% (v/v).

Antes de la infiltración, se eliminaron todas las flores abiertas y las silicuas fertilizadas de las plantas. Para llevar a cabo la infiltración, las inflorescencias se sumergieron en un recipiente con los 200 ml de la suspensión de *A. tumefaciens* en medio de infiltración durante 5 min aproximadamente. Posteriormente las plantas se secaron ligeramente en un papel absorbente, y se cubrieron con bolsas de plástico. Luego se llevaron al invernadero y un día después se les retiró el plástico. Las plantas permanecieron en el invernadero hasta la recolección de las semillas. Una vez recolectadas las semillas se secaron a 37°C durante 5 días.

3.3.1.1. Selección de transformantes

Para la selección de transformantes primarios las semillas se esterilizaron por el método de los alcoholes. Se realizó un primer lavado en solución de esterilizado (EtOH 70%, 0,005% Triton X-100) durante tres minutos moviéndolas continuamente. Luego se realizó otro lavado de 1 minuto con EtOH al 96% y se dejaron las semillas secando en un papel de filtro estéril. Las semillas se sembraron en el medio de germinación suplementado con Higromicina (2,2 g/L MS; 20g/L sacarosa; 0,1g/L MES a pH: 5,9; con 0,6 % agar; 20 mg/L Higromicina; 300mg/L Timentina). Las semillas se estratificaron a 4°C durante 4 días en oscuridad, y luego se incubaron en condiciones de fotoperiodo estándar, 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad a 26 ± 2 °C. Después de 7-10 días,

las plantas resistentes a la Higromicina se pasaron al invernadero en las condiciones normales de cultivo, allí permanecían hasta la obtención de semillas. Cada planta se consideró una línea transgénica independiente (T₁).

3.3.2. Transformación estable de *Nicotiana benthamiana*

3.3.2.1. Cultivo de explantes primarios

Las semillas de *N. benthamiana* se esterilizaron mediante un lavado de un minuto con EtOH 70%, otro de 4 minutos de lejía 50% y Tween 20 0,05% y cinco lavados con agua estéril. Las semillas estériles se sembraron en tarrinas altas (25 por tarrina) con medio MB (Tabla 4) y se cultivaron a 25° en fotoperiodo. Tras dos semanas, las plantas se pasaron a botes grandes (una por bote). Dos semanas más tarde las plantas ya habían desarrollado hojas jóvenes, y con un sacabocados de 0,5cm de diámetro se cortaron círculos de hoja (explantes) que se pusieron con el envés en contacto con el medio de cocultivo (Tabla 5) dispuesto en placas Petri. La incubación se realizó en oscuridad durante 24 h a 26 ± 2° C.

3.3.2.2. Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación

La cepa utilizada para la transformación fue *A. tumefaciens* C58 que contenía las construcciones de interés. El cultivo bacteriano se incubó a 28°C en oscuridad y agitación constante, en medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/µl) y rifampicina (50 µg/µl) (Tabla 2) como presión de selección y al día siguiente se transfirieron 3 mL del cultivo bacteriano a 200 ml de medio de inoculación suplementado con acetosiringona a una concentración de 200 mM (Tabla 5), manteniendo las mismas condiciones de incubación, hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,4-0,5.

3.3.2.3. Cocultivo de explantes

Transcurridas las 24 h de precultivo de los explantes, éstos se sumergieron durante 5 min en una placa Petri con 25 ml de medio de inoculación con *A. tumefaciens* (Tabla 5), agitando eventualmente. Tras la inoculación, se volvieron a colocar los cortes en las placas utilizadas para el precultivo, nuevamente con el envés tocando el medio. La

incubación duro 48 h con las mismas condiciones descritas para el cultivo de explantes primarios.

3.3.2.4. Inducción de regeneración

Pasado el tiempo de incubación los explantes se pasaron a placas altas con medio de regeneración suplementado con higromicina (200 µg/mL) y timentina (300 µg/mL). El subcultivo se realizó cada tres semanas. Cuando aparecían brotes individuales estos se separaban del callo organogénico y se subcultivaban en medio de enraizamiento (Tabla 5).

3.3.2.5. Aclimatación de plantas en invernadero

Una vez se observaban las primeras raíces, las plantas se encontraban en condiciones adecuadas para ser transferidas al invernadero. Se eliminaron con agua los restos de agar que estaban adheridos a las raíces, después se transfirieron a macetas de 12 cm de diámetro con una mezcla de turba: perlita: vermiculita (1:1:1), previamente esterilizada a -80°C durante 20 minutos y se cubrieron con un vaso de plástico transparente que fue levantado paulatinamente hasta completar la aclimatación.

3.3.2.6. Medios de cultivo para transformación estable de *N. benthamiana*

Tabla 4. Composición de medio de cultivo MB.

Medio MB	(g/L)
Solución mineral	MS
Sacarosa	30
MES	0,5
Tiamina	0,01
Agar	8

En cada etapa del proceso al medio MB se le añadieron hormonas y antibióticos:

Tabla 5. Concentraciones de hormonas y antibióticos en cada paso del proceso de transformación

Etapa del proceso	Hormonas	Antibiótico (mg/L)	
		Higromicina	Timentina
Precultivo/ Cocultivo	NAA 0,1 mg/l + BA 1,0 mg/l	-	-
Inoculación	Acetosiringona (200 μ M), líquido (SIN AGAR)	-	-
Cultivo sin presión selectiva	NAA 0,1 mg/l + BA 1,0 mg/l	-	-
Cultivo con presión selectiva	NAA 0,1 mg/l + BA 1,0 mg/l	200	300
Enraizamiento	-	200	300

Notas:

- El pH del medio se ajustó a 5,7 con KOH y HCl antes de añadir el agar.
- La esterilización se llevó a cabo por calor húmedo en autoclave, a 15 libras de presión a 120°C durante 20 min.
- Tanto hormonas como antibióticos se esterilizaron por filtración y se añadieron justo antes de verter el medio.

3.4. Técnicas de biología molecular y celular.

3.4.1. Aislamiento de DNA genómico de Arabidopsis thaliana y Nicotiana benthamiana.

Para confirmar la presencia de los genes foráneos en las plantas presuntamente transgénicas, se ha utilizado el análisis molecular basado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se requiere la extracción de DNA genómico (gDNA), para ser utilizado como DNA molde en la reacción de PCR.

El gDNA utilizado para genotipar mediante PCR fue aislado a partir de explantes de hojas jóvenes congelados en eppendorf a -80°C, que se trituraron con varillas de plástico en el eppendorf y se maceraron en 400 μ l de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 7,5; 0,5% v/v SDS). Tras una

centrifugación de 2 min a 13000 rpm, 300 µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo eppendorf que contenía 300 µl de isopropanol y la mezcla se centrifugó de nuevo durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se dejó secar y se resuspendió en 100 µl de agua destilada.

3.4.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL PARA LA SÍNTESIS DE cDNA

Para la extracción de RNA total de las plantas, que posteriormente se utilizó para la obtención de cDNA, se utilizó el sistema E.Z.N.A. Plant RNA Kit (OMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la unión selectiva del RNA a membranas acopladas a columnas de centrifugación. Posteriormente se utilizaron 2 µg de RNA total para sintetizar el cDNA utilizando la SuperScriptR IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo el protocolo aportado por el fabricante.

3.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa

3.4.3.1. PCR tipo para amplificar DNA.

Para la amplificación de los diferentes DNAs obtenidos en este trabajo se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction). El DNA molde de la reacción procedía de la extracción del gDNA de las diferentes plantas a analizar, utilizando 2 µl del volumen final de extracción. Las condiciones generales seguidas fueron:

Se añadieron a cada tubo 1-1,25 µM de cada oligonucleótido (tabla 7); 1.25 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; MgCl 1.25 mM; 1 U Taq DNA polimerasa (Promega); Tampón de PCR 5X (Promega) y DNA molde en concentración variable (2 µl).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *SureCycler 8800* (Agilent Technologies) con una incubación inicial de 95°C 5 min; seguida de 335 ciclos de 95°C 40 s, $T_{\text{anillamiento}}$ 45 s y 72°C $T_{\text{extensión}}$; con una incubación final de 72°C 5 min. Las temperaturas y tiempos concretos para cada genotipado se detallan en la tabla 6.

Nota: La temperatura de anillamiento ($T_{\text{anillamiento}}$) se estimó en función de la temperatura de fusión aproximada (T_m) de los primers empleados en la reacción. El tiempo de extensión ($t_{\text{extensión}}$) dependía de la longitud del fragmento a amplificar y, en general, con esta polimerasa, se utilizó 60 seg por kb.

Para comprobar que la reacción de PCR había funcionado se realizó una electroforesis horizontal añadiendo 10 μ l de la reacción en un gel de agarosa (ver apartado electroforesis de DNA en geles de agarosa).

Los oligonucleótidos empleados como primers (tabla 7) fueron sintetizados por la empresa INVITROGEN (<http://www.invitrogen.com>) con grado de purificación máximo. Las secuencias de los oligonucleótidos del gen *NbNGAb* fue tomada de Fourquin y Ferrándiz 2013; del gen *hptII* de Ribas, 2011 y los oligonucleótidos de los genes *NbSTY1* y *NbSTY2* de Gomáriz, 2013.

Tabla 6. Programas de PCR utilizados para amplificar DNA genómico.

NbNGAb		NbSTY1		NbSTY2		hptII	
1x	95°C – 5 min	1x	95°C – 5 min	1x	95°C – 5 min	1x	95°C – 2 min
35x	95°C – 40 seg	35x	95°C – 40 seg	35x	95°C – 40 seg	30x	95°C – 60 seg
	39,9°C – 45 seg		56,1°C – 45 seg		46,7°C – 45 seg		55°C – 60 seg
	72°C – 90 seg		72°C – 90 seg		72°C – 90 seg		72°C – 60 seg
1x	72°C – 5 min	1x	72°C – 5 min	1x	72°C – 5 min	1x	72°C – 4 min

Tabla 7. Primers utilizados.

<i>NbNGAb</i>	35S F	5'-ACAATCCCACTATCCTTCGC-3'
	NbNGAbR	5'-TGAAATATCCAAATCCAAG-3'
<i>NbSTY1</i>	35S F	5'-ACAATCCCACTATCCTTCGC-3'
	NbSTY1R	5'-TTAAGGTCTTGCGGTGGA-3'
<i>NbSTY2</i>	35S F	5'-ACAATCCCACTATCCTTCGC-3'
	NbSTY2R	5'-TCAAAATCTTGCAGGATGTG-3'
<i>hptII</i>	hptIIF	5'-GCCTGAACTCACCGCGACGTC-3'
	hptIIR	5'-GCACTGACGGTGTCTCGTCCAT-3'

3.4.3.2. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

Para el análisis de expresión de los genes en estudio se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Se diseñaron oligonucleótidos utilizando el programa Primer3Plus.com a partir de las regiones específicas para cada gen (tabla 8). La secuencia de los oligonucleótidos para *NbSTY1* y *NbSTY2* fueron diseñadas para este trabajo, y las de *NbNGAb* y *NbEF1* fueron tomadas de Fourquin y Ferrándiz, 2013.

Tabla 8. Características de los oligonucleótidos empleados para el análisis de expresión mediante RT-qPCR. F, cebador directo (*forward*); R, cebador reverso (*reverse*).

<i>NbSTY1</i>	qNbSTY1 (F)	5'-AGTGGTGGGGGTATGAATTG -3'
	qNbSTY1 (R)	5'-TTGGCACTGAAATCCTCTGC-3'
<i>NbSTY2</i>	qNbSTY1 (F)	5'-ACCCACATACAAAGGGTTCG -3'
	qNbSTY2 (R)	5'-CTTGGTTGCCACAATCTTGA-3'
<i>NbNGAb</i>	qNbNGAb(F)	5'-CGTCTGAAAAAGGCAAGGCA-3'
	qNbNGAb (R)	5'-GGACTTTGGTGTGATACCTTCAAAT-3'
<i>NbEF1</i>	qNbEF1 (F)	5'-GCACTGTGATTGATGCCCT-3'
	qNbEF1 (R)	5'-GGACAGCACAGTCAGCTTGG-3'

Las mezclas de reacción para la RT-qPCR se prepararon en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems™), en un volumen final de 20 µL, con 5 µL de cDNA (22,2 ng/µL), 10 µL de SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems™) y 0,6 µL de cada uno de los oligonucleótidos (5 µM). La placa se transfirió a un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System acoplado con el programa informático específico (Applied Biosystems™), donde se llevó a cabo la amplificación siguiendo las condiciones establecidas por el fabricante. Estas condiciones consistieron en una atemperación de 2 minutos a 50 °C, una desnaturalización de 10 minutos a 95 °C, y 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consistía en una desnaturalización de 15 segundos a 95 °C y una elongación de 1 minuto a 60 °C. Para cada cDNA se realizaron tres replicas técnicas. Los niveles relativos de expresión se calcularon usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems™) donde: Ct (Ciclo umbral o *Threshold Cycle*), es el ciclo en el que empieza a detectarse la amplificación por encima del nivel basal de fluorescencia.

Para cada muestra: $\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno}$

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

En los análisis se usó como gen constitutivo normalizador el gen Nb*EF1*. El cálculo comparativo C_T es válido cuando las eficacias de amplificación de los genes en estudio y el gen calibrador son similares. En todos los ensayos de expresión génica las eficiencias de amplificación de los oligonucleótidos estaban entre 90- 110%.

3.4.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Para la separación de fragmentos de DNA, se utilizaron geles de agarosa con una concentración del 1% (p/v) en tampón TBE (tris-borato EDTA) a 1x, según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Además, los geles contenían 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, lo que permitió visualizar el DNA tras exponer el gel a luz ultravioleta. Las electroforesis se realizaron en sistemas horizontales “Sub-Cell GT” y “Mini-Sub Cell GT” conectados a una fuente de alimentación “PowerPack™ Basic” de “Bio-Rad” (www.bio-rad.com).

3.5. Técnicas de fotografía y microscopía

3.5.1. Microscopía

3.5.1.1. Microscopía estereoscópica

Para observar tejidos a bajo aumento (entre 5 y 20 aumentos) se utilizó una lupa binocular Nikon SM2800, que estaba acoplada a una cámara digital Nikon DS-Fi1. Las imágenes se obtuvieron con ayuda del software NIS-Elements F3.0.

3.5.1.2. Microscopía óptica

Las muestras vegetales se introdujeron en FAE (50% EtOH, 5% ácido acético glacial y 3,7% de formaldehído). Para ayudar a la penetración del fijador se realizaron tres pulsos de vacío de 10 min cada uno, se cambió la solución por una fresca y se mantuvieron a temperatura ambiente O/N, tras lo que se lavó y cambió la solución por etanol 70%, con lo que se mantuvo a 4 °C hasta el momento de ser incluidas en parafina (Paraplast Plus, Sigma).

Para la inclusión en parafina se utilizó un procesador automático de tejidos (Leica TP1020) el cual se programó siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa utilizado fue el siguiente: en primer lugar, las muestras se deshidrataron en

concentraciones crecientes de etanol durante una hora cada una (70, 90, 90, 95, 95 y 100%). En la segunda concentración de 95% las muestras se tiñeron con Eosina-Y al 0,2%. Posteriormente se sumergieron tres veces en Histo-Clear® (National Diagnostics) y finalmente se transfieren a parafina Paraplast® Plus (McCormick Scientific) fundida a 58 °C aplicando vacío.

Tras la inclusión en parafina las muestras se colocaron en moldes de aluminio con parafina líquida, se cubrieron con un soporte plástico y se dejaron solidificar a 4 °C. Se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.

Posteriormente, en las muestras incluidas en parafina se realizaron cortes histológicos de 8 µm de espesor utilizando un microtomo Leica RM2025, y se depositaron sobre portaobjetos tratados con poly-lisina.

Las secciones de tejidos incluidos en parafina una vez secas y fijadas sobre los portaobjetos, se desparafinaron en Histo-Clear durante 10 min, luego se rehidrataron en soluciones decrecientes de etanol/agua (100%, 70%, 50%), durante 5 min cada vez y finalmente se lavaron con agua destilada. Los cortes se tiñeron con azul alcian 8GX 1% y safranina O 1% en etanol al 50% durante media hora (Gómez *et al.*, 2011), se lavaron con abundante agua y se dejaron secar una hora en una placa térmica a 40°. Finalmente los cortes se montaron con Merckoglass (Merck®) y se visualizaron mediante microscopía óptica.

Los cortes histológicos se visualizaron con un microscopio óptico Leica DM5000 B, utilizando iluminación de campo claro. El microscopio estaba acoplado a una cámara digital Leica DFC550. Las imágenes se obtuvieron con ayuda del software de análisis de imagen LAS (*Leica Application Suite*) LAS v.9.

3.5.1.3. Microscopía electrónica de barrido

Las muestras se fijaron en FAE al igual que para incluirlas en parafina, manteniéndolas a 4° hasta llevarlas al SEM.

El día de llevar las muestras al SEM 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 CO₂ 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 platino de 2nm, en atmosfera de argón ionizado en un LEICA EM MED020. Las imágenes se obtuvieron mediante el programa SmartSEM (Zeiss), con una velocidad de barrido de 200s por imagen, en un microscopio electrónico Zeiss, modelo ultra55 operando bajo condiciones de microanálisis de entre 2-4 kV y una distancia de trabajo de 7mm.

3.5.1.4. *“Software” empleado para el tratamiento de imágenes*

El procesado y tratamiento de imágenes de microscopía se realizó con GIMP, un programa de procesamiento de imágenes de dominio público que funciona tanto en Windows como Mac y Linux. La página web oficial es <http://www.gimp.org.es/>, en ella se puede realizar la descarga y contiene manuales de uso para las diferentes aplicaciones del programa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Sobreexpresión de los genes *NbSTY1*, *NbSTY2*, *NbSTY3*, *NbNGAa* y *NbNGAb* en *Arabidopsis thaliana*.

4.1.1. Obtención y caracterización de las plantas transgénicas

Se transformaron genéticamente plantas de *Arabidopsis thaliana* con las construcciones 35S::NbSTY1, 35S::NbSTY2, 35S::NbSTY3, 35S::NbNGAa y 35S::NbNGAb. Si las funciones moleculares de las proteínas que codifican estuvieran conservadas en *Nicotiana* y *Arabidopsis*, se esperaría obtener en *Arabidopsis* fenotipos semejantes a los de la sobreexpresión de los genes endógenos *AtSHI/STY* o *AtNGA*.

Para ello se utilizaron las construcciones de sobreexpresión clonadas en el vector pMDC32, con las que se transformaron las plantas utilizando la técnica de inmersión floral en un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Tanto las construcciones como la transformación fueron realizadas por África Gomáriz, con mi ayuda.

Una vez infectadas con *Agrobacterium* se esperó a que las plantas completaran su ciclo y produjeran semillas. No todas las semillas obtenidas serían transgénicas, por lo que se seleccionaron las transformadas (T₁) en placas con medio con MS suplementado con higromicina, que es el agente de selección del vector pMDC32.

Las plantas que crecieron se trasplantaron a alveolos y desde ese momento se procedió a su caracterización fenotípica, observando el fenotipo en frutos de al menos 30 plantas y comparando con plantas silvestres y plantas transformadas con los genes endógenos de *Arabidopsis*, para de esta forma seleccionar los fenotipos más representativos.

4.1.2. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas sobreexpresoras de los genes SHI/STY de *N. benthamiana*

Las plantas que sobreexpresaban los genes *NbSTY* mostraron fenotipos similares a los ya descritos para la sobreexpresión de *AtSTY1* (Kuusk *et al.*, 2002). Las alteraciones fenotípicas más evidentes se observaron en fruto (Figura 7). Para evaluar el efecto de las diferentes construcciones se definieron dos o tres categorías fenotípicas para cada construcción (leve, media o fuerte), según la severidad de las alteraciones observadas en los frutos.

Las plantas *35S::NbSTY1* mostraron dos tipos de fenotipos diferentes, que se clasificaron en fenotipo leve (36,67%) y fuerte (63,33%). Los frutos de las plantas con fenotipo leve eran aproximadamente del mismo tamaño que las de fenotipo silvestre (Fig 7C), pero con una disminución del estilo que da la sensación de que el fruto posee “hombros”, al ser ocupado este espacio por las valvas. Por otra parte, los frutos de fenotipo fuerte (Fig 7D) mostraban disminución del estilo y una forma mucho más rectangular especialmente en la zona apical, junto con una reducción de tamaño evidente así como una forma aplanada y expandida lateralmente de los ovarios. Gineceos en antesis y frutos en estadio 16 de las plantas con fenotipo fuerte se observaron también en el microscopio electrónico de barrido (Figura 8C). La forma del gineceo en antesis (Fig 9B) era similar a la del silvestre (Fig 9A), pero en las líneas *35S::NbSTY1*, la demarcación entre estilo y valvas aparecía menos definida que en el silvestre (Fig 9E-F). A nivel morfológico no se apreciaba una diferencia evidente entre las células de las valvas del gineceo *35S::NbSTY1* y las del gineceo silvestre (Fig 9 I-J). En cuanto al fruto de estadio 16 *35S::NbSTY1*, presentaba estilos significativamente más cortos que en el fruto silvestre (Fig 9 M-N, Q-R), y la demarcación entre estilo y valva seguía estando algo menos definida. En las valvas, las células aparecían de tamaño y forma similares a las células de la valva silvestre (Fig 9U-V).

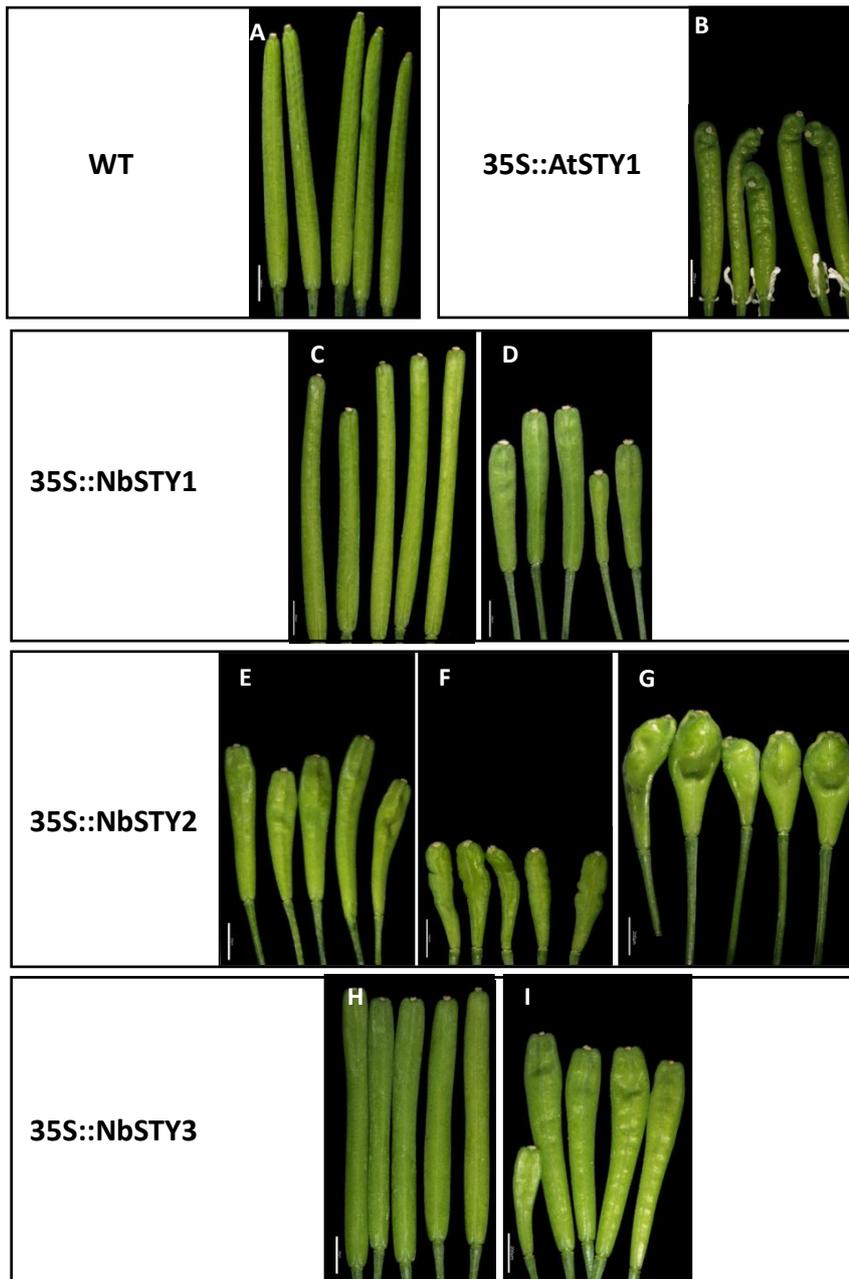


Figura 7. Fenotipos de sobreexpresión de los genes NbSTY en frutos de *Arabidopsis thaliana*. (A) Fruto WT (B) Fruto AtSTY1 (C) Fenotipo leve de sobreexpresión NbSTY1 (D) Fenotipo fuerte de sobreexpresión NbSTY1. (E) fenotipo leve de sobreexpresión NbSTY2 (F) fenotipo medio de sobreexpresión NbSTY2 (G) Fenotipo fuerte de sobreexpresión NbSTY2 (H) Fenotipo leve de sobreexpresión NbSTY3 (I) Fenotipo fuerte de sobreexpresión NbSTY3. Barras: 200 μ m.

Las plantas 35S::NbSTY2 mostraron tres tipos de fenotipos diferentes, todos ellos con diferencias más acentuadas respecto a las plantas de fenotipo silvestre que las plantas con las otras dos construcciones. En este caso, la clasificación fue en fenotipo leve (33,33%), medio (40%) y fuerte (26,67%). Las plantas con fenotipo leve (Fig 7E) son muy similares a las plantas con fenotipo fuerte 35S::NbSTY1, observándose aplanamiento de las valvas, disminución de tamaño del estilo y del tamaño de fruto. Las plantas cuyo fenotipo se clasificó como medio (Fig 7F) tenían un fruto de tamaño más reducido, con valvas, además de aplanadas, irregulares. Por último, los frutos con

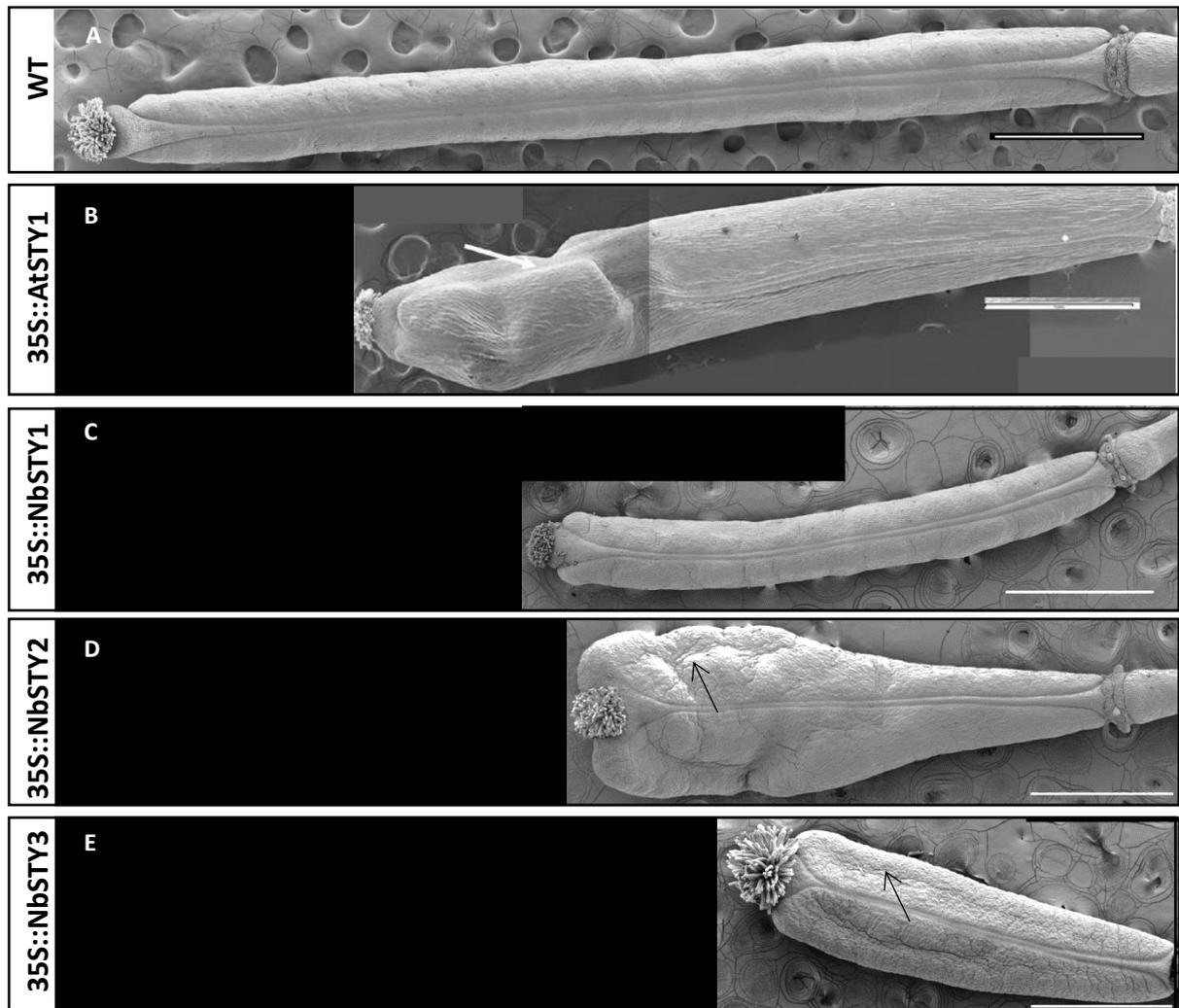


Figura 8. Diferencia en morfología celular en frutos de estadio 16 de *Arabidopsis thaliana* con sobreexpresión de genes NbSTY. (A) fruto de estadio 16 WT (B) Fruto 35S::AtSTY1 (Trigueros *et al.*, 2009) (C) Fruto de estadio 16 35S::NbSTY1 (D) Fruto de estadio 16 35S::NbSTY2 (E) Fruto de estadio 16 35S::NbSTY3. Flechas: rugosidad que puede indicar presencia de tejido ectópico. Barras: 1mm.

fenotipo fuerte (Fig 7G) tienen un tamaño reducido, aunque mayor que los fenotipos de tamaño medio, pero unas malformaciones mucho más evidentes: las valvas, además de aplanadas y muy expandidas lateralmente, tenían muchas irregularidades, con abultamientos y depresiones en su superficie, que recordaban a los frutos 35S::AtSTY1 (Fig7B). Al igual que con los frutos de fenotipo fuerte 35S::NbSTY1, se analizó mediante microscopía electrónica de barrido la morfología de gineceos en antesis y frutos de estadio 16. Los frutos de estadio 16 tenían una morfología muy diferente a la observada en el fenotipo silvestre (Fig 8 D, A). Se podían apreciar mejor las rugosidades y se observó el cambio aparente de identidad de las células en la valva, que adoptaban características propias de las células del estilo (Fig 8D, flecha; Fig 9K, O, S, W). Se ha descrito que la



Figura 9. Diferencia en morfología celular en carpelos y frutos en estadio 16 de *Arabidopsis thaliana* con sobreexpresión de genes NbSTY. (A) carpelo WT Barra: 1mm **(B)** Carpelo 35S::NbSTY1 Barra 100µm **(C)** carpelo 35S::NbSTY2 Barra 100µm **(D)** Carpelo 35S::NbSTY3 Barra: 100µm **(E)** Separación entre estilo y ovario WT Barra:20µm **(F)** Separación entre estilo y ovario en carpelo 35S::NbSTY1 Barra:20µm **(G)** Separación entre estilo y ovario en carpelo 35S::NbSTY2 Barra 20µm **(H)** Separación entre estilo y ovario en carpelo 35S::NbSTY3 Barra: 20µm **(I)** Aproximación de las células de la valva en la zona apical del carpelo WT Barra: 20µm **(J)** Aproximación de las células de la valva en la zona apical del carpelo 35S::NbSTY1 Barra: 20µm **(K)** Aproximación de las células de la valva en la zona apical del carpelo 35S::NbSTY2 Barra:10µm. A la izquierda, tejido ectópico del estilo, a la derecha células de la valva **(L)** aproximación de las células de la valva en la zona apical del carpelo 35S::NbSTY3 Barra:10µm **(M)** Zona apical de fruto estadio 16 WT Barra: 100µm **(N)** Zona apical de fruto estadio 16 35S::NbSTY1 Barra: 100µm **(O)** Zona apical de fruto estadio 16 35S::NbSTY2 Barra:100µm **(P)** Zona apical de fruto estadio 16 35S::NbSTY3 Barra: 100µm **(Q)** Separación entre estilo y ovario en fruto de estadio 16 WT Barra: 20µm **(R)** Separación entre estilo y ovario en fruto de estadio 16 35S::NbSTY1 Barra: 20µm **(S)** Separación entre estilo y ovario en fruto de estadio 16 35S::NbSTY2 Barra:20µm **(T)** Separación entre estilo y ovario en fruto de estadio 16 35S::NbSTY3 Barra:20µm **(U)** Aproximación de las células de la valva en la zona apical de fruto en estadio 16 WT Barra: 20µm **(V)** Aproximación de las células de la valva en la zona apical de fruto en estadio 16 35S:: NbSTY1 Barra:20µm **(W)** Aproximación de las células de la valva en la zona apical de fruto en estadio 16 NbSTY2. A la izquierda, células de tejido ectópico del estilo en las valvas. A la derecha, células de la valva. Barra: 20µm **(X)** Aproximación de las células de la valva en la zona apical de fruto en estadio 16 35S::NbSTY3 Barra:10µm.

aparición ectópica de células del estilo en las valvas ocurre también en las líneas de sobreexpresión del gen *AtSTY1* descritas en la bibliografía (Kuusk *et al.*, 2002, Trigueros *et al.*, 2009) (Fig 8B, flecha). En la Figura 9 O,S se puede observar que la separación entre estilo y ovario en la parte más apical del fruto en estadio 16 no se distinguía, sino que había células de estilo desarrollándose en la parte superior de la valva (Fig 9W). En gineceos en anthesis este fenómeno ya era apreciable (Fig 9G,K), siendo la separación entre estilo y ovario menos evidente que en fruto. Por otra parte, el gineceo (Fig 9C) era más ancho en su parte apical que en la basal, frente a la morfología cilíndrica del silvestre. En cuanto a las células de la valva, tanto en gineceo como en fruto, y especialmente en la parte apical, no se disponían paralelas al eje apical-basal, sino que se orientaban algo oblicuamente respecto a ese eje (Fig 9 K,W).

Por último, las plantas con la construcción 35SS::NbSTY3 poseían un fenotipo intermedio entre las plantas 35S::NbSTY1 y 35S::NbSTY2. Según sus características, se clasificaron en fenotipo de fruto leve (50%) y fuerte (36,67%), además de un 13% de las líneas que no presentaron diferencias fenotípicas evidentes frente al silvestre. Los frutos de fenotipo leve (Fig 7H) eran muy parecidos a los frutos de fenotipo leve de

35S::NbSTY1, sin reducción del tamaño, con una disminución del estilo y forma de “hombros” por el alargamiento y ensanchamiento apical de las valvas. Los frutos de fenotipo fuerte (Fig 7I) también se parecían a los frutos de fenotipo fuerte de la línea 35S::NbSTY1 o a los del fenotipo leve de la línea 35S::NbSTY2, pero el aplanamiento de las valvas estaba más acentuado. En el microscopio electrónico de barrido el fruto en estadio 16 se observaban rugosidades similares a las comentadas para el fruto de la línea 35S::NbSTY2 (Fig 8E, flecha) lo que podría implicar expresión ectópica de tejido del estilo. Sin embargo, al realizar una aproximación a las células de la valva de esa zona (Fig 9X) no se identificaron claramente células con morfología del estilo. Sin embargo, las células de la valva sí que mostraban la orientación oblicua respecto al eje apical-basal (Fig 9U). Esta diferencia morfológica no era tan evidente en células de la valva del gineceo aunque sí se apreciaba ligeramente (Fig 9L). En cuanto a la separación entre estilo y ovario, tanto en carpelo como en fruto de estadio 6 (Fig 9 H,T) la demarcación no era tan clara como en el gineceo y fruto silvestre (Fig 9 E,Q) pero sí podía distinguirse.

Las diferencias de los efectos de los distintos genes en *Arabidopsis* son evidentes, sin embargo todos tienen cierto parecido con el fenotipo de sobreexpresión de AtSTY1. Llama especialmente la atención el fenotipo de sobreexpresión 35S::NbSTY2 por su parecido a la sobreexpresión autóloga, al coincidir en que ambos tienen rugosidades en el fruto y expresión ectópica de tejido de estilo. En la tabla 9 se pueden observar los porcentajes de identidad y de similitud entre algunas de las proteínas de la familia SHI/STY y las proteínas STY de *Arabidopsis*. Como se puede ver, incluso dentro de las proteínas propias de *Arabidopsis* la identidad y similitud es baja y no muy diferente respecto a la identidad y similitud con las proteínas de *Nicotiana*. Sin embargo, entre las proteínas de *Nicotiana*, es la proteína NbSTY2 la que tiene mayor porcentaje de identidad y similitud. Esto podría justificar que la conservación de la función molecular de AtSTY1 y NbSTY2 sea mayor que con las proteínas NbSTY1 y NbSTY3, a pesar de que la similitud de las tres proteínas de *Nicotiana* con AtSTY1 es comparable. No se han descrito con detalle los fenotipos de sobreexpresión de muchos de los factores AtSHI/STY en *Arabidopsis*, tan solo de AtSHI, que no da lugar a la formación de estilo ectópico, y de AtSTY2, que causa efectos similares a los de la sobreexpresión de AtSTY1 (Fridborg *et al.*, 1999; Kuusk *et al.*, 2002), por lo que es difícil establecer posibles correlaciones funcionales entre los factores de *Nicotiana* y los de *Arabidopsis* sin más

datos. Alternativamente, las diferencias fenotípicas asociadas a las diferentes construcciones también podrían deberse a una mayor eficiencia en la expresión de unas frente a otras inherentes a las secuencias de dichas construcciones.

Tabla 9 Identidad y similitud de las proteínas STY. En gris claro se muestra la identidad, en blanco la similitud.

	AtSTY1	AtSTY2	AtSRS5	NbSTY1	NbSTY2	NbSTY3
AtSTY1	100/100	21	23	21	32	31
AtSTY2	11	100/100	31	34	36	38
AtSRS5	11	12	100/100	41	38	37
NbSTY1	12	14	15	100/100	35	38
NbSTY2	12	15	12	18	100/100	80
NbSTY3	11	16	13	19	5	100/100

4.1.3. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas sobreexpresoras de los genes NGA de *N. benthamiana*

En cuanto a las plantas que sobreexpresaban los genes *NbNGA*, mostraron fenotipos similares a los ya descritos para la sobreexpresión de *AtNGA3* (Trigueros *et al.*, 2009). Al igual que en las plantas que sobreexpresaban los genes *SHI/STY*, las alteraciones fenotípicas más evidentes se observaron en fruto (Figura 10) y se definieron dos categorías fenotípicas para cada construcción (leve o fuerte), según la severidad de las alteraciones observadas en los frutos.

Las plantas 35S::*NbNGAa* mostraron dos tipos de fenotipos diferentes, que se clasificaron en fenotipo leve (76,67%) y fuerte (23,33%). Los frutos con fenotipo leve eran aproximadamente del mismo tamaño que las de fenotipo fuerte (Fig 10C), pero de forma similar a lo que ocurre con las plantas sobreexpresoras de genes *NbSTY*, hay una reducción del estilo que da lugar a frutos con “hombros”. Los frutos con fenotipo fuerte (Fig 10D) fueron los más parecidos a los frutos con sobreexpresión autóloga (Fig 10B), ya que mostraron ovarios acortados, aunque no tanto como las líneas 35S::*AtNGA3* descritas y un engrosamiento del replum sobre todo en la zona apical. Los frutos en estadio 16 y carpelos de las plantas con fenotipo fuerte fueron observadas en el

microscopio electrónico de barrido. En la Figura 11C se observa el fruto de estadio 16. Como se apreciaba también en la lupa, el fruto tenía un menor tamaño que el fruto silvestre (Fig 11A), y el engrosamiento en la parte apical del replum y el alargamiento del ginóforo era muy evidente (Fig 12K). En el replum también se observaba una diferencia en la disposición de las células, que crecían en zig-zag (Fig 12N) en contraste con la disposición paralela de las células del replum silvestre y que concordaba con la descrita para las líneas 35S::AtNGA3 (Fig 12M). En cuanto a los gineceos en anthesis 35S::NbNGAa (Fig 12B) al realizar una aproximación en la zona apical (Fig 12E) se podía observar un ligero engrosamiento del estilo y que la separación entre estilo y valvas no estaba tan marcada como en el silvestre (Fig 12D). El ginóforo también era más largo en el gineceo 35S::NbNGAa en comparación con el silvestre (Fig 12G-H). No se observaron cambios en la morfología celular en las valvas, a pesar de haber algunas rugosidades.

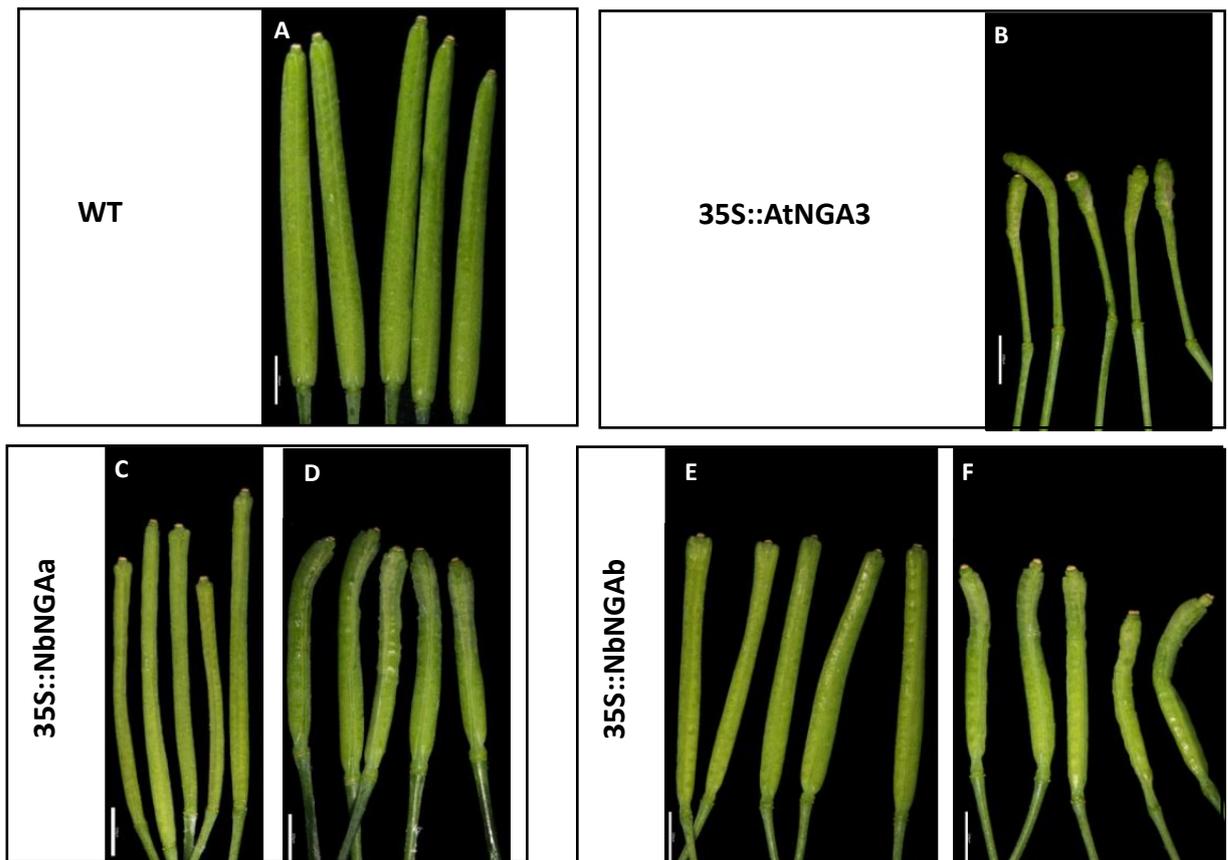


Figura 10. Fenotipos de sobreexpresión de los genes NbNGA en frutos de *Arabidopsis thaliana*. (A) Fruto WT (B) Fruto AtNGA3 (C) Fenotipo leve de sobreexpresión NbNGAa (D) fenotipo fuerte de sobreexpresión NbNGAa (E) Fenotipo leve de sobreexpresión NbNGAb (F) Fenotipo fuerte de sobreexpresión NbNGAb. Barras: 200µm.

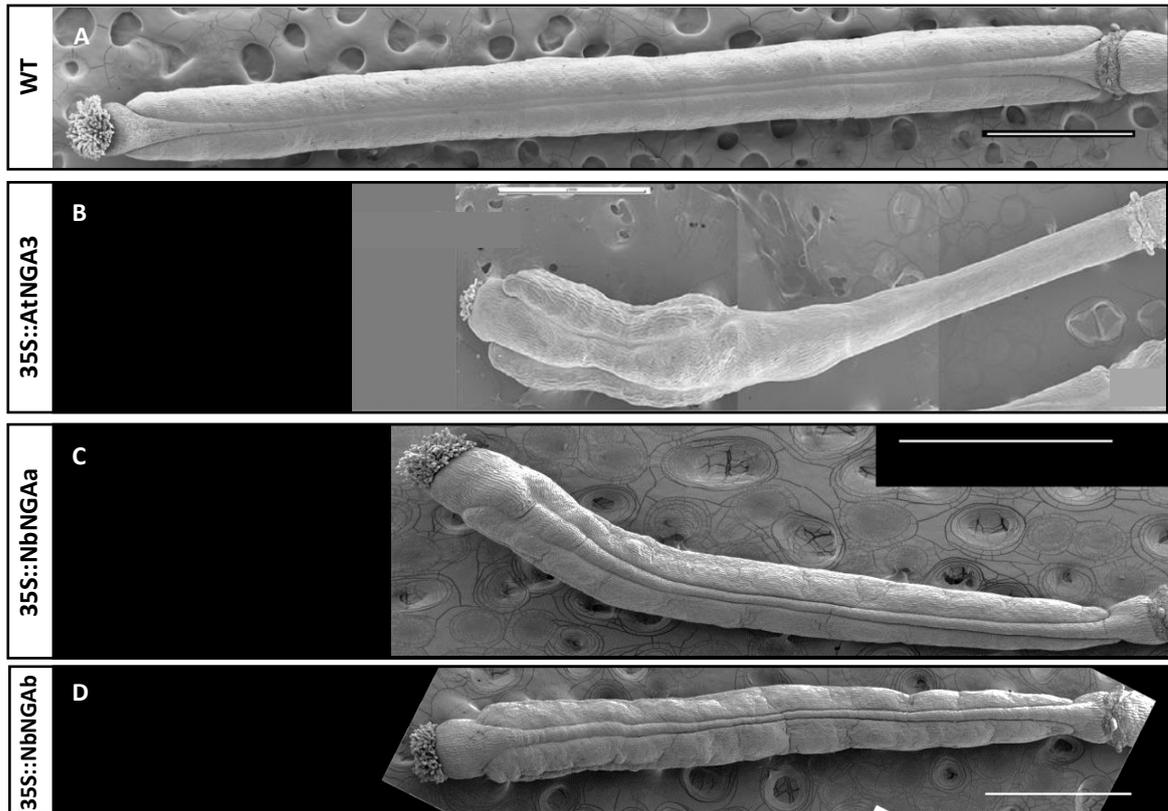


Figura 11. Diferencia en morfología celular en frutos de estadio 16 de *Arabidopsis thaliana* con sobreexpresión de genes NbNGA. (A) Fruto de estadio 16 WT (B) Fruto 35S::AtNGA3 (Trigueros *et al.*, 2009) (C) Fruto de estadio 16 35S::NbNGAa (D) Fruto de estadio 16 35S::NbNGAb. Barra: 1mm.

Las plantas 35S::NbNGAb mostraron dos tipos de fenotipo diferente al fenotipo silvestre, que se clasificaron como leve (53,33%) y fuerte (7%). Los frutos con fenotipo leve (Fig. 10E) tenían un fenotipo muy similar a los frutos con fenotipo medio 35S::NbNGAa, con alargamiento de las valvas y forma de “hombros” en la parte apical. Los frutos con fenotipo fuerte (Fig 10F) al igual que los frutos con fenotipo fuerte 35S::NbNGAa, similar al fenotipo de los frutos que sobreexpresan AtNGA3. Al igual que los frutos mencionados, los frutos con fenotipo fuerte mostraban una disminución del tamaño del ovario, engrosamiento del replum en la parte apical del fruto y alargamiento del ginóforo, más claramente apreciable en el microscopio electrónico de barrido de frutos en estadio 16 (Fig 11D, Fig 12L). En los frutos de estadio 16 además se pudo observar la disposición de las células del replum en forma zig-zag (Fig 12O). En el gineceo los defectos eran más sutiles pero similares: el tamaño del ovario 35S::NbNGAb era menor que el silvestre (Fig 12C) y se veía un alargamiento ligero del ginóforo (Fig 12 I), pero la separación entre estilo y valvas sí que estaba bien marcada (Fig 13F). En los frutos

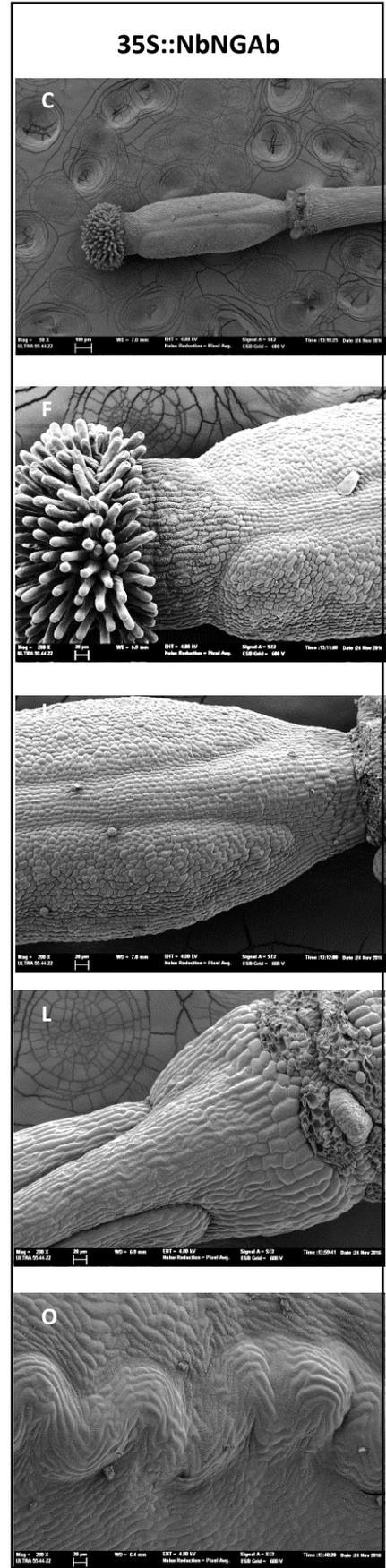
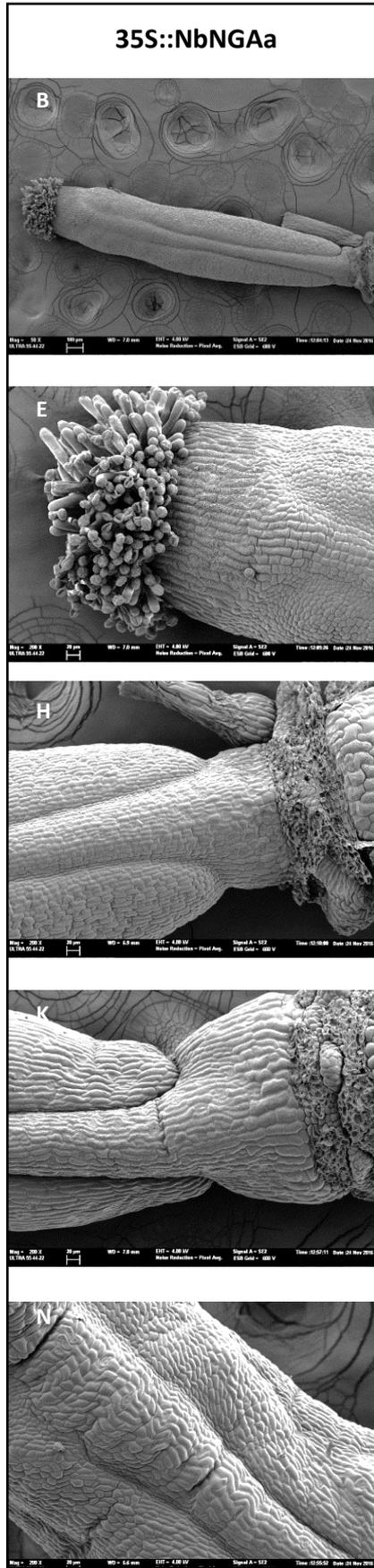
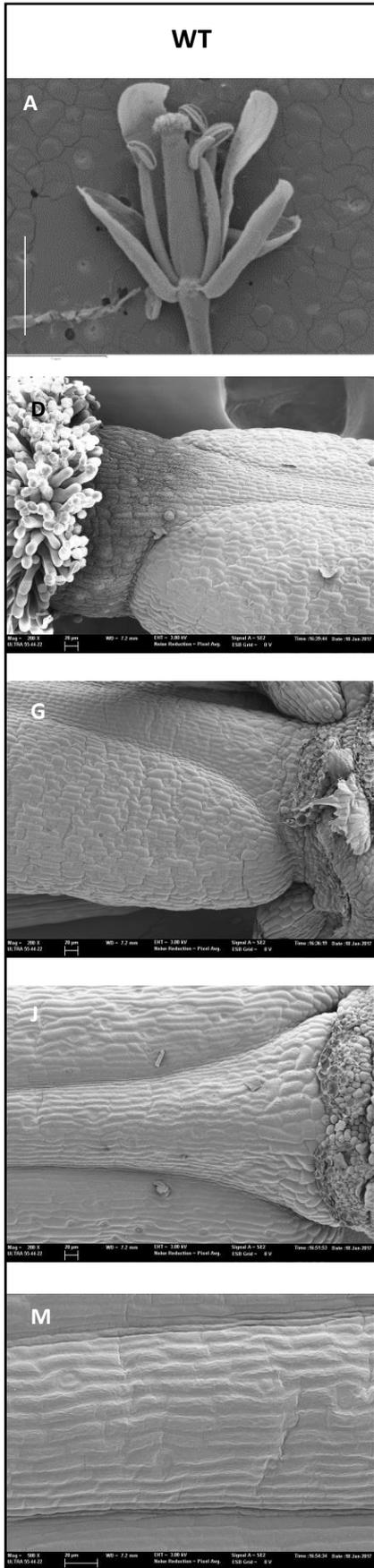
en estadio 16, se pudo además observar que las células de la valva eran más pequeñas que en el silvestre, algo que también se ha descrito en los frutos 35S::AtNGA3 (Trigueros *et al.*, 2009).

La sobreexpresión de ambos genes, tanto *NbNGAa* como *NbNGAb*, causaba pues efectos similares en *Arabidopsis*, en general similares a los causados por la sobreexpresión del gen *AtNGA3*. Sin embargo, los fenotipos son menos pronunciados que los obtenidos por la sobreexpresión autóloga: la disminución del tamaño del ovario es menor, el replum no se engrosa tanto y el ginóforo sólo se alarga ligeramente. Estos resultados indican que las proteínas comparten al menos parcialmente sus propiedades funcionales, aunque dada la distancia evolutiva entre *Nicotiana* y *Arabidopsis* es esperable encontrar cierta divergencia que podría explicar estas diferencias fenotípicas. En la Tabla 10 se observan los porcentajes de identidad y similitud entre las proteínas de *Arabidopsis* y las de *Nicotiana*, y se observa que los porcentajes de las proteínas de *Arabidopsis* frente a *Nicotiana* son un poco menores que los de las proteínas de *Arabidopsis* entre sí. Sin embargo, esta conservación es suficiente para mantener la actividad de las proteínas y podría explicar que los fenotipos de los frutos no sean tan fuertes como en la sobreexpresión autóloga.

Tabla 10 Identidad y similitud de las proteínas NGA. En gris claro se muestra la identidad, en blanco la similitud.

	AtNGA1	AtNGA2	AtNGA3	AtNGA4	NbNGAa	NbNGAb
AtNGA1	100/100	59	37	35	33	29
AtNGA2	69	100/100	37	34	32	28
AtNGA3	48	47	100/100	45	31	31
AtNGA4	44	44	55	100/100	27	25
NbNGAa	40	39	42	37	100/100	48
NbNGAb	35	35	40	34	59	100/100

Figura 12. Diferencia en morfología celular en carpelos y frutos en estadio 16 de *Arabidopsis thaliana* con sobreexpresión de genes *NbNGA*. (A) Carpelo WT Barra:1mm (B) Carpelo 35S::NbNGAa Barra: 100µm (C) Carpelo 35S::NbNGAb Barra: 100µm (D) Separación entre estilo y ovario WT Barra:20µm (E) Separación entre estilo y ovario en carpelo 35S::NbNGAa Barra:20µm (F) Separación entre estilo y ovario en carpelo 35S::NbNGAb Barra:20µm (G) Ginóforo del carpelo WT Barra:20µm (H) Ginóforo del carpelo 35S::NbNGAa Barra:20µm (I) Ginóforo del carpelo 35S::NbNGAb. Barra:20µm (J) Ginóforo de fruto estadio 16 WT Barra:20µm (K) Ginóforo de fruto estadio 16 35S::NbNGAa Barra:20µm (L) Ginóforo de fruto estadio 16 35S::NbNGAb Barra:20µm (M) Replum de fruto de estadio 16 WT Barra:20µm (N) Replum de fruto de estadio 16 35S::NbNGAa Barra:10µm (O) Replum de fruto de estadio 16 35S::NbNGAb. Barra:10µm



Por otro lado, se compararon los fenotipos de varias líneas T₁ 35S::NbNGA independientes con la línea 35S::AtNGA3 ya publicada y que corresponde a una de las transformantes con fenotipo más fuerte (Trigueros *et al.*, 2009, Trigueros, 2008), pero otras transgénicas equivalentes mostraron fenotipos más débiles, similares a los que mostramos en este trabajo para las líneas 35S::NbNGA (Trigueros, 2008), lo cual sugiere que la conservación funcional puede ser bastante extensa.

En resumen, los resultados muestran que la sobreexpresión de los genes de *Nicotiana benthamiana* en *Arabidopsis thaliana* afectan al fruto de manera similar al efecto que tiene la sobreexpresión de los genes autólogos de *Arabidopsis*. Estos resultados indican que es posible que la función molecular de los genes se haya conservado en el tiempo, aunque eso no implica que su función sea necesariamente idéntica en la planta de *Nicotiana*.

4.2. Sobreexpresión de los genes NbSTY1, NbSTY2 y NbNGAb en *Nicotiana benthamiana*

4.2.1. Obtención y caracterización de las plantas transgénicas

Como se ha mencionado anteriormente, otro método para comprobar la conservación funcional de genes homólogos de especies diferentes es comparar el efecto de su sobreexpresión en la especie de la que proceden. Si afecta de la misma manera al desarrollo, se podría esperar que los genes tengan funciones similares en las dos especies y que las rutas en las que participan también estén conservadas. En este caso, estudiamos genes de la familia SHI/STY y NGA de *Nicotiana benthamiana*, una planta fácilmente transformable mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Para generar las plantas transgénicas, se cultivó *N. benthamiana* *in vitro* y se utilizaron explantes de sus hojas. Los explantes se cocultivaron con cepas de *Agrobacterium* que portaban las mismas construcciones que se utilizaron en *Arabidopsis*. Posteriormente se indujo la formación de callos y la regeneración de brotes transgénicos en presencia de higromicina como factor de selección para las plantas transformadas, que tras enraizar se transplantaron en tierra. En este caso, debido al

espacio y material necesario para la transformación, elegimos sólo generar plantas transformantes para las construcciones algunos de estos genes tras observar el fenotipo en *Arabidopsis*. Así, seleccionamos los genes *NbSTY1* y *NbSTY2* debido a que fueron los que al realizar la sobreexpresión en *Arabidopsis* tuvieron efectos más diferentes entre sí, y también el gen *NbNGAb* por ser, entre los dos genes (*NbNGAa* y *NbNGAb*) que producían fenotipos similares, el que producía un efecto fenotípico más similar a la sobreexpresión de *AtNGA3*. Una vez en tierra, las plantas se caracterizaron observando las alteraciones morfológicas de las plantas transgénicas, principalmente las que afectaban a flores y frutos, respecto al fenotipo silvestre.

Previamente se comprobó que las plantas fueran transgénicas realizando dos tipos de PCRs, una para el gen endógeno introducido con el promotor 35S y otra para el gen de resistencia a la higromicina, *hptII*. En la figura 13 se puede observar el resultado de esas PCR para las líneas de plantas seleccionadas para su caracterización. En el control WT y negativo no se observan bandas, sin embargo en las muestras de genómico de las líneas de interés la banda se detecta claramente.

Las plantas transformadas se clasificaron en categorías fenotípicas según las características morfológicas de sus gineceos y su variación respecto al fenotipo silvestre: fenotipos fuertes, con diferencias muy marcadas respecto al fenotipo silvestre, y medios, con diferencias respecto al fenotipo de las plantas silvestres pero no tan características como en los fenotipos fuertes. En las plantas transformadas con la construcción 35S::NbNGAb también se observó un fenotipo similar a los obtenidos por VIGS de NGAb que fueron categorizados como fenotipo de silenciamiento. En la Tabla 11 se resumen el número de plantas obtenidas tras la transformación y los porcentajes de plantas con cada fenotipo.

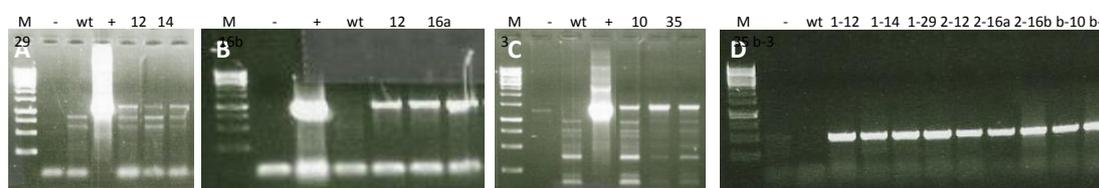


Figura 13. Comprobación de la transformación genética de *Nicotiana benthamiana* mediante PCR. (A) PCR del gen *NbSTY1* en orden: control negativo, control silvestre, control positivo (plásmido) *NbSTY1_12*, *NbSTY1_14*, *NbSTY1_29* (B) PCR del gen *NbSTY2* en orden: control negativo, control positivo (plásmido), control silvestre, *NbSTY2_12*, *NbSTY2_16*, *NbSTY2_18* (C) PCR del gen *NbNGAb* en orden: control negativo, control silvestre, control positivo (plásmido) *NbNGAb_10*, *NGAb_35*, *NGAb_3* (D) PCR del gen *hptII* en orden: control negativo, control silvestre, *NbSTY1_12*, *NbSTY1_14*, *NbSTY1_29*, *NbSTY2_12*, *NbSTY2_16*, *NbSTY2_18*, *NbNGAb_10*, *NbNGAb_35*, *NbNGAb_3*

Tabla 11. Plantas de *Nicotiana* transgénicas y porcentajes de plantas con fenotipo distinto al silvestre, caracterizados en medio, fuerte o de silenciamiento.

Construcción	Plantas obtenidas	Fenotipo WT	Fenotipo medio	Fenotipo fuerte	Fenotipo de silenciamiento
35S::NbSTY1	23	54,54%	31,81%	18,18%	-
35S::NbSTY2	9	44,44%	22,22%	33,33%	-
35S::NbNGAb	20	25%	10%	10%	55%

4.2.2. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas 35S::NbSTY1

En el caso de las plantas 35S::NbSTY1 se seleccionaron las líneas 12, 14 y 29 para su caracterización. Las líneas 12 y 14 (Fig 14C-D) pertenecían a la categoría fenotípica fuerte (18,18% de las transformadas) mientras que el fenotipo de la línea 29 era medio (31,81% de las transformadas) (Fig. 14B). El fenotipo de la línea 29, medio, se caracterizó por un estilo más corto que el silvestre y un ovario más alargado, sin que se apreciara la formación de tejido ectópico ni ningún tipo de malformación en el estigma. En las líneas de fenotipo fuerte, sin embargo, el estilo era mucho más corto y grueso, tanto en comparación con el de la planta silvestre como con la línea 29 (Fig 14C). Además, el tamaño del ovario era más alargado y no se apreciaba una separación clara entre ovario y estilo, sino que la transición entre ambos dominios funcionales parecía gradual y difusa (Fig14C, flecha). Además, la superficie del ovario y el estilo no era lisa, sino con depresiones y rugosidades que recordaban al fenotipo de sobreexpresión de los genes STY en *Arabidopsis* (tanto los endógenos como los de *Nicotiana*) y un tejido que aparentaba ser estigma ectópico. Para comprobarlo, se analizaron algunos gineceos transgénicos de la línea 14 mediante microscopía electrónica de barrido.

La Figura 15 B-C muestra un carpelo de la línea 35S::NbSTY1-14 (categoría fuerte) en el microscopio electrónico de barrido, donde se puede apreciar el estigma ectópico a lo largo del estilo (flecha). En la Figura 16 se puede observar una ampliación de las mayores diferencias con respecto al silvestre de esta línea. En el estigma no se observan diferencias importantes en la línea de sobreexpresión de NbSTY1 (Fig16B) y el silvestre (Fig 16A). En cuanto al ovario, la morfología de las células también parece similar en esta línea (Fig 16E-F). El margen de valvas es más grueso que el margen de valvas silvestre y

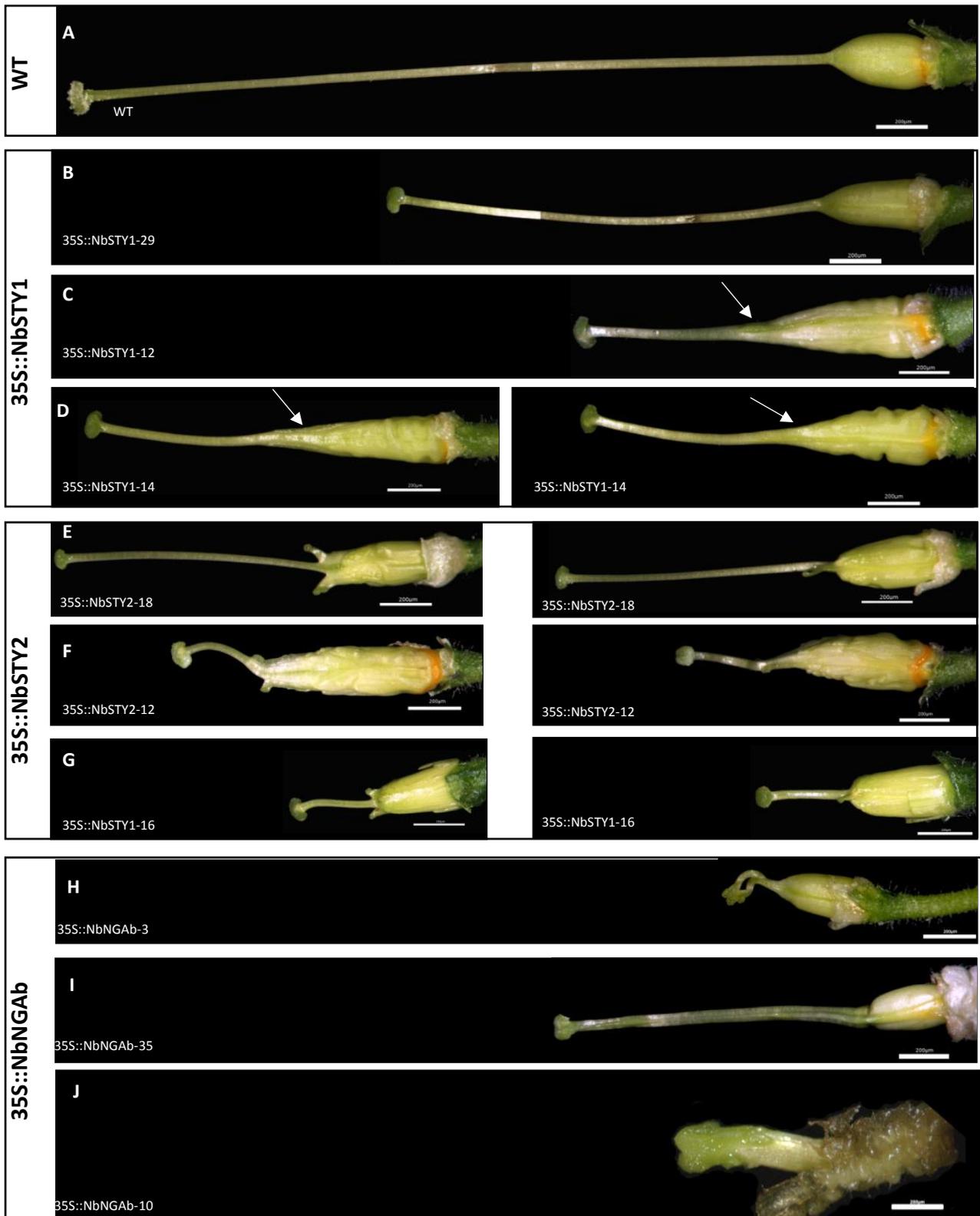


Figura 14. Fenotipos de sobreexpresión de los genes NbSTY1, NbSTY2 y NbNGAb en carpelos de *N. benthamiana*. (A) Carpelo WT (B) NbSTY1-29 (C) NbSTY1-12 (D) NbSTY1-14 (E) NbSTY2-18 (F) NbSTY2-12 (G) NbSTY2-16 (H) NbNGAb-3 (cosupresión) (I) NbNGAb-35 (J) NbNGAb-10. Barras: 1mm. Flechas: falta de demarcación entre el estilo y el ovario.

además parece estar más marcado y ser protuberante (Fig 16I-J). En la parte basal del ovario, el ginóforo y nectarios parecen más desarrollados (Fig.16N). En cuanto al estilo, se puede observar que el grosor es ligeramente mayor (Fig 16Q) pero las células de estilo no cambian de morfología, exceptuando en la zona medial que aparece tejido ectópico de estigma en la que se puede observar en la Figura 16U y en la Figura 15B-C. Por último, la demarcación de estilo y ovario (Fig 16U), a pesar de aparecer poco definida cuando la observamos en la lupa, en el microscopio de barrido sí que se puede apreciar (flecha).

Para obtener una mejor caracterización de la estructura interna de los gineceos de estas líneas y comprender mejor la naturaleza de los cambios en los tejidos producidos por la sobreexpresión de los genes correspondientes se incluyeron gineceos en parafina y se realizaron cortes histológicos que permitieran observar esos detalles. Para ello se realizaron cortes de 8µm que se tiñeron con azul alcian y safranina, se montaron con Merckoglass y observaron en un microscopio óptico.

En la línea 35S::NbSTY1-14 (Fig 17) se observó que el estilo tenía una forma ligeramente diferente del silvestre, siendo algo asimétrica y con los tipos celulares menos definidos (Fig. 17B). Además, el tejido transmisor interno presentaba discontinuidades no apreciables en gineceos silvestres. En cuanto al ovario (Fig 17 D, F, H), la forma no es tan regular y simétrica como en el silvestre y se observan unas protuberancias en la zona frontal que se tiñe de un celeste típico del tejido del estigma y estilo (Fig 17 D), que corresponde al estilo ectópico observado también en el SEM. Estas protuberancias disminuyen en tamaño conforme los cortes se realizan en zonas más basales del ovario (Fig 17 F-H). Por otra parte, hay un engrosamiento en las paredes del éste, ya que en lugar de las 8 capas celulares que tienen los gineceos silvestres, se pueden contar hasta diez (Fig 17 I-J).

4.2.3. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas 35S::NbSTY2

En cuanto a las plantas transformadas con 35S::NbSTY2, las líneas seleccionadas para su caracterización fueron la 12, 16 y 18. Las líneas 12 y 18 (Fig 14 E-F) fueron consideradas de fenotipo fuerte (33,33% de las transformadas), ya que al igual que en las líneas 35S::NbSTY1 había una disminución del tamaño con acortamiento y ligero

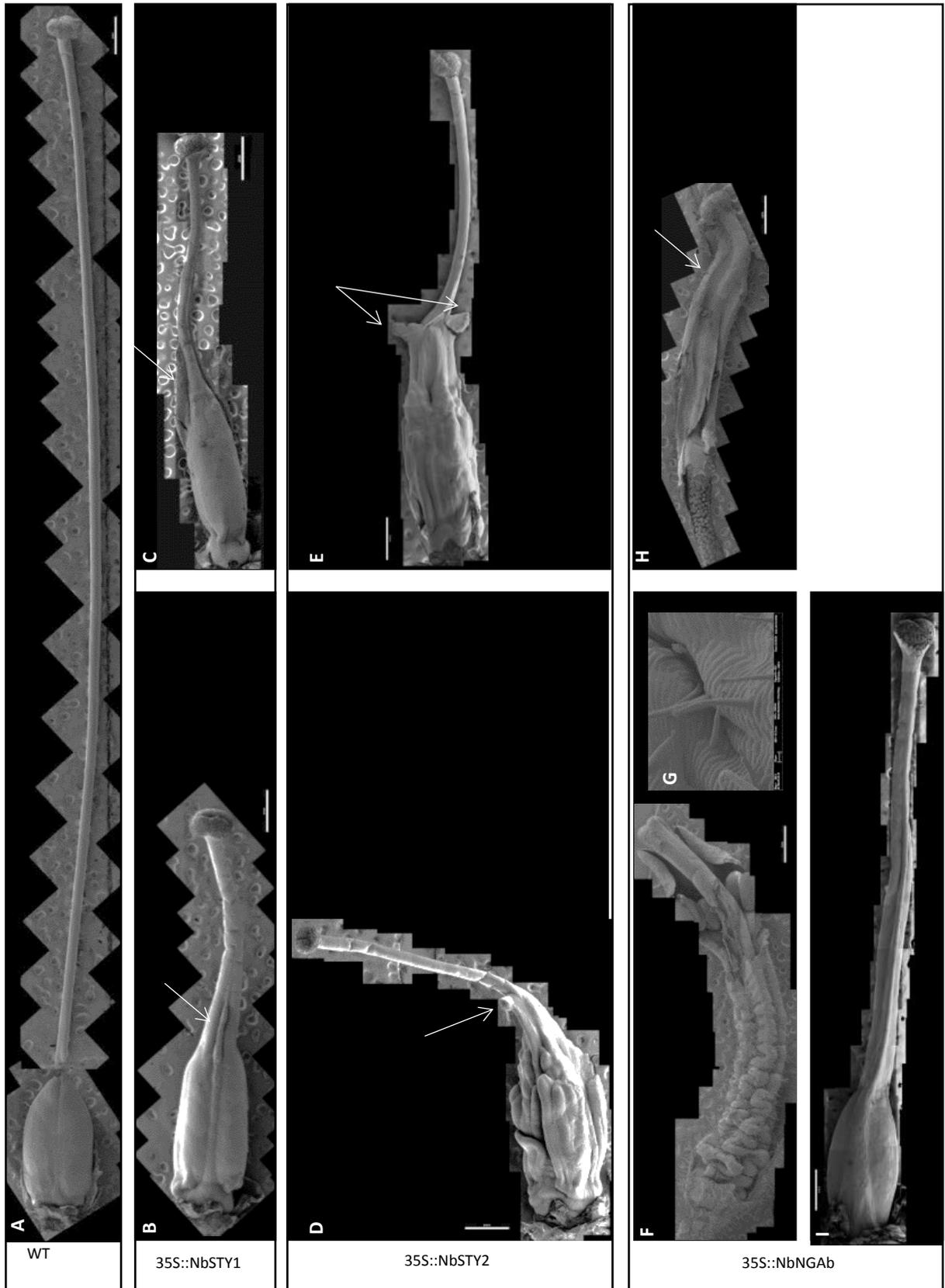


Figura 15. Fenotipos de sobreexpresión de los genes NbSTY1, NbSTY2 y NbNGAb en carpelos de *N. benthamiana* en SEM. (A) Carpelo WT (B-C) NbSTY1-14 (D-E) NbSTY2-12 (F,H) NbNGAb-10 (G) Ampliación del recuadro en F, células de los pétalos de la línea NbNGAb-10 (I) NbNGAb-35. Barras: 1mm

engrosamiento del estilo. Sin embargo, en estas líneas el fenotipo del gineceo es mucho más fuerte que el fenotipo de las líneas 35S::NbSTY1-12 y 14, ya que aparecen malformaciones y rugosidades mucho más pronunciadas en el ovario y estilo, y se desarrollan unas proyecciones protuberantes que recuerdan a estilo-estigma ectópico en la zona medial en la zona de unión estilo-ovario. Además, por otro lado, tampoco se aprecia una clara demarcación entre estilo y ovario. La línea 16 (Fig 14 G) en cambio fue considerada un fenotipo medio (22,22) ya que a pesar de tener un estilo mucho más corto incluso que en las líneas 12 y 18, la separación con el ovario era más clara. Por otra parte, el ovario era ligeramente más grande que el silvestre, pero su forma se mantenía sin malformaciones ni rugosidades, aunque en la unión estilo-ovario seguía apareciendo el tejido ectópico.

Al igual que con la línea 35S::NbSTY1-14, se realizó un scanning en el microscopio electrónico de barrido del gineceo de la línea 35S::NbSTY2-12. En la Figura 15 D-E Se observa el gineceo completo en el microscopio electrónico. En él se puede observar el estigma ectópico que se expresa en unas prolongaciones del estilo en la posición medial del gineceo (Fig 15 D-E, flechas).

En el estigma (Fig 16C), al igual que en la línea 35S::NbSTY1-14 no se observan diferencias importantes con el estigma silvestre. En el ovario, a pesar de que la morfología celular es similar, aparecen algunas rugosidades que no aparecen en el ovario silvestre (Fig 16G). El margen de valvas está más marcado y es más grueso que el silvestre, pero no es protuberante como el de la línea 35S::NbSTY1-14 (Fig 16K) y al final del mismo en la parte basal del ovario aparecen unas rugosidades muy marcadas que parecen separar el ginóforo (Fig 16O), pero sin tejido ectópico. El estilo, al igual que en la línea 35S::NbSTY1-14 es más grueso (Fig. 16R) y como se mencionó previamente, forma protuberancias en la zona medial que terminan en tejido ectópico de estigma (Fig 15 D-E, flechas). Por último, en la línea 35S::NbSTY2-12 (Fig 16V), en la zona en la que debería apreciarse la demarcación entre estilo y ovario aparecen los abultamientos característicos de estas líneas.

Para finalizar de caracterizar esta línea, también se realizaron cortes en parafina y tinciones para la caracterización interna del gineceo. En la línea 35S::NbSTY2-12 como es de esperar el fenotipo era mucho más severo. El estilo, a pesar de mantener su estructura circular, presenta defectos más pronunciados en la formación del tracto de

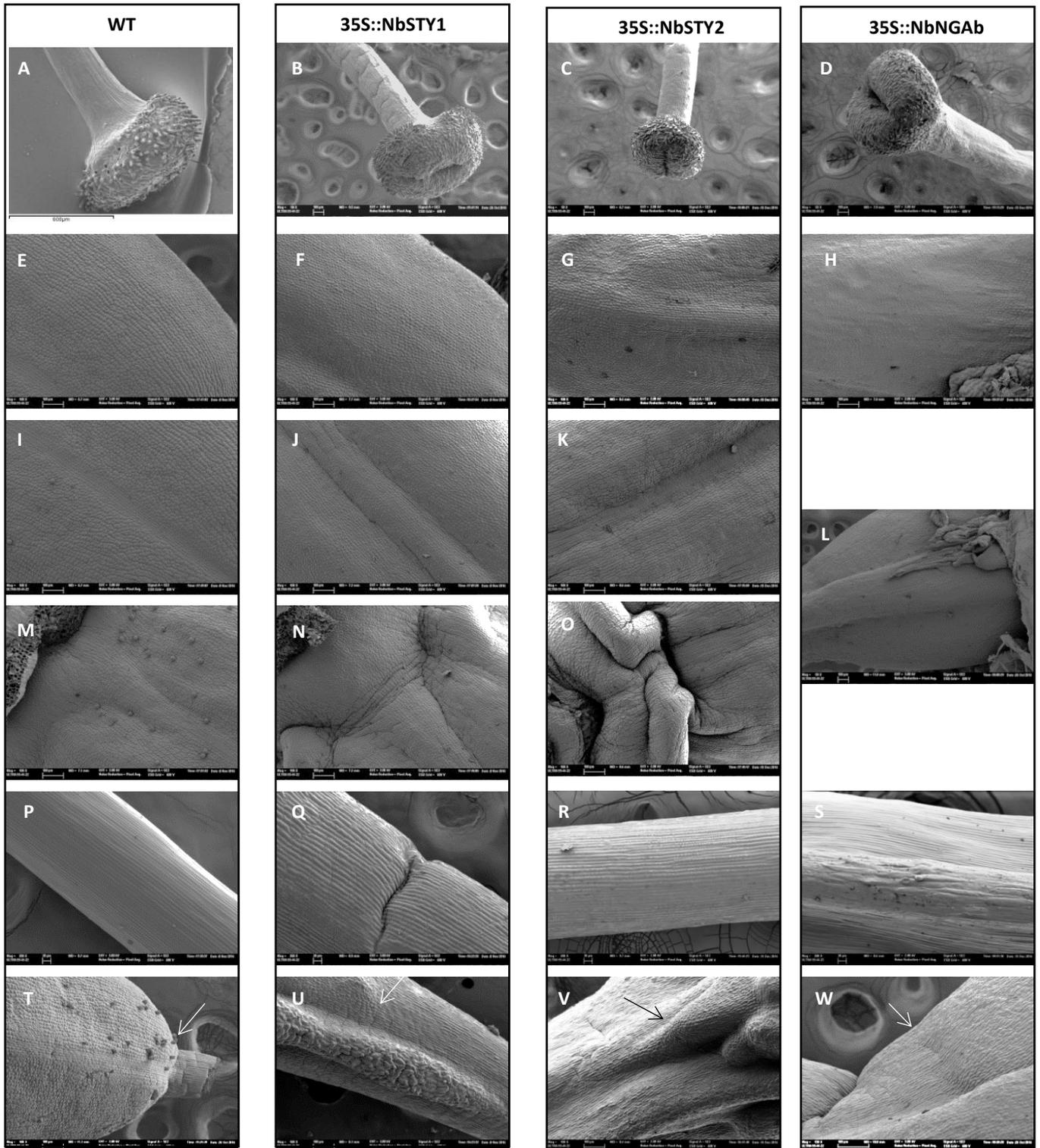


Figura 16. Aproximación diferencias morfológicas en las líneas NbSTY1, NbSTY2 y NbNGAb en carpelos de *N. benthamiana*. (A) Estigma WT (B) Estigma NbSTY1-14 (C) Estigma NbSTY2-12 (D) Estigma NbNGAb-35 (E) Ovario WT (F) Ovario NbSTY1-14 (G) Ovario NbSTY2-12 (H) Ovario NbNGAb-35 (I) Margen de valvas WT (J) Margen de valvas NbSTY1-14 (K) Margen de valvas NbSTY2-12 (L) Margen de valvas y ginóforo NbNGAb-35 (M) Ginóforo WT (N) Ginóforo NbSTY1-14 (O) Ginóforo NbSTY2-12 (P) Estilo WT (Q) Estilo NbSTY1-14 (R) Estilo NbSTY2-12 (S) Estilo NbNGAb-35 (T) Unión estilo-ovario WT (U) Unión estilo-ovario NbSTY1-14 (V) Unión estilo-ovario NbSTY2-12 (W) Unión estilo-ovario NbNGAb-35. Barras: (A) 600µm (B-O, T-W) 100µm (P-S) 20µm Flechas: demarcación entre estilo y ovario.

transmisión (Fig 18B), además de unas protuberancias laterales que coinciden con el tejido ectópico de estigma (Fig 18C) en la zona basal del estilo. En cuanto al ovario, la forma en la zona apical es muy diferente de la silvestre (Fig 18G). En primer lugar, la forma es más cuadrada, debido a las rugosidades que se aprecian externamente. Por otra parte, estas rugosidades parecían debidas a un engrosamiento muy pronunciado de las paredes del ovario, que de un modo similar a lo que ocurría en las líneas 35S::NbSTY1-14, contenían más capas celulares, entre trece en las zonas más finas y diecinueve en las más gruesas. Además, el septo estaba dividido en la parte apical, con tejido transmisor discontinuo, aunque en zonas basales recuperaba la morfología silvestre (Fig 18K, O, S, W). Por último, las paredes del ovario (Fig 18 S, W) en su zona más basal tenían una morfología anómala y no formaban un cilindro simétrico, aunque recuperaban en parte su grosor habitual, excepto en algunas zonas donde el engrosamiento seguía siendo evidente.

4.2.4. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas 35S::NbNGAb

Por último, en la Figura 14 se pueden observar tres fenotipos diferentes en las plantas obtenidas con la transformación con 35S::NbNGAb. Además de los dos fenotipos relacionados con los observados en las líneas de sobreexpresión de NbSTY1 y NbSTY2 (líneas 10 y 35, Fig 14 I-J) se obtuvieron plantas con fenotipos que recordaban a los fenotipos de silenciamiento de las plantas obtenidas mediante VIGS que se mencionaron en la introducción, con estigma no fusionado y estilos malformados (línea 3, Fig 14 H, Fig. 6, 55% de las plantas transformadas). Esto podría deberse a un efecto de cosupresión, que es un fenómeno por el cual la planta silencia los genes endógenos debido a la introducción de un transgén. Por otra parte, las líneas que poseían fenotipos de sobreexpresión tras unas pocas flores empezaban a tener este fenotipo también, lo que reforzaba la idea de una posible cosupresión.

Las plantas con fenotipos de sobreexpresión obtenidos fueron muy diferentes entre sí. El fenotipo de la línea 10, que se consideró fuerte (10% de las plantas transformadas, Fig 14J), mostró un gineceo muy reducido en tamaño con el estilo muy grueso y el estigma muy desarrollado que se extendía basalmente hacia el estilo, recubriéndolo casi hasta la mitad. Por otra parte, el ovario estaba muy reducido en

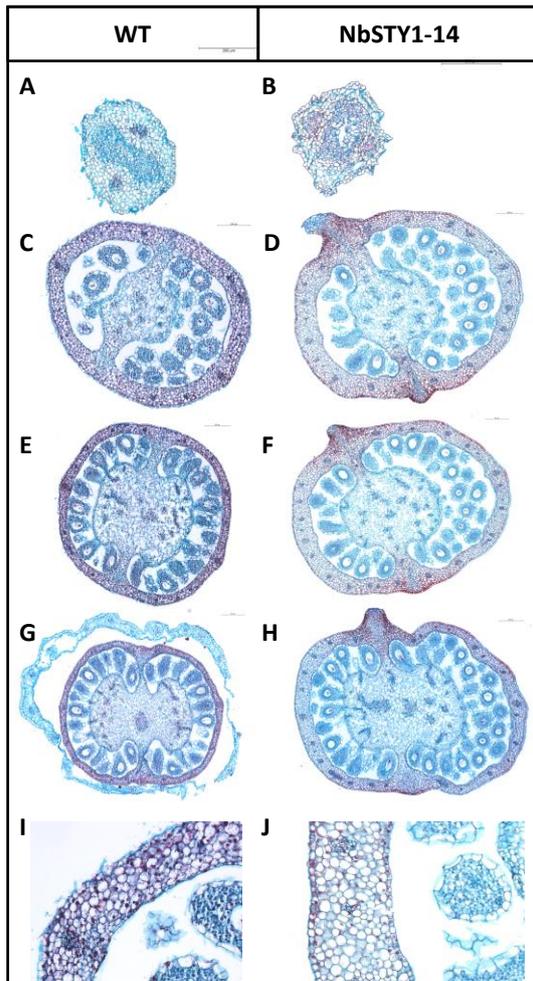


Figura 17. Cortes histológicos teñidos con azul alcian y safranina de carpelos de *N. benthamiana* silvestre y la línea NbSTY1-14 (A) Estilo WT (B) estilo NbSTY1-14 (C, E, G) Cortes progresivos de ovario WT (D, F, H) Cortes progresivos de ovario 35S::NbSTY1-14, con paredes más anchas y estigma ectópico. (I) Aproximación de la pared del ovario WT (J) Aproximación de la pared del ovario 35S::NbSTY1-14. Barras: 200 μ m

tamaño y quedaba cubierto por lo que parecía ser la parte basal del tubo de la corola, que aparecía muy arrugada y con numerosos surcos e indentaciones. Además, esos pétalos parecían estar de algún modo fusionados al ovario, de modo que al intentar separarlos se producía una ruptura de los tejidos que no permitía distinguir bien la naturaleza de las malformaciones.

El fenotipo de la línea 35, que se consideró medio (Fig 14I, 10% de las plantas transformadas) en cambio tenía una forma más parecida a la silvestre que la línea 10, pero también grandes diferencias. Por una parte, el estilo también era más grueso que el silvestre y más corto, mientras que el ovario disminuía en su tamaño. La diferencia más evidente con respecto al fenotipo silvestre era la formación de un tejido ectópico que aparece desde el estigma descendiendo por la superficie del estilo hasta el ovario. Este tejido tenía características de células estigmáticas en su zona más apical, mientras que en la zona más basal quedaba como un engrosamiento protuberante.

Una vez realizado el punto crítico en las muestras 35S::NbNGAb-10, al preparar las muestras para su observación, fue imposible separar los pétalos del ovario sin romperlo (Figura 15H). Sin embargo, el SEM confirmó que el tejido era de pétalos malformados (Figura 15F-G), y que las células de ovario y estilo eran iguales a las del silvestre, sin cambios en la morfología celular a excepción de la expresión ectópica de tejido de estigma (Fig 15H, flecha).

En cuanto a la línea 35S::NbNGAb-35 sí que fue posible una caracterización más detallada. En este caso sí que se apreciaban diferencias en la morfología del estigma, que se extendía levemente hacia la parte más apical del estilo (Fig 16D), y en el ovario aparecían también rugosidades similares a las observadas en la línea 35S::NbSTY2-12 (Fig 16H). En esta línea además el margen de las valvas delimitaba una zona protuberante que se prolongaba por el estilo hasta llegar al estigma (Fig 16L). Esta zona protuberante podría ser una especie de estilo ectópico en forma de banda, ya que había zonas en las que se apreciaba estigma ectópico sobre el mismo, más evidente conforme se acercaba a la parte apical del gineceo (Fig 16S, Fig 16D), sin embargo, al no distinguirse claramente si tenían morfología de células de estilo no se puede asegurar. Por otro lado, el grosor del estilo era mayor que en el silvestre y como ya se ha mencionado, se podían observar papilas estigmáticas ectópicas en él (Fig 16S). Por último, en el caso de las líneas 35S::NbNGAb-35 (Fig 16W), la demarcación entre estilo y ovario estaba muy poco definida, de modo similar a la línea 35S::NbSTY1-14, y solo se apreciaba gracias a diferencias en la morfología de las células.

Para la caracterización interna se incluyeron en parafina y realizaron cortes de gineceos tanto de la línea 35S::NbNGAb-10 como de la 35S::NbNGAb-35.

En el estilo de la línea 35S::NbNGAb-35 (Fig 18E), además de la malformación del tracto de transmisión, se podía ver tejido con la típica coloración del estigma en la zona más externa, coincidiendo con la formación ectópica de papilas estigmáticas observada en el microscopio de barrido. El tamaño del ovario era menor que en el caso del silvestre y se podían ver muchas diferencias a lo largo del mismo. En la parte apical del ovario (Fig 18I), en la unión con el estilo, se podía ver un engrosamiento de las paredes correspondiente a las protuberancias observadas y que era apreciable en el resto de los cortes de la parte superior del ovario (Fig 18M, Q). La forma del ovario era similar a la

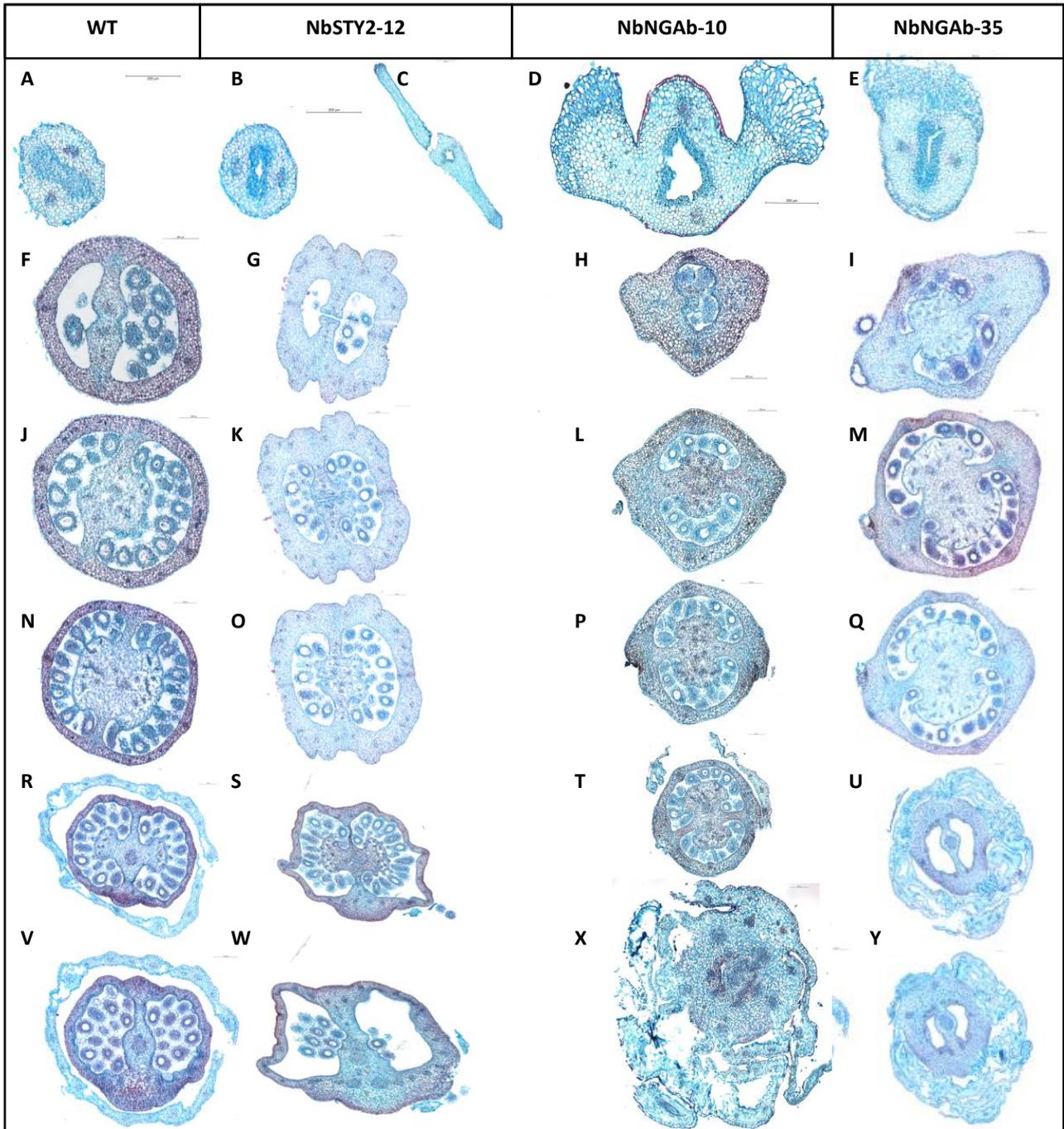


Figura 18. Cortes histológicos teñidos con azul alcian y safranina de carpelos de *N. benthamiana* silvestre y la línea NbSTY1-14 (A) Estilo WT (B) Estilo NbSTY2-12 (C) Estigma ectópico NbSTY2-12 (D) Estilo y estigma ectópico NbNGAb-10 (E) Estilo y estigma ectópico NbNGAb-35 (F, J, N, R, V) Cortes progresivos de ovario WT (G, K, O, S, W) cortes progresivos de ovario NbSTY2-12 (H, L, P, T, X) Cortes progresivos de ovario NbNGAb-10 (I, M, Q, U, Y) cortes progresivos de ovario NbNGAb-35. Barras: 200 µm

del silvestre y el número de capas celulares era el mismo excepto en los engrosamientos, donde era mucho mayor (hasta veinticinco capas). Por último, se observaba una diferencia considerable en cuanto a los pétalos que rodean la parte basal del ovario (Fig

18 U, Y). En flores silvestres, los pétalos forman un tubo continuo que rodea el ovario sin llegar a tocarlo (Fig 18R, V). En la línea 35S::NbNGAb-35 se observaban varias capas de pétalos que formaban numerosas involuciones y se fusionaban en distintos puntos a las paredes del ovario.

El fenotipo de la planta sobreexpresora 35S::NGAb-10 era muy similar a la 35S::NGAb-35. La mayor diferencia residía en la morfología del estilo, que además de ser de un tamaño mucho mayor poseía tejido ectópico de estigma en ambos lados del mismo (Fig 18D). En este caso el tamaño del ovario era menor, pero con un engrosamiento en las mismas zonas y de las mismas características que en 35S::NGAb-35. La mayor diferencia en el ovario residía justo en la parte más apical, que aparecía más maciza (Fig 18H) y donde los lóculos y la placenta estaban reducidos, y también en la parte más basal, donde se observaba claramente que el ovario y los pétalos estaban fusionados (Fig 18X). Además, la parte basal del ovario aparecía también maciza, correspondiendo a una especie de ginóforo alargado que no se observaba en los gineceos silvestres. Este alargamiento del ginóforo era equivalente al producido por sobreexpresión de NGA tanto autóloga como heteróloga en *Arabidopsis*, indicando una clara conservación de función en ambas especies. Además, es algo que se observó también cuando se observaban los frutos obtenidos de las flores NGAb-10 (Figura 19)

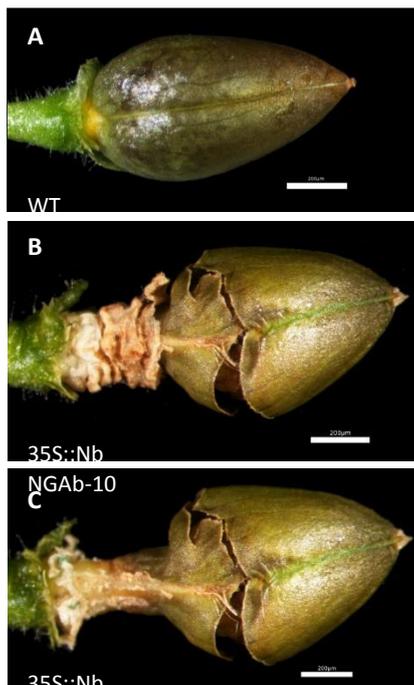


Figura 19. Comparación de frutos de *Nicotiana benthamiana* silvestre y 35S::NbNGAb-10. (A) Fruto silvestre, sin gineceo visible. (B) Fruto 35S::NbNGAb-10 sin pelar, se puede observar la corola de pétalos malformados. (C) Fruto 35S::NbNGAb tras eliminar los pétalos, se observa una estructura que parece ser un alargamiento del ginóforo. Barras: 200μm.

La caracterización fenotípica de las líneas sobreexpresoras nos permite concluir que la función de los genes NGA y STY parece estar muy conservada en *Nicotiana benthamiana*. Para empezar, la sobreexpresión de genes STY provoca rugosidades en el ovario, al igual que ocurre con *Arabidopsis*, y la separación de estilo-ovario no está clara. En *Nicotiana* la morfología del gineceo es muy distinta a la de *Arabidopsis*, por lo que no es inmediato trazar paralelismos; sin embargo, podemos decir que el estilo parece extenderse hacia las valvas, de modo similar a la expresión ectópica de estilo en las valvas de *Arabidopsis* descrito en la bibliografía (Kuusk *et al.*, 2002) y que se ha mencionado previamente. Sin embargo, la aparición de estigma ectópico causada tanto por la sobreexpresión de NbSTY1 como por la sobreexpresión de NbSTY2 podría indicar que en *Nicotiana* estos genes tengan un papel más importante en la diferenciación del estigma, hecho que también explicaría que a la hora de realizar VIGS en *Nicotiana* el estigma sea la zona más afectada del gineceo (Gomáriz *et al.*, manuscrito en preparación).

Al igual que con los genes NbSTY, la sobreexpresión de NbNGAb en *Nicotiana* produce la formación de tejido ectópico de estigma, y además en estas líneas particularmente hay también alargamiento del estigma hacia el estilo. Por este motivo, es posible también que la función del gen NGAb en *Nicotiana* tenga un mayor peso en la diferenciación del estigma que en *Arabidopsis*. Además, al igual que en *Arabidopsis*, hay una disminución del tamaño del ovario y alargamiento del ginóforo y aparece un tejido protuberante entre los márgenes de valvas que podría considerarse como un estilo ectópico o incluso un replum. Como en el gineceo silvestre de *Nicotiana* no hay replum, no podemos afirmarlo con seguridad; pero de serlo, también existiría un paralelismo evidente con el fenotipo de sobreexpresión de NGA en *Arabidopsis*, donde el replum se engrosa notablemente y adopta una morfología muy característica. Si fuera así, podríamos decir que la similitud del fenotipo de sobreexpresión de NbNGAb en *Nicotiana* es mayor con la sobreexpresión de NGA, tanto autóloga como heteróloga, en *Arabidopsis* que la sobreexpresión de NbSTY en *Nicotiana* con la de *Arabidopsis*.

4.2.5. Análisis del nivel de expresión de NbSTY1, NbSTY2 y NbNGAb en las plantas transgénicas T1

A pesar de que los fenotipos observados eran fácilmente diferenciables del fenotipo silvestre, decidimos realizar un análisis de expresión mediante una PCR cuantitativa para comprobar si el fenotipo tenía una relación directa con la expresión en el caso de NbSTY1 y NbSTY2 y si efectivamente había un silenciamiento en el caso de NbNGAb. Para ello, se tomaron muestras de hojas en desarrollo de las plantas transgénicas. Como se puede observar en la Figura 20 (AyB), la diferencia de expresión de los genes NbSTY1 y NbSTY2 con respecto a la planta silvestre es muy significativa.

En las líneas 35S::NbSTY1 (Fig 20A) como es de esperar en las plantas que se consideró que el fenotipo era fuerte la expresión es mayor que en la de fenotipo intermedio (35S::NbSTY1-29). Sin embargo, entre las plantas de fenotipo fuerte hay diferencias de expresión. Esto podría indicar que un cierto nivel de expresión podría ser suficiente para causar el efecto fenotípico más severo.

A la hora de caracterizar las líneas, las líneas 35S::NbSTY2-12 y 35S::NbSTY2-18 fueron categorizadas como fenotipo fuerte. Sin embargo, las cuantitativas indican que la expresión del gen *NbSTY2* es mayor en la línea 35S::NbSTY2-16 (categorizada como fenotipo medio): casi el doble que la expresión en la línea 35S::NbSTY2-12 y casi seis veces más que la expresión en la línea 35S::NbSTY2-18. Para comprobar si este aumento de expresión conlleva un cambio fenotípico que no es apreciable en la lupa, habría que realizar estudios en microscopía electrónica de barrido y cortes histológicos en gineceos de ésta línea.

Por último, en las líneas 33S::NbNGAb caracterizadas, se observó que efectivamente en las hojas en desarrollo hay una menor expresión del gen *NbNGAb*, tanto en las líneas que se consideraron sobreexpresoras (35S::NbNGAb-10 y 35S::NbNGAb-35) como en la que ya se veía desde la primera flor un fenotipo similar a los obtenidos mediante VIGS (35S::NbNGAb-3). Este resultado implica que hay un silenciamiento, resultado de la cosupresión del gen, y el que ocurra también en las hojas jóvenes de las plantas que tenían fenotipos medios y fuertes explica el hecho de que después de unas pocas flores el fenotipo pasara a ser el característico del silenciamiento. Si en el futuro se vuelve a realizar este experimento, teniendo ya en cuenta que es un

gen propenso al silenciamiento, habría que coger muestras de las flores con fenotipo y comparar expresión en flor en lugar de en hoja.

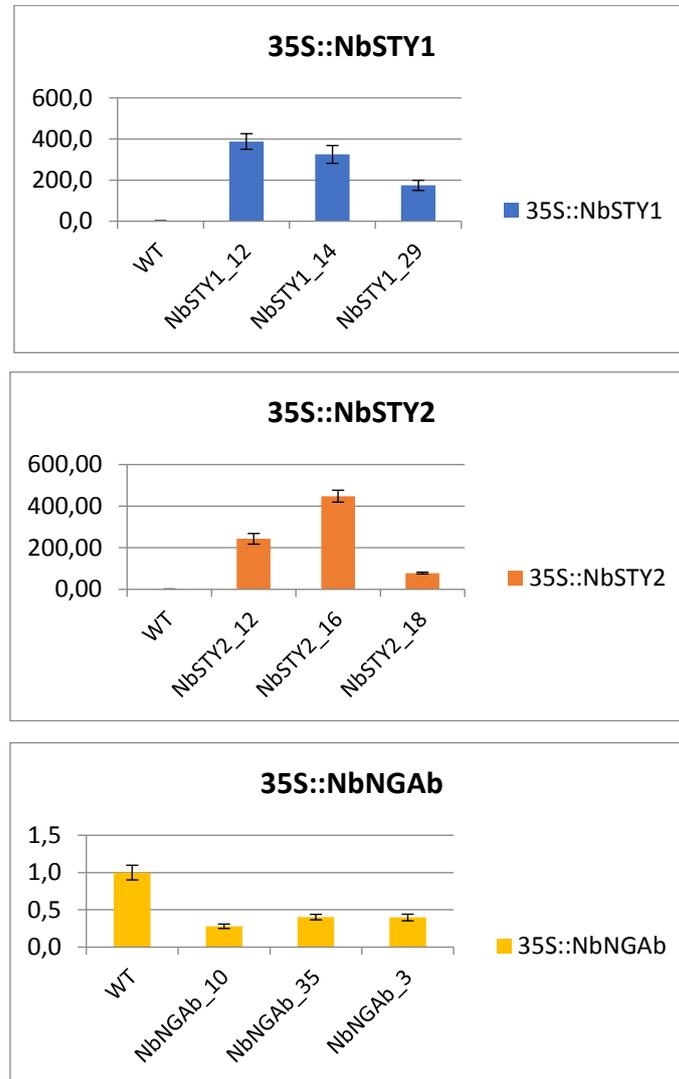


Figura 20. Expresión de los distintos genes (NbSTY1, NbSTY2 y NbSTY3) en cada línea sobreexpresora seleccionada.

4.3. Las funciones de NGA y STY en la morfogénesis del gineceo están muy conservadas en *Nicotiana benthamiana*

Como se observó en la Tabla 9, las proteínas SHI/STY no comparten unos porcentajes de identidad y similitud altos, ni siquiera los que pertenecen a la misma especie. Sin embargo, las proteínas STY de *Nicotiana* provocan unos fenotipos muy similares a la sobreexpresión de las proteínas STY de *Arabidopsis* en *Arabidopsis*. En el

caso de las proteínas NGA, a pesar de que los porcentajes de identidad y similitud son más altos que los de las proteínas STY (Tabla 10), la diferencia sigue siendo importante, sobre todo al comparar la secuencia proteica de las proteínas AtNGA y las NbNGA. Aún así, las líneas 35S::NbNGA mostraron fenotipos muy parecidos a la sobreexpresión autóloga (Trigueros, 2008; Trigueros *et al.*, 2009). Esto indica en ambos casos que los dominios conservados son suficientes para su actividad y que genes diferentes entre sí pueden hacer la misma función, como se comprueba con la redundancia génica que hay de esta familia de genes en *Arabidopsis* (Kuusk *et al.*, 2001, Trigueros *et al.*, 2009).

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo en *Nicotiana*, junto con los derivados de la inactivación de los genes NbNGA y NbSTY mediante VIGS (Fourquin y Ferrándiz, 2013; Gomáriz *et al.*, manuscrito en preparación) apoyan fuertemente que las funciones de los genes SHI/STY y NGA en la diferenciación de los tejidos apicales del gineceo está fuertemente conservada al menos en las plantas dicotiledóneas. Al igual que con los mutantes múltiples en *Arabidopsis* de *AtNGA* y *AtSTY* (Kuusk *et al.*, 2002; Trigueros *et al.*, 2009), el silenciamiento de los genes *NbNGA* y *NbSTY* resulta en la malformación del estilo y estigma de *Nicotiana* (Fourquin y Ferrándiz, 2013; Gomáriz *et al.*, manuscrito en preparación). En el caso de la sobreexpresión, como se explicó previamente los resultados también son prácticamente equivalentes. Estos resultados llaman la atención, ya que el que ambos genes de una misma ruta se mantengan funcionalmente en dos especies separadas evolutivamente con gineceos con una morfología tan diferentes podría implicar que la ruta de formación de estilo y estigma también esté conservada. Habría que realizar un último experimento comparativo sobreexpresando ambos genes en *Nicotiana* para comprobar si se mantiene el fenotipo aditivo observado en al sobreexpresar los genes *AtsSTY* y *AtNGA* en *Arabidopsis*, donde el gineceo se ve muy reducido y las células de valva son propias de estilo (Fig 4C, Trigueros *et al.*, 2009).

Los resultados de este trabajo, junto con los de Fourquin y Ferrándiz (2013) y Gomáriz *et al.* (manuscrito en preparación), nos permiten ampliar el conocimiento sobre la conservación en la evolución de los genes que desarrollan el gineceo y plantean la posibilidad de que haya otros genes o rutas que también se mantengan.

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que:

- El fenotipo de sobreexpresión de los genes STY y NGA de *Nicotiana benthamiana* en *Arabidopsis thaliana* es similar al obtenido al sobreexpresar los genes autólogos, indicando que su función molecular está conservada y tiene actividades equivalentes, especialmente de los genes NbSTY2 y NbNGAb.
- La sobreexpresión de estos genes en *Nicotiana benthamiana* afecta al gineceo, sobre todo a la separación entre estilo y ovario, a la forma del ovario y a la aparición de tejido ectópico del estigma. Estos fenotipos son similares a los obtenidos en *Arabidopsis*, lo que apoya fuertemente que la función de los genes STY y NGA en la morfogénesis del gineceo está fuertemente conservada al menos en dicotiledóneas, así como probablemente las rutas que regulan. Por otro lado, la formación de tejido ectópico de estigma en las transgénicas de *Nicotiana*, que no ocurre en las de *Arabidopsis*, sugiere que los genes de *Nicotiana* podrían ser suficientes para esta función mientras que en *Arabidopsis* podría requerir de factores adicionales.

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias en gran parte a toda la gente que me ha apoyado y ayudado durante todo este tiempo.

Quiero agradecer en primer lugar a mi directora Cristina, gracias por las oportunidades que me has brindado, por tu optimismo y ánimos cuando las cosas no funcionaban como debían o había algún tipo de problema, por tu paciencia con mi desconocimiento y por mucho más.

También quiero agradecer a África, codirectora y sobre todo amiga, por haberme estado enseñando todas las técnicas desde que nos conocemos siempre con buen humor, ayudarme siempre que pudiste, sea aquí o en la distancia.

A Ana A, amiga de máster y compañera de sufrimientos varios, sé que prácticamente habría dormido en el labo alguna noche o desesperado en los malos momentos si no hubieras estado ahí para ayudarme y apoyarme, espero que esto sea el principio de muchos más años de vivencias juntas. Marina, Pepe y MariÁngeles, por estar siempre dispuestos a resolver dudas, echar una mano, buscar soluciones y proponer nuevas ideas, además de alegrarme los días.

A todo el conjunto de laboratorio 1.02-1.03: Paco, Patri, Majo, Ana B., Irene, Vicente, Carlos, Mariana y Marcos, por ser buenos compañeros, ayudarme en los progress con las sugerencias, avisarme de posibles errores, solucionar dudas que me surgían y seguro que más cosas que ahora no me vienen a la mente.

Por último, pero no menos importante, agradecer a Lourdes Castelblanque, Diego Orzaez y Alejandro Atarés por ayudarme con las transgénicas.

Fuera ya del ambiente del Instituto, debo agradecer a mi familia. Mamá, papá, gracias por hacer posible que curse este máster, por estar siempre dispuestos a ayudar, aguantar tener que estar hasta las 9,30 en Valencia y no ir a casa por esperarme a mí que acabara algún experimento, por animarme cuando veía todo negro, por confiar en mí incluso más que yo misma. A Santi, por molestarme hasta hacerme reír incluso cuando no tenía ganas de nada, por acompañarme en mis momentos de estrés y aguantar mis quejas, por ser además de hermano amigo. Gracias a todos, tengo una suerte increíble de tenerlos en mi vida, les quiero mucho.

A mis amigos: Sara, Neus y Carles, gracias por responder mis dudas, ayudarme en mis crisis informáticas, estar dispuestos a echarme una mano siempre que es posible, pero sobre todo gracias por las risas, por el acogerme en sus casas para despejar la cabeza (Sara) u obligarme a salir de la mía para lo mismo y proteger mi salud mental (Neus y Carles). A Stef y Eva, por ser mi vía de escape de la biotecnología, empujarme a hacer cosas nuevas, traerme diversión siempre que es posible o tranquilidad cuando es necesaria y, sobre todo, por aguantar mis momentos “negros” y sacarme a flote con fuerza. A Vicente, por rescatarme algunos mediodías del laboratorio para comer a contrarreloj, por escucharme, aconsejarme y apoyarme, por hacerme reír en los días malos, ofrecerte a ayudar siempre y... gracias por el GIMP, que me salvó la vida. A todos, los quiero mucho.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, J. P., Goldshmidt, A., Efroni, I., Bowman, J. L. and Eshed, Y. (2009).** The NGATHA distal organ development genes are essential for style specification in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 1373-93.
- Balanzà, V., Ballester, P., Colombo, M., Fourquin, C., Martínez-Fernández, I., Ferrándiz, C. (2014).** Genetic and phenotypic analyses of carpel development in *Arabidopsis*. *Springer: Flower Development: Methods and Protocols*, Chapter 11, 231-249.
- Balanza, V., Navarrete, M., Trigueros, M. and Ferrandiz, C. (2006).** Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *J. Exp. Bot.* 57: 3457-3469.
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993).** In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci.* 316: 1194-1199.
- Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998).** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16: 735-43.
- Ferrándiz, C., Fourquin, C., Prunet, N., Scutt, C.P., Sundberg, E., Trehin, C., Vialette-Guiraud, A. C. M. (2010).** Carpel Development. *Advances in Botanical Research*, 55: 1-73. Burlington: Academic Press.
- Fridborg, I., Kuusk, S., Moritz, T., Sundberg, E. (1999)** The *Arabidopsis* dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *The Plant Cell* 11: 1091-1031.
- 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.
- Gomáriz, A. (2013)** El papel de los complejos transcripcionales en la evolución de los frutos de plantas superiores. Universidad Miguel Hernández de Elche, Trabajo de fin de máster.
- Gomez, M. D., Urbez, C., Perez-Amador, M. A., Carbonell, J. (2011)** Characterization of *constricted fruit (ctf)* mutant uncovers a role for *AtMYB117/LOF1* in ovule and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* 6:4 e18760.
- Hewitt, Y. (1966).** Sand and Water Culture Methods used in the Study of Plant Nutrition: Farnham: Commonwealth Agricultural Bureau.

- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Long, J. A., Fridborg, I., Sundberg, E.** (2002). STY1 y STY2 promote the formation of apical tissues during Arabidopsis gynoecium development. *Development*, 129: 4707-4717.
- Kuusk, S., Sohlberg, J.J., Magnus Eklund, D., Sundberg, E.** (2006). Functionally redundant SHI family genes regulate Arabidopsis gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant Journal*, 47: 99-111.
- Ribas, A. F., Dechamp, E., Champion, A., Bertrand, B., Combes, M.C., Verdeil, J.L., Lapeyre, F., Lashermes, P., Etienne, H.** (2011) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biology* 11:92
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Seymour, G. B., Ostergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., Martin, C.** (2013) Fruit Development and Ripening. *Annu Rev Plant Biol* 64:219-41.
- Sundberg, E., and Ferrándiz, C.** (2009). Fruit Development and Seed Dispersal. *Annual Plant Reviews*, 38: 35-69.
- 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*. Universidad Politécnica de Valencia, Tesis doctoral.
- Trigueros, M., Navarrete-Gomez, M., Sato, S., Christensen, S. K., Pelaz, S., Weigel, D., Yanofsky, M. F. and Ferrandiz, C.** (2009). The NGATHA genes direct style development in the Arabidopsis gynoecium. *Plant Cell*, 21: 1394-409.
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A., Meyerowitz, E.M.** (1990). The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346: 35-9.